



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

CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÁCIDO ÚSNICO DE
***CLADONIA SUBSTELLATA* ENCAPSULADO EM MICROESFERAS DE**
COPOLÍMERO DE ÁCIDO LÁCTICO E GLÍCOLICO (PLGA)

ROSEANE MARIA RIBEIRO COSTA

RECIFE, 2003



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

CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÁCIDO ÚSNICO DE
***CLADONIA SUBSTELLATA* ENCAPSULADO EM MICROESFERAS DE**
COPOLÍMERO DE ÁCIDO LÁCTICO E GLÍCOLICO (PLGA)

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração: Tecnologia Farmacêutica.

Mestranda: ROSEANE MARIA RIBEIRO COSTA

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

RECIFE, 2003



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

Data de Aprovação:

Banca Examinadora:

Titulares

Prof^ª. Dr^ª. Nereide Stela Santos Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Silene Carneiro do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr^º. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Universidade Federal de Pernambuco

Suplentes

Prof^ª. Dr^ª. Miracy Muniz de Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Carneiro da Cunha
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho

*Aos meus queridos pais, José de Barros
Costa e Maria de Lourdes Ribeiro Costa,
responsáveis pela minha formação, pela
dedicação, e esforço de educar seus filhos e
pelo carinho em todo momento das nossas
vidas.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela constante presença em minha vida e pelo êxito de mais uma etapa concluída, muita obrigada.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães, pela orientação, confiança, amizade e ensinamentos proporcionados no decorrer do desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof^o. Dr^o. Antonio José Alves, coordenador do Laboratório de Tecnologia Química Farmacêutica (LTQF) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela oportunidade da realização do Curso de Pós Graduação.

Ao Prof^o. Dr^o. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami – LIKA/UFPE, e Prof^o. Dr^o. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, responsável pelo setor de Bioquímica-LIKA, no qual foi desenvolvida a maior parte deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento, Departamento de Antibióticos - UFPE, por ceder as instalações do Setor de Farmacologia, dos Laboratórios de Cultura de Células e Cancerologia Experimental, para realização dos testes com células.

Ao Prof^o. Nicodemos Teles, Setor da Patologia – LIKA/UFPE, pela paciência, atenção e valiosa contribuição nos testes histopatológicos.

Ao Prof^o. Samuel, Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE, pela atenção dispensada na realização das fotos de microscopia óptica.

À Iguacy da Costa Duque, Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE, por toda atenção, apoio e amizade.

À Conceição Chimendes e Ilma Santos, LIKA/UFPE, pela inestimável ajuda e paciência.

Aos colegas dos setores da Patologia - LIKA/UFPE em especial Carmelita B. Lima e Mario Ribeiro de Melo Junior, pela amizade, colaboração e boa vizinhança.

A Rafael Padilha, Setor da Microscopia Eletrônica – LIKA/UFPE, pelo apoio e eficiência no trabalho realizado.

Aos funcionários do LIKA/UFPE, especialmente, Vera Lucia, Luiz Felipe Viegas e Moises Melo, pela atenção e valiosa contribuição no suporte técnico.

A João Eudes do Nascimento, pela amizade e colaboração imprescindível na análise estatística da validação do método de dosagem.

Às amigas Marli Barbosa da Silva e Ana Flávia Brissant pela amizade, ajuda essencial e incentivo.

À Maryene Alves Camargo, Departamento de Química Fundamental, pela amizade e realização das análises termogravimétrica.

Aos colegas do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, em especial à Simone Bezerra dos Santos e Rizonildo Pereira Cordeiro, pela preciosa amizade, incentivo e esclarecimentos de dúvidas no decorrer das disciplinas cursadas.

A todos os amigos da Bioquímica – LIKA, especialmente Luciana Oliveira, Luciana da Mata, Ian Porto e Givanildo Oliveira pela amizade, ajuda e pelas boas risadas, proporcionando momentos de alegria nos longos dias de trabalho.

A todos que fazem parte do Grupo de Sistema de Liberação Controlada, pelo convívio, amizade e colaboração, em especial Taciana Estanislau de Carvalho pela ajuda essencial.

Às amigas, Noemia Pereira dos Santos e Jaqueline Rodrigues da Silva, pela amizade, imprescindível colaboração intelectual e técnica, e por todos momentos que vivenciamos ao longo dessa caminhada.

Aos meus irmãos Rômulo, Romero, Rinaldo pelo apoio e ajuda na conclusão desta etapa da minha vida.

Aos sobrinhos, Igor da Silva Costa e Vinicius José Fernandes Ribeiro, que fizeram recordar através das brincadeiras e sorrisos o quanto é bom ser criança e que devemos viver intensamente, como um gostoso sorriso de criança.

Ao meu amor, Jorge Homero Rocha de Medeiros, pelo seu carinho, compreensão, incentivo e pela inestimável contribuição na confecção desta dissertação.

Ao CNPq pelo financiamento do desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Agradecimentos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1.	Sistema de Liberação Controlada	04
2.1.1.	Sistemas Poliméricos	06
2.1.2.	Propriedades Físico-Químicas e Biológicas do PLGA	09
2.1.3.	Sistemas Microparticulados	09
2.1.3.1.	Aplicações Terapêuticas	10
2.1.3.2.	Vias de Administração e Biodistribuição	12
2.1.3.3.	Outras Aplicações	13
2.1.3.4.	Métodos de Microencapsulação	13
2.1.3.4.1.	Evaporação de Solvente	14
	Processo de emulsão simples	14
	Processo de emulsificação múltipla	14
2.1.3.4.2.	Coacervação (Separação de Fase)	15
2.1.3.4.3.	Spray Drying	15
2.1.3.4.4.	Microencapsulação <i>In Situ</i>	16
2.1.3.4.5.	Outros Métodos de Preparação	17
	Obtenção de Micropartículas sem Solvente Orgânico	17
	Jet Milling – Nova Técnica de Preparação de Micropartículas	17
	Sistema de Máquina De Recirculação Total (TROMS)	17
2.2.	Liquens	18
2.3.	Ácido úsnico	19
2.3.1.	Ocorrência Natural do Ácido Úsnico	19
2.3.2.	Química e Biossíntese do Ácido Úsnico	20
2.3.3.	Farmacocinética do Ácido Úsnico	21

2.3.4.	Aplicações Terapêuticas _____	22
2.3.4.1.	Atividade Antibiótica _____	22
2.3.4.2.	Atividade Antiinflamatória, Analgésica e Antipirética _____	23
2.3.4.3.	Atividade Antiviral _____	23
2.3.4.4.	Atividade Citolóxica e Antitumoral _____	24
2.3.5.	Mecanismo de Ação _____	25
3.	OBJETIVOS _____	26
3.1.	Geral _____	26
3.2.	Específicos _____	26
4.	ARTIGO I _____	27
5.	CONCLUSÕES _____	57
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	59

ANEXO I

Resumos enviados para congresso

ANEXO II

Prêmio recebido

ANEXO III

Validação do método de dosagem

ANEXO IV

Normas do *Journal of Microencapsulation*

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Nível do fármaco no sangue após administração em forma farmacêutica convencional ou em sistema de liberação controlada Shishido, 2001) _____	04
Figura 2. Micropartículas: microesferas ou microcápsulas _____	10
Figura 3. Esquema de TROMS (Barrio <i>et al.</i> , 2003) _____	18
Figura 4. Estrutura química do ácido úsnico (Ingólfssdóttir, 2002) _____	20
Figura 5. Biossíntese do ácido úsnico proposta por Taguchi <i>et al.</i> (1969) _____	21

ARTIGO I

Figure 1. Photomicrographs of the usnic acid-loaded PLGA microspheres prepared with or without PEG analysed by: optical microscopy without (a) and with PEG (b) (40x); SEM was without (c) and with PEG (100x) (d). The initial PEG amount (0.4 g) is expressed on dry basis for the total mass of the polymer and drug (46.5 wt%). _____	43
Figure 2. Stability of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres _____	44
Figure 3. <i>In vitro</i> release profile of usnic acid from PLGA-microspheres _____	46
Figure 4. Cytotoxicity of free and microencapsulated usnic acid against HEp-2 cells, MTT test (mean of four wells). Usnic acid-loaded microspheres; unloaded microspheres; usnic acid in phosphate buffered saline (pH 7.4) _____	48
Figure 5. Evaluation of the antitumoral activity of the usnic acid against Sarcoma-180; free usnic acid (UA); usnic acid-loaded microspheres (ME-UA). _____	49
Figure 6. Histopathological analysis (H & E) tumor of mice treated with: control group (a); UA-loaded PLGA microspheres (b) and free usnic acid (c). The magnificence for tumor observation was 200x. _____	50

Figure 7. Histopathological analysis (H & E) liver of mice treated with: control group (a); UA-loaded PLGA microspheres (b) and free usnic acid (c). The magnificence for liver observation was 100x. _____ **51**

LISTA DE TABELAS**REVISÃO DA LITERATURA**

Tabela 1. Tipos de sistemas de liberação controlada _____ **07**

Tabela 2. Polímeros utilizados em sistemas de liberação controlada (Shishido, 2001) **08**

ARTIGO I

Table 1. Optimization of the formulation of UA-loaded PLGA-microspheres _____ **39**

Table 2. Evaluation of the influence of the surfactant concentration on the usnic acid entrapment efficiency into PLGA-microspheres _____ **40**

Table 3. Encapsulation efficiency of usnic acid into PLGA-microspheres (450 mg of polymer) _____ **44**

RESUMO

Na tecnologia de sistemas de liberação controlada, a microencapsulação de fármacos envolve processos complexos que permitem incorporar, a um princípio ativo, novas propriedades funcionais e “inteligentes”, como a liberação controlada em um meio específico ou sob condições apropriadas, tornando o produto final mais eficaz e menos tóxico. Poliésteres biodegradáveis, como derivados de ácido láctico e glicólico e seus copolímeros (PLGA), são frequentemente utilizados para a preparação de sistemas de liberação controlada na forma de micropartículas. O PLGA tem sido amplamente usado na formulação de microesferas que contêm agentes farmacêuticos tais como anticancerígenos. O ácido úsnico (AU), metabólito secundário oriundo de líquens, apresenta diferentes atividades biológicas e pode ser considerado um promissor agente quimioterápico. O presente trabalho tem como objetivo obter microesferas de PLGA contendo ácido úsnico extraído de *Cladonia substellata*, caracterizá-las físico-quimicamente, avaliar seu perfil de cinética de liberação *in vitro*, avaliar a citotoxicidade e a sua atividade antitumoral *in vivo*. As microesferas de PLGA foram obtidas pelo método de emulsão múltipla seguido da evaporação do solvente, com e sem a presença de polietilenoglicol (PEG) utilizado como tensoativo da emulsão simples. A morfologia, assim como, o tamanho das micropartículas foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura. O doseamento químico do AU extraído das microesferas de PLGA foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A cinética de liberação *in vitro* do AU foi realizada através da dissolução em tampão fosfato pH 7,4, simulando as condições fisiológicas do organismo. Em intervalos de tempo predeterminados as amostras foram coletadas, centrifugadas e armazenadas para posterior análise do conteúdo de ácido úsnico por CLAE. O estudo da citotoxicidade foi realizado em cultura de tecidos com células do tipo carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2). A avaliação *in vivo* foi realizada em camundongos albinos Swiss, utilizando o tumor sólido sarcoma-180. O implante de células ascíticas do tumor nos animais foi efetuado 24 horas antes de iniciar o experimento. A quimioterapia ocorreu durante o período de uma semana. No 8º dia, os animais foram sacrificados e os tumores foram dessecados e pesados a fim de determinar a inibição do tumor diante do tratamento quimioterápico. O fígado, baço e rins foram dissecados e submetidos à análise histopatológica.

As microesferas de PLGA contendo AU apresentaram formas esféricas com diâmetro médio de aproximadamente 7 μm . Estas partículas permaneceram estáveis durante 17 meses, no entanto, apresentaram uma redução no conteúdo de ácido úsnico de 105% para 61%. A cinética de liberação *in vitro* do ácido úsnico a partir das microesferas apresentou um perfil de liberação rápida na primeira hora do processo, seguida por uma liberação gradual do AU até atingir a exaustão ($92 \pm 0,04$) em 5 dias. A concentração de AU encapsulada necessária para inibir 50% do crescimento das células HEp-2, CI_{50} , foi de 14 $\mu\text{g/ml}$ e 12 $\mu\text{g/ml}$ para o AU livre. A microencapsulação do AU potencializou a atividade antitumoral em 21% com relação ao ácido úsnico não encapsulado. As microesferas de PLGA contendo ácido úsnico podem ser exploradas como alternativa para o tratamento da quimioterapia contra o câncer.

ABSTRACT

In the technology of controlled drug delivery systems, the microencapsulation of drugs involves complex processes, which can provide new functional and “intelligent” properties to a drug, for example the controlled delivery in a specific site of action or under appropriate conditions, giving as a result one more efficient and less toxic product. Biodegradable polyesters as lactic and glycolic acid derivatives and their copolymers (PLGA) are frequently chosen to the preparation of controlled drug delivery systems. PLGA has been widely used in the formulation of microspheres containing pharmaceutical agents such anticancer ones. Usnic acid (UA), secondary metabolite derived of lichens, shows different biological activities, and it can be considered a promising chemotherapeutic agent. The current study has as purposes the obtaining of PLGA microspheres containing usnic acid from *Cladonia substellata*: the physicochemical characterization of the UA loaded-microspheres obtained; the evaluation of its *in vitro* kinetics profile and finally the assessment of its cytotoxicity and *in vivo* antitumoral activity. The PLGA microspheres were obtained according to a modified multiple emulsion method followed by solvent evaporation, with and without the addition of polyethylene glycol (PEG). The microspheres morphology and size were evaluated by electron scanning microscopy. The usnic acid assay extracted from PLGA microspheres was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The *in vitro* kinetics of UA was accomplished under *sink* conditions using phosphate buffered solution (pH 7.4) as medium. At predetermined time intervals, samples were collected, centrifuged and the supernatant was stored to later analysis of UA content by HPLC. The cytotoxicity study was assessed in cell culture with cells type larynx epidermoide carcinoma (HEp-2). The *in vivo* evaluation of UA antitumoral activity was

performed with Swiss albino mice using the Sarcoma-180 solid tumor. The ascytic tumoral cells were implanted in animals 24 hours before the beginning of the experiment. The chemotherapeutic treatment occurred in a period of one week. At the eighth day, the animals were sacrificed and the tumors were dissected and weighted with the aim of verifying the tumor inhibition caused by the chemotherapeutic treatment. In addition organs such as liver, spleen and kidneys were excised and submitted to histopathological analysis. The PLGA microspheres containing UA showed spherical shape with mean diameter of 7 μ m. These microspheres kept themselves stable during a 17 months period, although their UA content decreased from 105% to 61%. The *in vitro* kinetics of UA from the microspheres showed an initially burst effects (35%) followed by a gradual release of UA to achieve 92% at the 4 day process. The required concentration of usnic acid to inhibit 50% of cell growth (CI₅₀) were found to be 12 and 14 μ g/ml for free and encapsulated, respectively. The microencapsulated usnic acid showed a 21% higher antitumoral activity when compared with the free usnic acid. The PLGA microspheres containing usnic acid can be explored as an alternative to the cancer therapy.

1. INTRODUÇÃO

Um grande desafio para qualquer país, no mundo atual, é tornar seus produtos mais competitivos. Entre as tecnologias com grande potencial neste sentido encontra-se o sistema de liberação controlada de fármacos, que envolvem processos complexos que permitem incorporar, a um princípio ativo, novas propriedades funcionais e “inteligentes”, tornando o produto final mais eficaz (Ré, 2000).

A tecnologia de sistemas de liberação controlada de fármacos surgiu nas décadas de 80 e 90, como um método comercialmente atrativo para administração de fármacos de forma controlada, aumentando a eficácia terapêutica e minimizando os efeitos tóxicos colaterais (Soppimath *et al.*, 2001; Zhuang *et al.*, 2002).

As formulações tradicionais, comprimidos ou injetáveis, apresentam após cada administração da formulação flutuações do fármaco nos níveis sanguíneos, que pode representar um nível tóxico (acima da concentração terapêutica) e um valor mínimo (abaixo do nível mínimo efetivo) (Weert *et al.*, 2000) (FIGURA 1).

Entre as tecnologias com grande potencial que podem ser utilizadas em variados setores e permitem um controle mais sofisticado de certas propriedades de uso de diferentes produtos, encontra-se a microencapsulação de fármacos. A microencapsulação é um método muito popular para a preparação de sistemas de liberação controlada. As micropartículas utilizadas para aplicações farmacêuticas são fabricadas pelo uso de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, para que possam ser eliminados do organismo, não apresentando toxicidade ou resposta inflamatória, tais como copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) aprovado pela vigilância sanitária americana *Food and Drug Administration* (FDA) (Dunn e Ottenbrite, 1991; Kang e Schwendeman, 2002). Estes sistemas microparticulados apresentam uma aplicação promissora na quimioterapia efetiva contra o câncer (Faisant *et al.*; Roullin, 2002).

O ácido úsnico, composto natural obtido de diversos gêneros e espécies de líquens, apresenta relevantes propriedades farmacológicas, com potencial antibiótico, antituberculostático, antiviral e elevada ação citotóxica, considerado um agente promissor na terapia contra o câncer (Cardarelli *et al.*, 1997; Cochietto *et al.*, 2002).

A presente tese foi constituído de uma revisão da literatura sobre sistemas de liberação controlada e as relevantes propriedades do ácido úsnico; um artigo submetido ao “*Journal of Microencapsulation*” e referências bibliográficas, utilizadas como fonte de pesquisa para organização deste trabalho. O objetivo deste trabalho foi fabricar e caracterizar físico-quimicamente microesferas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) contendo ácido úsnico, obtido da *Cladonia substellata*, de potencial ação antitumoral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Sistema de Liberação Controlada

Sistema de liberação controlada (SLC) ocorre quando um polímero, natural ou sintético, é combinado com um ou mais fármacos apresentando uma liberação que pode ser constante ou cíclica (por um longo período) podendo ser ativada pelo ambiente ou outro fator externo (Peppas, 1997; Torchilin, 2001; Husmann *et al.*, 2002). Portanto, pode-se dizer que o objetivo destes sistemas é manter a droga no nível sanguíneo constante, entre o máximo e o mínimo desejado da concentração terapêutica (FIGURA 1).

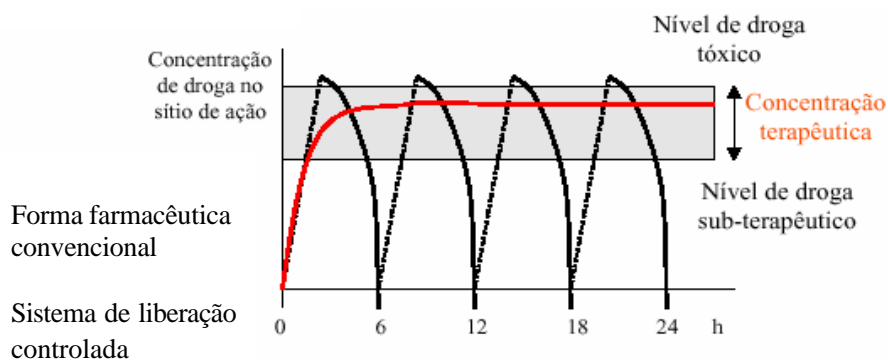


FIGURA 1- Nível do fármaco no sangue após administração em forma farmacêutica convencional ou em sistema de liberação controlada (Shishido, 2001).

No SLC o fármaco é administrado para alcançar o sítio de ação específico com a baixa dose necessária para atingir o efeito terapêutico, e para minimizar ou não apresentar os efeitos secundários e inconveniência ao paciente. Frequentemente, na medicação oral, como comprimidos ou cápsulas, um excesso grande de droga é administrado para assegurar o efeito terapêutico, ocasionando uma liberação imprevisível ou descontrolada. Nos sistemas de liberação controlada o aumento da eficácia e a redução da toxicidade da droga são atingidos através do controle da liberação no sítio de ação, e conseqüentemente, o controle do fármaco na absorção, nível sanguíneo, metabolismo e distribuição em células específicas (Rogers, 1982; Soppimath *et al.*, 2001).

O sistema de liberação ideal deve ser inerte, biocompatível, mecanicamente forte, confortável para o paciente, proteger a liberação acidental do fármaco, simples de administrar e remover, e fácil de fabricar e esterilizar (Peppas, 1997; Zhou *et al.*, 2002). Na Tab. 1 estão listados os sistemas de liberação controlada (lipossomas, nanocápsulas, nanoesferas, microcápsulas, microesferas, patches e bioadesivos) que podem ser administrados pelas três vias principais de administração (oral, transdérmica e intravenosa).

O desenvolvimento destes sistemas pode ser tão complexo quanto o desenvolvimento da própria droga. Existem três mecanismos primários pelos quais o princípio ativo pode ser liberado do sistema, podendo ocorrer isoladamente ou associados: difusão, erosão e sistemas ativados por solventes. Na difusão, a droga encapsulada por uma membrana polimérica ou suspensa numa matriz polimérica, a droga dissolve e difunde para fora do polímero. Na erosão, como no método de difusão, a droga é contida na membrana ou matriz polimérica, o polímero é degradado naturalmente, pela hidrólise da ligação éster liberando então o fármaco. Nos sistemas ativados por solvente são utilizadas membranas semipermeáveis, contendo um pequeno orifício e uma alta concentração de um fármaco, causando a entrada da água (fluidos biológicos) pela membrana, dessa maneira forçando a saída do fármaco pelo orifício por causa do aumento de pressão interna (Peppas, 1997; Husmann *et al.*, 2002).

Embora um grande sucesso tenha sido obtido com o uso de carreadores de droga, muitos problemas devem ser ainda superados antes da rotina clínica. Contudo, a terapia pelos carreadores oferece um potencial considerável para tratamento de doenças de difícil controle (Rogers, 1982). Vários sistemas de liberação controlada estão sendo utilizados clinicamente: Searle's Nitrodisc, Key's Nitro-Dur, Theo-Dur, Forest's Synchron, Geigy's Transderm's Nitro (nitroglicerina); Ciba's Transderm-Scop Septopal, Garamycin (gentamicina); AlpressTM LP, Minipress[®] XL (prazosin); Covera-HS[®], Calan[®] SR (verapamil); DynaCirc[®] CR (isradipina); Efidac 24[®] (clorofenilamina); Glucotrol[®] XL Sudafed[®] 24 Hour, Efidac/24[®] (pseudoefedrina); Procardia XL[®] (nifedipina); Volmax[®] (albuterol); Catapres-TTS[®] (clonidine); Estraderm[®],

Alora[®], Climaderm[®], Vivelle[®] (estradiol); NicoDerm[®] CQ e Clear NicoDerm (nicotina); Testoderm[®] TTS e Testoderm[®] (testosterona); Transderm Scöp[®] (escopolamina); Doxil[®] (dexorubucina); Viadur[®] (implante de acetato de leuprolide); Actisite[®] (tetraciclina); Ocusert[®] (pilocarpina); Progestasert[®] (progesterona); DynaCirc[®] CR (isradipina); Teczem[®] (enalapril e diltiazem); ZoladexTM; DecapeptylTM; ProstagTM (Linhardt, 1989; Verma e Garg., 2001; ALZA Corporation, http://www.alza.com/wt/how.zoo?page_name=products).

2.1.1. Sistemas Poliméricos

Polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares. Possuem unidades químicas ligadas por covalência, repetidas regularmente ao longo da cadeia, denominadas “monômeros”. Copolímeros são polímeros compostos de várias unidades monoméricas diferentes na cadeia polimérica (Kumar *et al.*, 2001).

A síntese de novos polímeros tem proporcionado um grande avanço na tecnologia farmacêutica, no desenvolvimento dos sistemas de liberação controlada de fármacos e nos dispositivos poliméricos. Na obtenção destes sistemas polímeros naturais biodegradáveis podem ser utilizados (Tab. 2).

Além dos polímeros de origem natural, polímeros sintéticos biodegradáveis (Tab. 2) também são utilizados tendo seu uso aumentado nas duas últimas décadas como: polímero de ácido láctico (PLA); polímero do ácido glicólico (PGA); e especialmente o copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA), que geram grande interesse devido a excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade. Estes polímeros também foram aprovados pela vigilância sanitária americana FDA para uso de sistemas de liberação controlada (Giunchedi *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2001; Hans e Lowman, 2002; Kang e Schwendeman, 2002).

TABELA 1- Tipos de sistemas de liberação controlada.

Sistemas de liberação controlada	Descrição
Lipossomas	Vesículas formados por camadas lipídicas com um núcleo aquoso (Kallinteri <i>et al.</i> , 2002).
Nanocápsulas	Apresentam uma fina camada polimérica com uma cavidade interna oca ou oleosa de 1 a 1000 nm (Soppimath <i>et al.</i> , 2001; Hans e Lowman, 2002).
Nanoesferas	Partículas esféricas constituídas por uma rede polimérica de 1 a 1000 nm (Pohlmann <i>et al.</i> , 2002).
Microcápsulas	Carreadores com fina camada polimérica do tipo reservatório de 1 a 1000 μm (Singh <i>et al.</i> , 2001).
Microesferas	Matriz polimérica densa onde o fármaco encontra-se distribuído de 1 a 1000 μm (Berkland <i>et al.</i> , 2001).
Patches ou bioadesivos	Dispositivos poliméricos não biodegradáveis de administração contínua do fármaco, atravessando as barreiras da pele até o sistema circulatório (Qvist <i>et al.</i> , 2002).

TABELA 2- Polímeros utilizados em sistemas de liberação controlada (Shishido, 2001).

Origem natural	Polímeros
Baseado em proteínas	Colágeno, albumina, gelatina
Polissacarídeos	Agarose, alginato, carragenana, ácido hialurônico, dextrana, quitosana, ciclodextrina
Origem sintética	
Poliésteres	Poli-ácido láctico (PLA), poli-ácido glicólico (PGA), copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA), policaprolactona, poli-dioxanona
Polianidridos	Poli-ácido sebácico, poli-ácido adípico, poli-ácido teraftálico
Poliâmidas	Poli-amino carbonato, poli-ácido amino
Baseado em fósforos	Poli-fosfatos, poli-fosfonatos

Os fatores que afetam a biodegradação dos polímeros são: estrutura e composição química; distribuição das unidades repetidas em monômeros; presenças de grupo iônico; presença de unidades inesperadas ou defeitos da cadeia; configuração da estrutura; peso molecular e distribuição do peso molecular; morfologia; condições do processo: local do implante; fatores físico-químicos e mecanismo de hidrólise. Polímeros biodegradáveis de origem natural ou sintética são degradados *in vivo*, por hidrólise enzimática ou não enzimática ou ambos processos, produzindo biocompatibilidade e metabólitos que serão eliminados pelas vias normais (Jain *et al.*, 2000; Faisant *et al.*, 2002).

A formulação mais comum destes materiais de poliésteres biodegradáveis, derivados de ácido láctico e glicólico e seus copolímeros, são a preparação de micropartículas de PLGA. Estes polímeros contêm ligações hidrolisáveis e a grande vantagem deles é a erosão por hidrólise não enzimática da ligação éster que acontece em meio aquoso, como os fluidos biológicos (Conti *et al.*, 1997; Mandal *et al.*, 2001).

2.1.2. Propriedades Físico-Químicas e Biológicas do PLGA

O copolímero de PLGA constituído de ácido láctico e glicólico tem sido amplamente usado nas formulações de microesferas biodegradáveis que contêm agentes farmacêuticos como anticancerígenos, hormônios esteroidais, proteínas, peptídeos e várias outras classes de fármacos (Yang *et al.*, 2000).

O ácido láctico é mais hidrofóbico que o ácido glicólico, conseqüentemente o PLGA é rico em ácido láctico e menos hidrófilo, absorve menos água, e degrada mais lentamente. Os polímeros de PLGA comercialmente disponíveis são caracterizados em termos da viscosidade intrínseca, que assim como, o ponto de fusão e a cristalinidade estão diretamente relacionados ao seu peso molecular (Jain *et al.*, 2000).

In vitro e *in vivo* o copolímero de PLGA sofre erosão em meio aquoso (biodegradação hidrolítica) pela quebra das ligações ésteres. O PLGA leva um período de semana a meses para degradação. Os ácidos láctico e glicólico são resultados da degradação do PLGA que é catalisado por prótons e podem alterar significativamente a diminuição do pH da forma de dosagem. O ácido láctico entra no ciclo do ácido tricarbóxico e é metabolizado, e subseqüentemente, eliminado do corpo como gás carbônico e água. O ácido glicólico é excretado inalterado no rim ou entra no ciclo do ácido tricarbóxico e eventualmente é eliminado do corpo como gás carbônico e água (O'Hagan *et al.*, 1998; Faisant *et al.*, 2002).

2.1.3. Sistemas Microparticulados

Micropartículas são partículas esféricas de tamanho entre 1 a 1000 μm . Microesferas e microcápsulas, coletivamente chamadas micropartículas, foram extensamente usadas na farmácia para sistemas de liberação controlada. O termo microcápsulas ou dispositivo do tipo de reservatório consiste, em geral, em uma camada de polímero que atua como um filme protetor, isolando o princípio ativo (FIGURA 2). O princípio ativo também pode estar disperso ou

dissolvido em uma matriz polimérica, formando nesse caso uma microesfera, sistema monolítico (Figura 2) (Linhardt, 1989; Mandal *et al.*, 2001; Youan *et al.*, 2001).

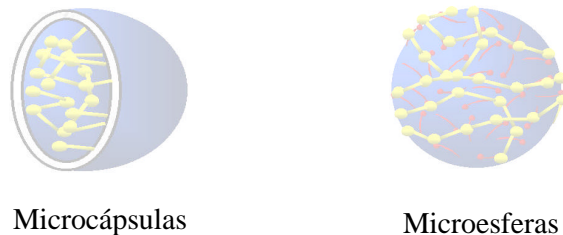


FIGURA 2- Micropartículas: microcápsulas ou microesferas.

A microencapsulação de fármacos, utilizando poliésteres alifáticos como PLA, PGA e principalmente PLGA, recebeu um grande interesse na formulação de sistemas de liberação controlada, porque eles oferecem várias vantagens comparadas com as formas farmacêuticas convencionais como: boa compatibilidade; fácil administração; possibilidade para controlar o fármaco por um longo período de tempo e completa erosão polimérica nas micropartículas, pela degradação dos fragmentos dos polímeros solúveis em água ou fluídos biológicos (Mandal *et al.*, 2001; Husmann *et al.*, 2002; Faisant *et al.*, 2002).

2.1.3.1. Aplicações Terapêuticas

Estes sistemas têm sido empregados com sucesso para grande variedade de fármacos incluindo: enzimas, hormônios, peptídeos, antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos, antiinflamatórios, analgésicos, quimioterápicos e agentes de diagnósticos (Blanco-Prieto *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Roullin *et al.*, 2002; Jang Fu *et al.*, 2002; Barrio *et al.*, 2003).

As microesferas de PLGA são utilizadas no tratamento e monitoramento de pacientes com câncer. Estes sistemas apresentam uma aplicação promissora na quimioterapia efetiva de câncer, através da quimioembolização. As microesferas com a superfície modificada são utilizadas como vetores, direcionando o fármaco ao local específico, o tumor (Wang *et al.*, 1997).

Ertl *et al.* (1999) fabricaram microesferas de PLGA encapsulando um agente anticancerígeno com baixa solubilidade em água, obtido da árvore oriental *Camptotheca acuminata*, o camptothecin. Eles verificaram a estabilidade do fármaco e o perfil cinético de liberação controlada a partir das microesferas de PLGA, indicando que essas propriedades podem reduzir a toxicidade local com eficácia prolongada, oferecendo novas perspectivas na quimioterapia. Hussain *et al.* (2002) obtiveram com êxito as microesferas de PLGA encapsulando em combinação e separadamente, um oligonucleotídeo e o 5-fluoracil, para potencializar a terapia contra o câncer.

Cleland *et al.* (1997) relataram que o sucesso do desenvolvimento de uma subunidade de vacina gp120 em microesferas de PLGA, para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), depende da otimização de vários parâmetros do processo. Uma única administração da vacina, incluindo duas ou mais formulações de microesferas de PLGA com gp120 (imunização primária) provêm três ou mais imunizações no período de 1 ano.

O'Hagan *et al.* (1998) avaliaram a habilidade das micropartículas de PLGA, como efeito adjuvante para induzir aumento da resposta imune, como consequência do encapsulamento de antígenos. O uso destes sistemas, por via oral encapsulando antígenos, fez com que as micropartículas biodegradáveis protegessem o antígeno administrado oralmente contra degradação enzimática, aumentando a captura dos antígenos pelas células M e placas do intestino (Fattal *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de microencapsulação de vacinas provê de uma alternativa viável para obtenção de melhor resposta imune, aumentando a eficácia da vacina, como efeito adjuvante, e diminuindo a multi dose e os horários de injeção (Youan *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002).

Yang *et al.* (2000) avaliaram a influência de fatores físico-químicos na formação de microesferas de PLGA contendo albumina de soro bovino (BSA). Observaram que a relação entre o perfil de liberação e a fase contínua é extremamente complicada, afetando a formação da superfície da microesfera, assim como a sua liberação.

Jalón *et al.* (2001) verificaram a distribuição das micropartículas de PLGA marcadas com rodamina, após aplicação tópica *in vitro*, em pele de porco. As fotomicrografias revelaram que as micropartículas fluorescentes penetraram pelo estrato córneo e alcançaram a epiderme, mostrando assim, serem promissores carreadores para administração tópica de fármacos.

A aplicação de micropartículas biodegradáveis não virais como vetores para terapia gênica é relativamente recente. Barrio *et al.* (2003) preparam micropartículas encapsulando DNA, por um novo processo, baseado na formação de emulsão múltipla pela injeção das fases através de regime turbulento (fluxo de 20 ml/min). Os pesquisadores observaram que o DNA pode ser eficientemente microencapsulado por esta nova técnica, preservando a integridade do plasmídeo durante todo processo de fabricação e permitindo a liberação do DNA por três semanas, após administração das micropartículas.

2.1.3.2. Vias de Administração e Biodistribuição

Como sistema de liberação controlada, as micropartículas são versáteis e podem ser administradas por diversas vias como: oral (Tinsley-Bown *et al.*, 2000); intramuscular (Zhou *et al.*, 2002); endovenosa (Cleland *et al.*, 1997; Zhuang *et al.*, 2002); subcutânea (Yeh *et al.*, 1995; Stureson *et al.*, 1999); intranasal (Fattal *et al.*, 2002; intraocular (Conti *et al.*, 1997); tópica (Jalón *et al.*, 2001) e implantes (Wang *et al.*, 2002).

As micropartículas podem ser utilizadas para manter o fármaco na circulação sanguínea, no nível terapêutico, por um longo tempo para obter melhor disponibilidade do fármaco (Torchilin, 2001). Quando administrada oralmente, elas são capturadas pelos macrófagos do sistema retículo endotelial e transportados para o trato gastrointestinal, concluindo uma ocorrência normal, dependendo do tamanho da partícula (Florence, 1997; Delie, 1998). Este sistema na forma de dosagem oral não sofre degradação extensa na área gastrointestinal e pode prover eficácia, dependendo do tipo de fármaco, por aproximadamente 24 horas, ao contrário das formas convencionais (Jain *et al.*, 1998).

Quando são administradas nas vias parenterais alternativas, como a via subcutânea, permanece no tecido subcutâneo ou são fagocitadas, dependendo do tamanho das partículas, geralmente, menores que 10 μm são capturadas pelos macrófagos e transportadas diretamente para os nódulos linfáticos (Yeh *et al.*, 1995; Sturesson *et al.*, 1999).

2.1.3.3. Outras Aplicações

A microencapsulação tem inúmeras outras aplicações industriais, entre elas, no setor agropecuário, na produção de pesticidas sintetizados quimicamente ou de natureza biológica; na indústria de alimentos com a microencapsulação de óleos essenciais para prevenir a oxidação e a perda de substâncias voláteis e controlar a liberação do aroma. Outro campo para o qual a microencapsulação vem trazendo grandes benefícios é o nutricional, em especial no caso do combate à deficiência mineral. O interesse industrial pela tecnologia de microencapsulação vem se desenvolvendo e deve crescer rapidamente nos próximos anos, porque ela pode levar a produtos diferenciados (Ré, 2000; Lamprecht *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000).

2.1.3.4. Métodos de Microencapsulação

Os métodos de microencapsulação de fármacos devem garantir que as seguintes exigências sejam cumpridas durante o processo de fabricação: (i) A estabilidade e atividade biológica da droga não deveria ser afetada durante o processo de encapsulação ou no produto final das microesferas; (ii) O rendimento das microesferas com tamanho exigido (até 250 μm , ideal < 125 μm) e a eficiência de encapsulação da droga deveriam ser altos; (iii) A qualidade das microesferas e o perfil de liberação da droga deveriam ser reprodutíveis dentro dos limites especificados; (iv) As microesferas deveriam ser produzidas como um pó e não exibindo agregação ou aderência (Jain, 2000).

2.1.3.4.1. Evaporação de Solvente

Processo de emulsão simples – Este processo envolve emulsificação de óleo em água (o/w) e é ideal para drogas insolúveis em água como, por exemplo, esteróides. O polímero é dissolvido em solvente orgânico, em seguida adicionado a uma fase aquosa contendo um emulsificante para obter uma emulsão o/w, formando mistura imiscível. A dispersão é então emulsificada, com agitação e homogeneizada a temperatura ambiente até evaporação de solvente. As microesferas sólidas são obtidas e então lavadas e coletadas por filtração ou centrifugação. Estas são então secas nas condições apropriadas ou são liofilizadas para dar o produto final microesferas injetáveis (Jain, 2000).

Processo de emulsificação múltipla – Este método envolve emulsificação de água/óleo/água (w/o/w) e é o melhor para encapsular drogas solúveis em água como peptídeos, proteínas e vacinas. Uma solução tamponada ou aquosa da droga é adicionada na fase orgânica que consiste do polímero e solvente adequado, com agitação para formar uma emulsão primária (o/w). Esta emulsão é adicionada sob agitação dentro de um volume maior de água com um tensoativo para formar a emulsão múltipla (w/o/w). A emulsão é homogeneizada a temperatura ambiente para remoção do solvente pelo processo da evaporação. As microesferas sólidas são obtidas e então lavadas e coletadas por filtração ou centrifugação. Estas são então secas nas condições apropriadas ou são liofilizadas para dar o produto final microesferas injetáveis. Parâmetros da formulação (natureza e concentração dos constituintes) e variáveis do processo (aparelhagem, tempo e velocidade de agitação, liofilização) afetam significativamente o produto final das microesferas e a liberação da droga (Jain, 2000).

2.1.3.4.2. Coacervação (Separação de Fase)

Este processo de coacervação inclui três etapas: (i) separação de fase da camada polimérica; (ii) adsorção do coacervato ao redor das partículas da droga; e (iii) solidificação das microesferas. Inicialmente, a substância a ser encapsulada é dispersa num líquido, no qual se tenha dissolvido o material envolvente (o polímero). Através de diferentes meios se produz uma diminuição da solubilidade do polímero dissolvido em forma de colóide no líquido de dispersão, separando-se em forma de gotículas, coacervação propriamente dita. O coacervato formado é solidificado e endurece através de medidas adequadas, como geleificação, reticulação ou por polimerização do filme líquido. As micropartículas são coletadas por lavagem, filtração ou centrifugação e são finalmente secas (Thomasin *et al.*, 1998).

2.1.3.4.3. Spray Drying

O spray drying é um método muito rápido, conveniente, de fácil escalonamento, envolve condições moderadas e depende menos do parâmetro de solubilidade da droga e do polímero. Este método produz microesferas com maior rendimento, reprodutibilidade das condições de produção e controle definido do tamanho de partícula.

Em princípio o poliéster biodegradável é dissolvido em um solvente orgânico volátil, a droga em forma sólida é dispersada na solução polimérica por um bico de nebulizador sob um determinado fluxo e pressão. A evaporação instantânea do solvente, forma as gotículas, resultando em microesferas de tamanho típico de 1 a 100 μm , dependendo das condições de atomização (Pohlmann *et al.*, 2002).

2.1.3.4.4. Microencapsulação *In Situ*

Os implantes fabricados de PLGA para sistema de liberação de uma variedade de classes de droga, não obtiveram muito sucesso comercial, primeiro pela dificuldade de administração, segundo incisão cirúrgica ou tipo de pellet, causando assim inconveniência aos pacientes.

Para melhorar a aceitação do paciente, um novo sistema de implante foi desenvolvido para administração por via intramuscular ou subcutânea como um líquido e subseqüentemente, solidificam *in situ* (Shahidi *et al.*, 1993).

O polímero é dissolvido pelo aquecimento em uma mistura de água com solvente biocompatível. A solução polimérica é esfriada abaixo da temperatura ambiente, a droga dissolvida é dispersada dentro da solução polimérica através de homogeneização. A droga é dissolvida em um solvente (como polietilenoglicol) que é miscível com o solvente do polímero e água. Este sistema polímero-solvente-droga tem uma consistência viscosa, mas permite ser injetado por via intramuscular ou subcutânea através de seringa e agulha convencional. Quando injetado, entra em contato com tampão aquoso (condições *in vitro*) ou fluido fisiológico (condições *in vivo*) resulta na formação do implante, um precipitado polimérico e forma uma matriz de gel que encapsula a droga (*in situ/in vitro* ou *in situ/in vivo*). O solvente de polímero dissipa e difunde para fora do sistema e a água difunde dentro da matriz polimérica. Devido à insolubilidade do polímero em água, ele precipita/coagula para formar um implante sólido *in situ*, do qual a droga é liberada de forma controlada (Jain, 2000).

Apesar de impedir a necessidade de qualquer cirurgia, estes sistemas apresentam uma série de desvantagens: a segurança do solvente usada é questionada; a injeção desses sistemas líquidos de implante e, subseqüentemente, a solidificação pode produzir uma matriz de implante não uniforme tendo consistência e geometria variável; e devido à formação da matriz o implante tem uma textura inconsistente, forma e tamanho, apresentando a liberação de droga variável e imprevisível (Jain *et al.*, 1998).

2.1.3.4.5. Outros Métodos de Preparação

Obtenção de Micropartículas sem Solvente Orgânico

As micropartículas obtidas sem utilização de solventes orgânicos são formadas por polímeros - imiscíveis em polímeros em solução aquosa. Microcápsulas de polietilenoglicol-metacrilato de dextrana-polietilenoglicol (PEG/Dex-Ma/PEG) foram formadas a partir da combinação destes polímeros em solução aquosa, pela técnica de emulsão múltipla, seguida de vigorosa agitação em vortex sob atmosfera de argônio. Esta técnica resultou na obtenção de micropartículas poliméricas bem definidas, sem presença de poros (Wichert *et al.*, 1990; Franssen *et al.*, 2002).

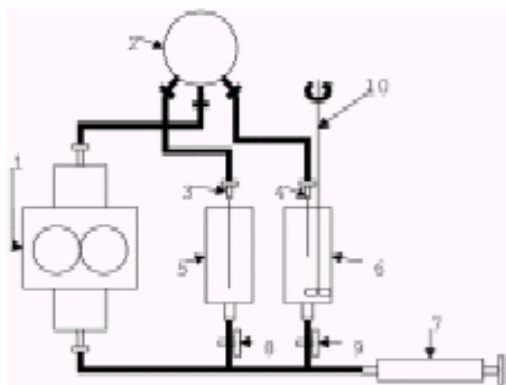
Jet Milling – Nova Técnica de Preparação de Micropartículas

A vantagem desse novo processo é preparar micropartículas sem uso de solvente orgânico, incluindo alta quantidade de droga encapsulada e o curto intervalo de tempo do processo de secagem. Esta técnica é a combinação de três etapas consecutivas: 1ª etapa: é a fundição do polímero, em béquer na chapa aquecedora, e adição do princípio ativo dissolvido ou dispersado. A temperatura utilizada depende da propriedade físico-química do polímero e da droga. Em seguida, transfere-se a suspensão polimérica para um tubo de congelamento e faz-se vários ciclos de aquecimento até obter uma baixa viscosidade; 2ª etapa: pulverizar em rotor com velocidade de 14 a 18000 rpm a suspensão congelada; 3ª etapa: as micropartículas são formadas após jato de nitrogênio a pressão reduzida (Jetmill) (Nykamp *et al.*, 2002).

Sistema de Máquina De Recirculação Total (TROMS)

O apparatus é composto por um sistema de uma bomba conectado a válvulas múltiplas com agulhas fixas e recipientes apropriados (FIGURA 3). As fases orgânica e aquosa são introduzidas em recipientes de teflon diferentes e são misturados com a ativação da bomba, que conecta as válvulas permanecendo assim, todo sistema fechado. Imediatamente, a fase orgânica é injetada

na fase aquosa com fluxo de 20 ml/min com agulha de diâmetro interno de 0,12 mm, circulando por 30 segundos para obter a emulsão simples (w/o). Em seguida, é injetada uma segunda fase aquosa em regime turbulento, resultando na formação da emulsão múltipla (w/o/w). A emulsão múltipla é homogeneizada com agitador de hélice para evaporar o solvente orgânico. As micropartículas são lavadas três vezes com água destilada e centrifugadas (Barrio *et al.*, 2003).



1. Sistema de bombas
2. Válvulas múltiplas
- 3 e 4. Agulhas fixas
- 5 e 6. Recipientes das substâncias
7. Seringa de vidro e teflon
- 8 e 9. válvulas que conectam os recipientes a bomba
10. Homogeneizador de hélice

FIGURA 3- Esquema de TROMS (Barrio *et al.*, 2003).

2.2. Líquens

Líquens são seres formados pela relação simbiótica entre fungos e algas, parceiros definidos como micobionte e fotobionte, respectivamente. Os líquens, primeiros colonizadores do habitat terrestre, são modestos e capazes de crescer e espalhar-se sobre as pedras e em troncos de árvores e arbustos (Nash, 1996; Cochietto *et al.*, 2002).

A morfologia do talo liquênico é bastante peculiar, onde o micobionte e o fotobionte se dispõem em camadas sucessivas. Os líquens produzem metabólitos secundários intra e extracelulares, classificados de acordo com a sua localização no talo. Os produtos intracelulares são os carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas, freqüentemente solúveis em água e podem ser extraídos com água quente. Os produtos extracelulares são sintetizados pelas hifas e depositados na superfície como cristais ou pó amorfo. Os metabólitos secundários alifáticos e

fenólicos, produzidos pelos líquens, são em sua maioria extracelulares e insolúveis em água, sendo comumente extraídos por solventes orgânicos. Os produtos extracelulares são os responsáveis pela maioria dos benefícios advindo dos líquens (Hale, 1983; Nash, 1996).

Substâncias liquênicas são formadas por unidades fenólicas, que se originam a partir de ácidos carboxílicos policetônicos, derivados do ácido acético. Através da ciclização do tipo floroglucinol formam-se os ácidos úsnico e iso-úsnico e da ciclização tipo orselínica tem-se a formação dos depsídeos, depsidonas e dibenzofuranos (Vicente, 1975; Takani *et al.*, 2002).

Os derivados dibenzofuranos são compostos liquênicos de baixo peso molecular, o protótipo da classe é o ácido úsnico que vem sendo extensivamente estudado (Müller, 2001).

2.3. Ácido Úsnico

2.3.1. Ocorrência Natural do Ácido Úsnico

O ácido úsnico, metabólito de origem liquênica é derivado do dibenzorufano (2,6-diacetil-7,9dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3-(2H,9bH)-dibenzofurano; $C_{18}H_{16}O_7$) (FIGURA 4). Apresenta-se como prismas ortorrômnicos amarelo da cristalização com acetona, ocorrendo na natureza em duas posições enantioméricas que diferem na orientação do grupo metil localizados na posição 9b, nas formas D e L. O seu ponto de fusão é em torno de 204°C. Apresenta caráter hidrofóbico, sendo insolúvel em água, parcialmente solúvel em etanol e facilmente solúvel em acetona, acetonitrila, diclorometano, acetato de etila e misturas de solvente orgânico como dimetilsulfóxido/metanol (Index Merck, 1995; Muller, 2001; Cochietto *et al.*, 2002).

O ácido úsnico é distribuído amplamente em espécies de *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Evernia*, *Parmelia* (Parmeliaceae), *Cetraria*, *Lechona* e outros gêneros de Líquens (Venkataramana e Krishna, 1992; Ingólfssdóttir, 2002).

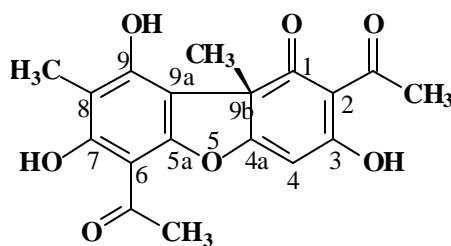


FIGURA 4- Estrutura química do ácido úsnico (Ingólfssdóttir, 2002).

2.3.2. Química e Biossíntese do Ácido Úsnico

O ácido úsnico ocorre em duas formas enantioméricas, dependendo da projeção angular do grupo metila do carbono quiral na posição 9b (Ingólfssdóttir, 2002). A configuração absoluta do (+)- ácido úsnico determinada por raio X foi analisada. As três hidroxilas presentes na molécula tem um caráter ácido elevado (pK_a 4,4) devido ao efeito indutivo do grupo cetona. A acidez do grupo fenólico na posição 9-OH (pK_a 8,8) é aumentada pelo efeito indutivo do grupo *para*-acetil localizado na posição 6, enquanto o fenólico 7-OH é fracamente ácido devido a ligação intramolecular unindo o hidrogênio ao grupo 6acetil (FIGURA 4) (Sharma e Jannke, 1966).

A biossíntese do ácido úsnico proposta por Taguchi *et al.* (1969) segue a via do acetato polimalonato para formar metilfloroacetofenona, com incorporação do grupo metil ocorrendo antes da aromatização. Subseqüentemente, envolve etapas de oxidação fenólica estereo-específica acoplando duas moléculas de metilfloroacetofenona resultando em ácido úsnico hidratado e finalmente, ocorre à desidratação que conduz a formação da ligação éster (FIGURA 5).

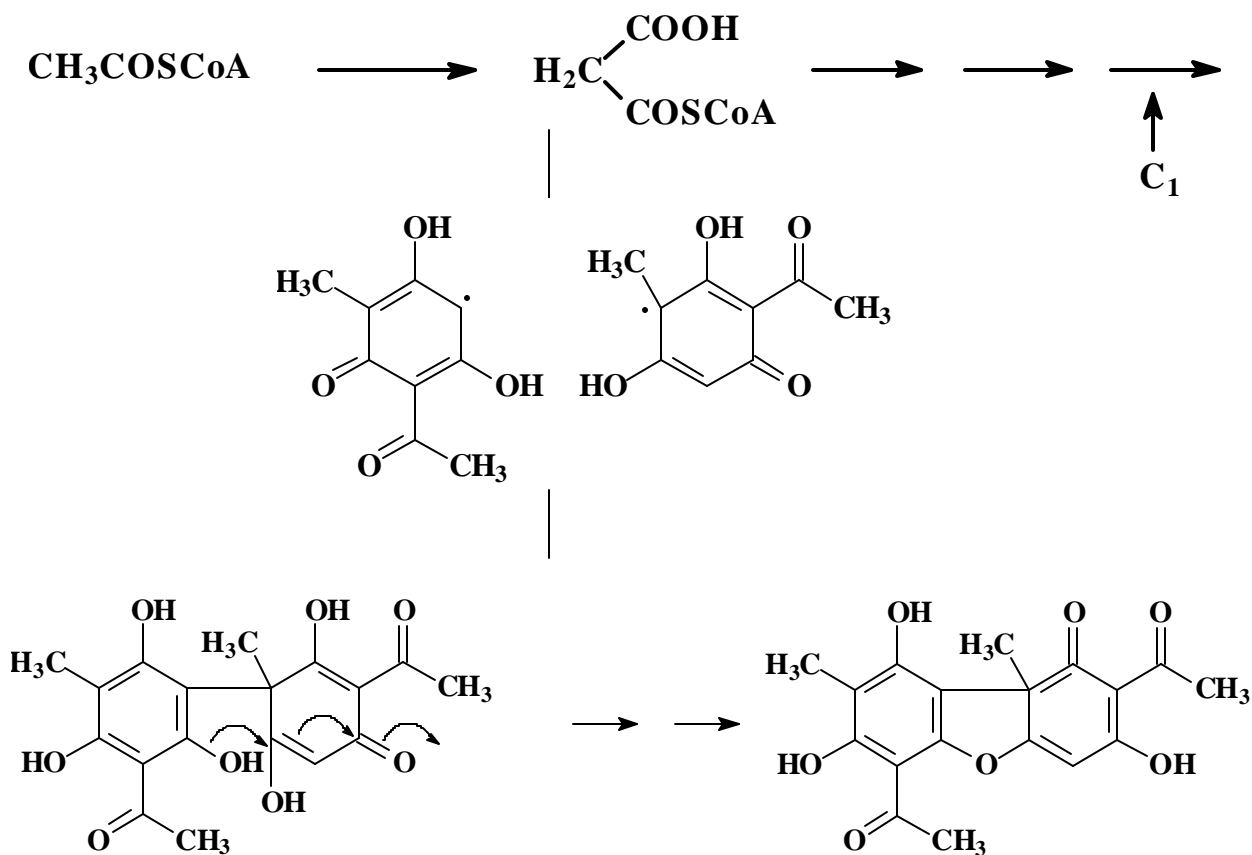


FIGURA 5- Biossíntese do ácido úsnico proposta por Taguchi *et al.* (1969).

2.3.3. Farmacocinética do Ácido Úsnico

A farmacocinética do ácido úsnico foi estudada em coelhos machos normais, após administração da dose de 5 mg/kg por via intravenosa. A extração do ácido úsnico das amostras plasmáticas foi realizada com metanol, usando diclofenaco de sódio como padrão interno. As amostras foram analisadas através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a 280 nm e sensibilidade de 0,005 a.u. Os parâmetros farmacocinéticos descrevem um modelo de três compartimentos que apresenta um tempo de meia vida significativa, cerca de 10 horas, o clearance total de 12 ml/h/kg e AUC foi de 428,51 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}/\text{h}$ (Venkataramana e Krishna, 1992; Venkataramana e Krishna, 1993).

2.3.4. Aplicações Terapêuticas

De acordo com a literatura o ácido úsnico apresenta uma ampla atividade terapêutica com potencial antibiótico, antitumoral, antituberculostático, antiviral, antiinflamatório, analgésico, antipirético, antimitótico, antimicótico, antiproliferativo, antifúngico, antiprotozoário e antihistamínico. Atuando também como potencial agente inibidor de enzima, promissor agente quimioterápico, no tratamento e prevenção de placa dentária, como fotoprotetor de irradiações ultravioleta e na biomonitoração ambiental (Venkataramana e Krishna., 1992; Cardarelli *et al.*, 1997; Caviglia *et al.*, 2001; Ingólfssdóttir *et al.*, 2002; Rancan *et al.*, 2002; Cochietto *et al.*, 2002).

2.3.4.1. Atividade Antibiótica

A principal propriedade biológica do ácido úsnico é a sua atividade antibiótica, assim como outros líquens derivados do ácido vulpínico, ácidos alifáticos, ácidos alifáticos, depsídeos e depsídonas (Lawrey, 1986; Cochietto *et al.*, 2002).

Lauterwein *et al.* (1995) testaram a atividade dos ácidos úsnico e vulpínico frente a várias bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Os referidos ácidos não apresentaram efeitos contra as bactérias Gram-negativas e foi verificado que o ácido vulpínico foi menos ativo que o ácido úsnico.

A atividade do ácido úsnico contra o *Mycobacterium aureum*, avaliada por Ingólfssdóttir *et al.* (1998), exibiu uma concentração mínima inibitória (CMI) maior que os fármacos utilizados como referência, isoniazida, rifampicina e estreptomina. Estes resultados estão de acordo com Venkataramana e Krishna (1992), os quais reportaram que ambas formas enantioméricas do ácido úsnico inibiram o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium tufo* *in vitro*, com uma baixa concentração.

2.3.4.2. Atividade Antiinflamatória, Analgésica e Antipirética

As atividades analgésica e antipirética do ácido úsnico, obtido da espécie *Usnea diffracta*, exibiram uma atividade significativa, contra hipertemia induzida por lipopolissacarídeos em camundongos (Okuyama *et al.*, 1995).

Estudos realizados por Vijayakumar *et al.* (2000) compararam a atividade antiinflamatória do ácido úsnico com a do ibuprofeno, nos tratamentos oral agudo e crônico testado contra o carregininas, induzindo edema de patas em ratos. O resultado indicou a dose dependente com eficiência significativa do composto natural, comparado com a droga de referência padrão, o ibuprofeno.

2.3.4.3. Atividade Antiviral

Um composto a base de sulfato de zinco e ácido úsnico foi utilizado como terapia adjuvante, após tratamento radio cirúrgico, de infecções genitais causadas pelo Papiloma Vírus Humano (HPV). Scirpa *et al.* (1999) avaliaram a eficácia e segurança da administração intravaginal deste composto, considerando um ótimo melhoramento no tratamento da infecção causada por HPV, favorecendo o processo de reconstituição do epitélio com poucos efeitos colaterais e uma boa complacência do paciente.

Fournet *et al.* (1997) verificaram a administração do ácido úsnico pelas vias oral, subcutânea e intralesional em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis*. O tratamento pelas vias oral e subcutânea não produziu nenhum efeito, mas pela via intralesional, apesar de exibir uma interessante atividade na redução do tamanho da lesão, foi considerado menos potente do que o composto referência, glucantamina.

Considerado uma molécula com potencial interessante na terapia do câncer devido suas ações antimitótica e antiproliferativa, o ácido úsnico apresentou uma potente inibição na proliferação do *Poliomavirus* (Py) em camundongos. Estudos realizados por Campanella *et al.* (2002) na proliferação do Py em células de linhagem de fibroblastos de camundongos (3T6),

mostraram que o ácido úsnico foi efetivo na replicação do DNA viral, sendo uma consequência indireta da drástica regressão da transcrição do RNA. Ressaltando que a replicação viral foi severamente, inibida em concentrações não citotóxicas do ácido úsnico. Contudo, fez-se necessário a exposição das células por um longo período de tratamento em contato com o fármaco.

2.3.4.4. Atividade Citotóxica e Antitumoral

Estudos realizados por Correché *et al.* (1998) demonstrou que alterações na estrutura química da molécula do ácido úsnico, avaliando como parâmetro principal às ligações intramoleculares de hidrogênio da molécula, observaram modificações na atividade antimicrobiana e uma maior citotoxicidade, inibindo o crescimento da cultura de linfócitos. Lodetti *et al.* (2000) avaliaram a ação citotóxica do ácido úsnico, sozinho ou como componente de uma formulação oral contra cárie, em células de câncer de epidermóide humana (KB), queratinócitos gengival e fibroblastos de biopsia humana. Em ambas avaliações não apresentaram nenhum sinal de citotoxicidade, através das determinações feitas pelos testes de MTT [brometo(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), vermelho neutro e vermelho neutro modificado.

A capacidade inibitória do ácido úsnico frente a três tipos de linhagem de células tumorais foram estudadas por Cardalleri *et al.* (1997). A inibição da proliferação celular não depende apenas da concentração do ácido, mas também do tempo de exposição das células em contato com agente inibidor. O efeito inibitório foi encontrado significativo nas concentrações de 0.5 a 1.0 µg/ml, ocorrendo 46 h após exposição.

Na quimioprevenção do câncer o ácido úsnico obtido de líquens apresentou um potencial antitumoral maior que o ácido comercial. Isolado da *Usnea longissima* mostrou um potente

efeito inibitório (DL_{50} 1.0 $\mu\text{g/ml}$) contra o vírus Epstein-Barr, o ácido úsnico comercial foi pouco ativo com DL_{50} 5.0 $\mu\text{g/ml}$ (Okuyama *et al.*, 1995).

2.3.5. Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação exposto para o ácido úsnico continua sendo especulativo. Contudo, Al-Bekari *et al.* (1991) observaram uma significativa redução do conteúdo de RNA no fígado de rato, na terapia com várias doses deste ácido. Propondo assim, a ação do ácido úsnico interferindo na síntese do RNA.

Cardarelli *et al.* (1997) indicaram que o mecanismo de ação do ácido úsnico é similar em células de animais e vegetais, provavelmente, atua interferindo em algum passo importante na divisão celular, comum a diferentes tipos de células.

O ácido úsnico tem apresentado características semelhantes ao 2,4 dinitrofenol (DNP), um clássico desacoplador da fosfolirização oxidativa, atuando ao nível de mitocôndrias de fígado de rato (Abo-Khatwa *et al.*, 1996).

Okuyama *et al.* (1995) sugerem que o mecanismo de ação do ácido úsnico, para a atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética, atua inibindo a síntese das prostaglandinas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo principal deste trabalho consiste em obter microesferas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA), contendo ácido úsnico de *Cladonia substellata* visando uma possível aplicação biológica.

3.2. Específicos

- ❖ Obter e caracterizar físico-quimicamente as microesferas de PLGA contendo ácido úsnico;
- ❖ Avaliar seu perfil de cinética de liberação *in vitro*, a partir das microesferas de PLGA;
- ❖ Avaliar a atividade citotóxica *in vitro*, frente à cultura de células de carcinoma epidermoíde de laringe (HEp-2), do ácido úsnico na sua forma livre e encapsulada, em microesferas de PLGA;
- ❖ Avaliar a atividade antitumoral *in vivo*, contra o tumor sarcoma –180, do ácido úsnico na sua forma livre e encapsulada, em microesferas de PLGA.

**PROPRIEDADES *IN VITRO* E *IN VIVO* DO ÁCIDO ÚSNICO
ENCAPSULADO EM MICROESFERAS DE PLGA**

Trabalho submetido ao “*Journal of Microencapsulation*”

***IN VITRO* AND *IN VIVO* PROPERTIES OF USNIC ACID ENCAPSULATED INTO
PLGA-MICROSPHERES**

Roseane M. Ribeiro-Costa^{1,2}, Antonio J. Alves², Noemia P. Santos¹, Silene C. Nascimento⁴,
Eugênia C. Pereira³, Nicácio H. Silva³, Nelly K. Honda⁵, Nereide S. Santos-Magalhães^{1,3*}

¹Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
(LIKA), Recife, PE, Brazil

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Químico-Farmacêutica
(LTQF), UFPE

³Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, UFPE

⁴Departamento de Antibióticos, Setor de Farmacologia, Laboratórios de Cultura de Células e
Cancerologia Experimental, UFPE

⁵Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Departamento de Química, Laboratório
de Produtos Naturais, MS, Brazil

Keywords: Usnic acid, *Cladonia substellata*, PLGA microspheres, cytotoxicity, antitumour
activity

*Corresponding author

Dr. Nereide Stela Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Grupo de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

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

50670-901, Recife, PE, Brazil

Tel: +55-081-32718587; fax: +55-081-23718485

E-mail: nssm@ufpe.br

Abstract

Microparticles will probably play a promising role in a near future of chemotherapy. These polymeric delivery systems are capable of maximizing the therapeutic activity while reducing side effects of anticancer agents. Usnic acid (UA) is a secondary metabolite produced by lichens, which exhibits an antitumour activity. In this study PLGA-microspheres containing usnic acid from *Cladonia substellata* were prepared by the double emulsion method with or without PEG as stabilizer. The morphology of microspheres was examined by optical and scanning electron microscopy. The *in vitro* kinetic profile of usnic acid-loaded microspheres was carried out by dissolution testing. The usnic acid content was analysed by HPLC. The cytotoxicity of free and encapsulated usnic acid was evaluated against HEP-2 cells using the MTT method. The antitumour assay was performed in mice against Sarcoma-180 tumour (UA 15mgkg⁻¹ weight body/day) during 7 days. Animals were then sacrificed and tumour and organs were excised for histopathological analysis. Microspheres presented a smooth spherical surface with a mean diameter of 7.02 ± 2.72 µm. The usnic acid encapsulation efficiency was about 100% (UA 10mg/460mg⁻¹ microspheres). A maximum release of 92% was achieved at the fifth day of kinetic process. The IC₅₀ values for free and encapsulated usnic acid were 12 and 14 µg/ml, respectively. The encapsulation of usnic acid into microspheres promoted an increase of 21% in the tumour inhibition as compared with the free usnic acid treatment. In summary, usnic acid was efficiently encapsulated into PLGA-microspheres and the microencapsulation improved its antitumour activity.

Introduction

Drug delivery systems are versatile pharmaceutical dosage forms with a promising future (Verma and Garg, 2001). Microencapsulation is a very common method for preparing controlled release systems such as carriers for drugs and vaccines (Jain *et al.*, 2000; Lamprecht *et al.*, 2000; Barrio *et al.*, 2003). The use of microspheres has a substantial appeal to enhance the therapeutic efficacy of drugs. Actually, alternative microparticulated carriers have been developed aiming to decrease the toxic effects of anticancer compounds toward normal tissues and to increase their efficiency against tumours (Singh and Udupa, 1997; Wang *et al.*, 1997; Roullin *et al.*, 2002; Le Ray *et al.*, 2003).

Biodegradable polyesters such as copolymers of lactic and glycolic acid (PLGA) are attractive biomaterial for pharmaceutical and medical applications. They have widely been used as carriers in controlled-release systems due to their excellent biocompatibility and biodegradability properties (Kumar *et al.*, 2001). Such copolymers contain hydrolysable chemical bonds, which can be degraded by non-enzymatic hydrolysis of the ester backbone that takes place in aqueous environment, such as body fluids. Biodegradation of PLGA occurs by homogeneous bulk erosion, the polymer chains are cleaved by hydrolysis until producing water soluble fragments, followed by monomeric acids, which are metabolized and eliminated from the body as CO₂ (O'Hagan *et al.*, 1998).

The usnic acid (UA) is a low-molecular weight dibenzofuran derivative [2,6-Diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3[2H,9bH]-dibenzo-furandione] produced by some lichen species (Müller, 2001). Usnic acid presents as a yellowish cortical pigment and occurs in two enantiomeric forms, which differ in the orientation of the methyl group located in the stereogenic centre at the 9b position (Cocchietto *et al.*, 2002). Usnic acid is a product from the secondary metabolism of the fungal partner and it is widely distributed in species of *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia* and *Parmelia* (Ingólfssdóttir, 2002). Since its first isolation in 1844, usnic acid has become the most extensively studied lichen metabolite and one of the few

that is commercially available. Usnic acid exhibits several biological and pharmacological properties such as antimicrobial activity against human and plant pathogens, antiviral (Campanella *et al.*, 2002), antiprotozoal, antiproliferative, anti-inflammatory and analgesic activity. In addition usnic acid presents cytotoxicity and antitumour activity (Cocchietto *et al.*, 2002).

Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid were evaluated by Al-Bekairi *et al.* (1991) after oral administration in mice models. It was reported that usnic acid induced a depletion of polychromatic cells when administered at high doses. A significant reduction of the RNA content in rat liver was verified and it was suggested that usnic acid might act by interfering with RNA synthesis in a completely reversible way. These results were confirmed by a recent *in vitro* study of the usnic acid effect on the proliferation of mouse polyomavirus (Campanella *et al.*, 2002). Usnic acid revealed to be a potent inhibitor of the viral DNA synthesis and its action was most likely exerted through repression of RNA transcription. (+)-Usnic acid also exhibited a higher antitumour inhibition against tumour induced by Epstein-Barr virus and this effect appears to be somewhat stronger than that one exhibited by the (-)-enantiomer (Cocchietto *et al.*, 2002).

Nevertheless, practical use of usnic acid in therapy has been rather limited due to its poor solubility in water. In particular, the intramolecular hydrogen bonds contribute to the lipophilic nature of usnic acid and its lipophilicity is deeply linked to its cytotoxic effect, which can be attributed to the β -triketone moiety present in the molecule (Takai *et al.*, 1979).

The challenges of biomedical applications of usnic acid namely hepatotoxicity, water insolubility, and consequently low efficacy, can be surpassed by suitable pharmaceutical technology such as drug delivery systems. In this framework, for the first time usnic acid from *Cladonia substellata* was encapsulated into microspheres. The goal of the present work is to develop PLGA-microspheres containing usnic acid and to evaluate their *in vitro* kinetic profile and cytotoxicity, as well as their *in vivo* antitumour activity.

Materials and Methods

Materials

The microspheres were prepared with the poly (D,L-lactic -co-glycolic) acid (PLGA, 50/50, inherent viscosity 0.44 dL g^{-1}), which was purchased from Birmingham Polymers (Alabama, USA). The emulsifiers poly vinyl alcohol (PVA, m.w. 13 000-17 000), polyethylene glycol (PEG, m.w. 4000) and poly vinyl pyrrolidone (PVP, MW 40 000), the cryoprotector threalose and standard usnic acid (UA) were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Poloxamer (Pluronic[®] F68) was generously supplied by ICI (France). Usnic acid (UA) was extracted from *Cladonia substellata*, purified and characterized at the Chemistry Laboratory of the Federal University of Mato Grosso do Sul (Brazil). HPLC grade methanol, analytical grade solvents and reagents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Cell culture supplies were obtained from GIBCO (New York, USA). Larynx epidermoid carcinoma cell line (HEp-2, Animal and Human Cell Catalogue, Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil) were subcultured and seeded at 10^5 cells mL^{-1} in 96 well plates in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) containing 25mM glucose, supplemented with 10% of fetal bovine serum and 1% nonessential amino acids.

Preparation of usnic acid-loaded PLGA microspheres

The microspheres were prepared by a w/o/w multiple emulsion technique. Initially, PLGA (450 mg) and usnic acid (10 mg) were separately dissolved in methylene chloride (10 ml and 2 ml, respectively). The organic solution containing usnic acid was then added to the polymeric solution and emulsified with deionized water (5 ml) with or without PEG (5 mg). The simple emulsion (w/o) was generated by mechanical agitation (ultra-turrax T25, IKA, Germany) at 8000 rpm for 1 minute in an ice bath. Afterward this simple emulsion was added to a continuous phase, constituted of 50 ml aqueous solution of PVA (0.5%, w/v) and emulsified at 8000 rpm for 30 seconds, resulting in a multiple emulsion (w/o/w). The mixture was maintained under agitation at 400 rpm (4 h) leading to the solvent evaporation and consequently the microspheres

formation by hardening the polymeric wall of the particles. The microspheres were then isolated by centrifugation (Kubota KN-70 centrifuge, Japan) at 3000 rpm for 5 minutes and washed three times with deionized water to remove the excess of emulsifiers. Finally, the microspheres were recovered by either filtration or lyophilisation procedures. When filtered through 0.45 μm (Millipore[®]) membrane, the residue was left overnight in a desiccator and the microspheres were obtained as a dry powder. Before lyophilisation, microspheres were previously dispersed with 1.0% (w/v) threalose aqueous solution, frozen at -80°C overnight. The lyophilizer (EZ-DRY, FTS System, New York, USA) operated at 200 bars during 16 hours. Unloaded microspheres were prepared under the above described conditions. The storage of PLGA-microspheres was performed at $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in a vacuum desiccator.

Several batches of microspheres were developed by modifying the amount of polymer, drug and emulsifiers, and also by evaluating the final recovering process of microspheres. Initially, formulations were prepared with Synperonic[®] F68 or poly (vinyl pyrrolidone) (PVP) as emulsifiers for the double emulsion formation. Following, microspheres were prepared with PVA at concentrations varying from 0.3 to 1.0% (w/v) in an attempt to obtain stable formulations. The influence of the presence of PEG in the simple emulsion on the stability of microspheres was also investigated. The microspheres manufacturing process was followed by optical microscopy in order to select the more stable product.

Characterisation of usnic acid-loaded PLGA microspheres

Morphological analysis

The manufacturing process of microspheres was followed by optical microscopy (Olympus CH-2 microscope, USA) for evaluating the formation, homogeneity, and surface properties of particles. The morphological characteristics of the microspheres were analysed by scanning electron microscopy (SEM) using an electron microscope (JSM-T200, JEOL, Japan). A sample

of microspheres was suspended in distilled water to obtain a homogeneous suspension and placed in a glass surface, which was fixed on a metallic support with carbon-gluе. After drying at 37°C, samples were directly coated with colloidal gold using a sputter module in a high-vacuum evaporator (JFC-1100, JOEL, Japan). Then microspheres were examined and particle size was measured.

Stability of usnic acid-loaded microspheres

The stability of the usnic acid encapsulated into PLGA microspheres was evaluated in a period from 7 to 510 days aiming to the establish formulation durability. The usnic acid content was analysed by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method bellow described.

Usonic acid encapsulation efficiency

The usnic acid loading into microspheres was determined by HPLC after extraction of usnic acid from microspheres. Samples of microspheres (13.8 mg, corresponding to 0.3 mg of usnic acid) were diluted with 1 ml dimethylsulfoxide (DMSO) under ultrasonic agitation for 5 minutes. Then, the volume (5 ml) was completed with methanol/phosphate buffered solution pH 7.4 (70:30 v/v). An aliquot of this solution was diluted to a theoretical concentration of 6 µg ml⁻¹, filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore®), and the usnic acid content was analysed using the HPLC method as described.

Usonic acid assay by HPLC method

A variant of the method proposed by Venkataramana and Krishna (1992) was developed and validated to quantify the usnic acid content in PLGA microspheres. The computer assisted HPLC system (Hewlett Packard, HP-1100, USA) is composed by a quaternary pump, degasser system,

UV/VIS detector and manual injector with a 20 μl loop. The chromatographic run was performed using a Bondapack C_8 column (10 μm particle size, 125 \AA , 300 mm \times 3.9 mm I.D., Waters, USA) and a mobile phase of HPLC grade methanol/20mM phosphate buffered solution pH 7.4 (70:30, v/v). Sample aliquots (20 μl) were injected and eluted with the mobile phase at a flow rate of 1.5 ml min^{-1} . The usnic acid peak was verified at a wavelength of 280 nm (0.005 a.u.f.s) with a retention time of about 3 min. The amount of usnic acid into microspheres was determined through the standard calibration curve. Usnic acid standard calibration curve was prepared for concentrations varying from $1\mu\text{g.ml}^{-1}$ to $10\mu\text{g.ml}^{-1}$. A stock standard solution (1mg.ml^{-1}) was prepared with 10 mg of the standard usnic acid in 200 μl of DMSO and 5 ml of the mobile phase, under ultrasonic agitation for 5 minutes. The volume was then completed to 10 ml with mobile phase and diluted to the desired concentration. Each experiment was performed in triplicate.

In vitro kinetic release of usnic acid-loaded PLGA-microspheres

The *in vitro* release profile of usnic acid from microspheres was determined according to Rafati *et al.*, 1997. A sample of 25 mg of the usnic acid-loaded PLGA microspheres (0.54 mg of usnic acid) were suspended in 54 ml of 20 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The tubes were incubated at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ and shaken horizontally at 180 rev.min^{-1} . At predetermined time intervals, 2 ml aliquots of the dissolution medium were withdrawn and centrifuged at 2800 rpm for 5 min in order to separate any microspheres present in the sample. The supernatant was removed and the amount of usnic acid was measured by the HPLC method as above described. Assays were performed in triplicates and results were expressed in percentage of the mean values and their standard deviation.

Cytotoxicity of usnic acid-loaded microspheres

The cytotoxic effect of free and encapsulated usnic acid was evaluated on cells of larynx epidermoid carcinoma (HEp-2) by the colorimetric technique with 3-(4,5-dimethylthiazole -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Mosmann, 1983 modified by Alley *et al.*, 1988). Cell suspensions were diluted to 10^5 cells.ml⁻¹ and aliquots of 220 µl of such suspension were seeded on 96 well plates. After 24 hours, samples of free and encapsulated usnic acid were placed in contact with HEp-2 cells at different concentrations ranging from 2.5 µg.ml⁻¹ to 15 µg.ml⁻¹. Usnic acid solution was prepared as the standard solution as previously described. After 72 h incubation of cells, a solution of MTT (25 µl.well⁻¹) was added and plates were incubated for 2 hours. The supernatant was removed and DMSO (100 µl.well⁻¹) was added to dissolve the formazan crystals. Plates were read at 590 nm. The maintenance of cells and all experiments were carried out at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. Unloaded microspheres and standard usnic acid were used at the same sample concentrations as negative and positive controls, respectively. Each dosage group was assayed in quadruplicate. Results are expressed as the mean values of viable cells.

Antitumour activity of usnic acid-loaded microspheres

The *in vivo* antitumour activity of UA-loaded PLGA microspheres was evaluated in mice against Sarcoma 180 tumour. Tumoural ascytic cells (5×10^6 cells ml⁻¹ suspension) were subcutaneously inoculated into male Swiss mice (32-41g body weight, 45-60 days old). Chemotherapy started after 24 h of tumour implantation by intraperitoneal injections of free usnic acid or usnic acid-loaded microspheres at a dose of 15 mg.kg⁻¹ per day during 7 days. After a week treatment, animals were sacrificed and tumour weights were measured. Then tumour inhibition percentage was calculated from the mean tumour weights of treated animal group in relation to the untreated control group. Animal experiments were performed according to the

National Cancer Institute (NCI) protocol (Geran *et al.*, 1972) with the approval of the Ethic Committee for Animal Experimental Assays of the Federal University of Pernambuco.

Histopathological analyses

The animal organs (tumour, liver, kidneys and spleen) were submitted to histopathological analysis. Sample tissues were preserved in a 10% buffered-formaline solution until paraffin inclusions. Slices of sample tissues (4 μm) were prepared, and a fixation with haematoxyline and eosine staining was developed, before examination by optical microscopy (Olympus BH-2, Japan).

Results and discussion

Formation of usnic acid-loaded microspheres

Double emulsion/evaporation solvent method is the most commonly technique for preparing polymeric polyester microparticles. The double emulsion method is suitable to encapsulate either water-soluble or water-insoluble drugs (Jain, 2000, Lamprecht *et al.*, 2000). In this technique, the first aqueous phase (w_1) is poured into a polymer-solvent-drug solution under vigorous stirring to obtain the simple emulsion (w_1/o). Then, this emulsion is dispersed into a large volume of water (w_2) containing a surfactant and emulsified with appropriate stirring to form the double emulsion ($w_1/o/ w_2$). Following, the double emulsion is submitted to solvent evaporation process for obtaining solid microspheres.

Pre-formulation studies were performed to guide the choice of the optimal concentration of constituents for obtaining a stable formulation of usnic acid-loaded PLGA-microspheres (table 1). Initially, an attempt to prepare microspheres using Pluronic[®] F68 or PVP (0.5% w/v) as emulsifiers to stabilise the simple emulsion was accomplished. An amount of 400 mg of PLGA was used to prepare microspheres. However, Pluronic[®] was not able to stabilize the double

Table 1 . Optimization of the formulation of UA-loaded PLGA -microspheres.

Constituents	<i>Formulations</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Usnic acid (g)	—	0.01	—	—	—	—	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.015	0.02
PLGA 50:50 (g)	0.4	0.4	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
PEG 4000 (g)	—	—	0.05	0.1	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
PVA 0.3%	—	—	—	—	—	—	—	—	50	—	3 4	—	—
PVA 0.5%	60	60	60	60	60	60	60	50	—	—	50	50	50
PVA 1.0%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50	3 4	—	—
Methylene chloride (ml)	10	12	10	10	10	10	12	12	12	12	12	12	12

The aqueous phase of the first emulsion consisted of different PEG quantities into 5 ml deionized water.

emulsion and the use of PVP led to an aggregated final product. Therefore those emulsifiers were discarded in the preparation of PLGA-microspheres. In a second step, PVA was chosen as stabiliser for the double emulsion. The effect of its initial concentration (0.3, 0.5 or 1.0% w/v) on the stability of microspheres and drug entrapment was evaluated. The concentration of 0.5% PVA promoted a great homogeneity of particle size distribution and led to 99% drug entrapment efficiency for an initial amount of 10 mg usnic acid (table 2). In factor, the presence of a stabiliser in the external phase give rise to a decreasing of the superficial tension between the aqueous and the organic phases, which conducted to a reduction of the diameter of multiple emulsion globules. Consequently, a reduction on the size of the resulting microparticles was observed (Blanco-Pietro *et al.*, 1998).

The PVA is the first choice of stabiliser to be used for manufacturing of microparticles by the double emulsion method (Rafati *et al.*, 1997). It was observed that higher PVA concentration in the external aqueous phase engendered an increase in the particle size of microspheres (Yang *et al.*, 2001a). This effect was attributed to the increase in the viscosity of the aqueous phase, which promotes a reduction on the mechanical stress during the homogenisation process leading to an increase in the particle size. In our study, the microspheres obtained with 1% PVA (w/v) corroborated these previously mentioned data.

Table 2. Evaluation of the influence of the surfactant concentration on the usnic acid entrapment efficiency into PLGA-microspheres

Initial PVA concentration (%)	UA encapsulation (%)
0.3	93 ± 1.12
0.5	99 ± 0.46
1.0	86 ± 0.95

Data shown are the mean ± S.D. (standard deviation) (n=3). The initial amount of usnic acid was 10 mg.

In a second stage, the amount of PLGA (50/50) was varied from 0.4 to 0.55 g and the optimised amount was found to be 0.45 g. As observed by optical microscopy 0.4 g of PLGA promoted the formation of a little amount of particles. On the contrary, 0.55 g of PLGA bring upon the presence of polymer crystals detected by visual and microscopic observation (data not showed). However, PLGA-microspheres presented irregular shape, porous at the surface and a tendency to form aggregates (figure 1a,c). This drawback was solved by the addition of PEG, as the stabiliser of the simple emulsion.

The influence of the PEG concentration on the stability of microspheres was evaluated varying it from 0.1 to 0.4 g. The SEM morphological evaluation revealed that microspheres can be produced with or without PEG. However, microporous were detected at the surface of microspheres prepared without PEG (figure 1c). Furthermore, it was observed that the presence of PEG improved the formation of well-defined microspheres with spherical shapes, homogeneous particle size distribution and smooth surfaces. In addition it was verified that an increase in the PEG amount promoted the formation of more stable microspheres with a better morphological aspect. The amount of 0.4 g was chosen as the optimal PEG quantity for obtaining stable microspheres (figure 1b,d). Therefore the presence of PEG in the first step of the microspheres manufacturing process was clearly crucial to derive stable formulations. Despite that PEG was used as surfactant in the aqueous phase of the simple emulsion, it can be speculated that a part of the its initial amount was blended to PLGA. As expected, a substantial fraction of the PEG originally dissolved in the first aqueous phase should be eliminated during the washing process. Actually, Cleek *et al.* (1997) had detected the formation of PLGA-PEG physical blends during microspheres producing when PEG was initially dissolved in the organic phase as a mixture with PLGA. According to Yang *et al.* (2001b), the chemical attachment of PEG blocks to the poly (ortho ester) (POE) polymer (POE-PEG-POE) increases the last polymer hydrophilicity, which stabilises the first emulsion. On the other hand, they observed by microscopic analysis that an increase in PEG

content promoted the formation of microspheres with a denser internal structure. This phenomenon was attributed to the fact that an increase in the PEG content allows for a fine dispersion of the internal water in the polymeric matrix, which results in an apparently denser structure after drying of the microspheres.

Despite the usnic acid physicochemical properties, including photo sensibility and chemical instability, microencapsulation of (10, 15 or 20 mg) usnic acid was achieved into microspheres prepared with 450 mg of PLGA. At the 1:45 drug-polymer ratio, the best usnic acid encapsulation efficiency (about 100%) and more stable microspheres were attained (table 3). Optimisation studies resulted in a typical microsphere formulation prepared with PLGA, PEG and PVA containing usnic acid from *C. substellata* (table 1, formulation 11).

Characterization of usnic acid-loaded PLGA microspheres

Lyophilized PLGA-microspheres containing usnic acid was evaluated according to their morphological characteristics, encapsulation efficiency and stability after preparation and at long-term testing.

Loaded-usnic acid PLGA-microspheres presented an initial macroscopic aspect as a powder with a yellowish colour. Microscopic analysis showed spherical shape microspheres, and a relative homogeneity in particle size distribution (figure 1d). A mean diameter of $7.02 \pm 2.74 \mu\text{m}$ was estimated by particle counting.

The encapsulation efficiency of the usnic acid into PLGA microspheres for different drug-polymer ratio is presented in the table 3. The encapsulation efficiency decreased at higher usnic acid concentrations being 87 and 81% for 15 mg and 20 mg, respectively. The highest encapsulation ($99\% \pm 0.46$) was achieved for microspheres prepared with 10 mg of usnic acid and 450 mg PLGA.

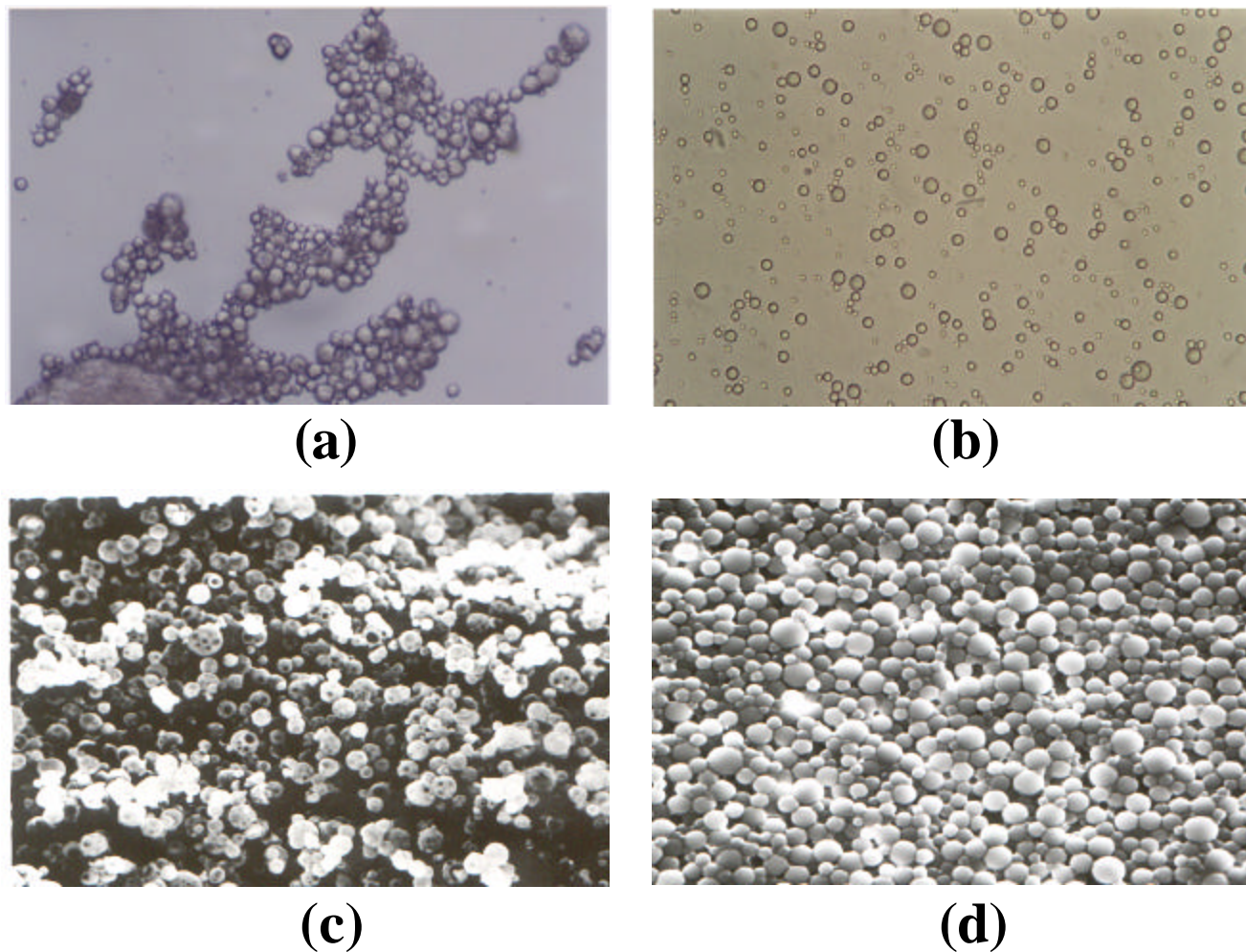


Figure 1. Photomicrographs of the usnic acid-loaded PLGA microspheres prepared with or without PEG analysed by: optical microscopy without (a) and with PEG (b) (40x); SEM without (c) and with PEG (d) (100x, — 10 μm). The initial PEG amount (0.4 g) is expressed on dry basis for the total mass of the polymer and drug (46.5 wt%).

Table 3. Encapsulation efficiency of usnic acid into PLGA-microspheres (450 mg of polymer)

Usnic acid amount (mg)	Encapsulation efficiency (%)
10	99 ± 0.46
15	87 ± 1.79
20	81 ± 0.51

Data shown are the mean ± standard deviation (n=3).

The content of usnic acid was $105 \pm 5\%$ after microspheres preparation, which guarantees that the drug integrity was maintained during the manufacture of the dosage form. The evaluation of the long-term stability of lyophilised PLGA-microspheres showed that acceptable levels of usnic acid content (90 %) were kept until 7 months of storage at 4°C. However, a gradual decrease of usnic acid content was detected reaching $61 \pm 6.7\%$ 510 days after preparation of microspheres (figure 2). The usnic acid degradation might be attributed to the bulk erosion of PLGA, which produces a very low pH environment within the PLGA matrix (Yang *et al.*, 2001b) that may adversely induce its hydrolysis.

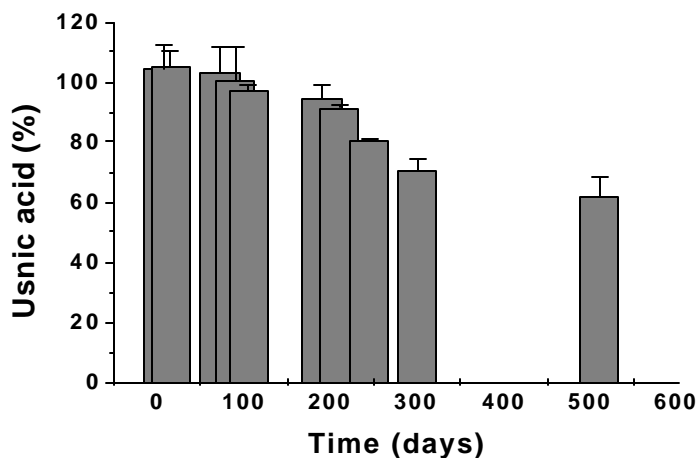


Figure 2. Stability of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres.

In vitro release kinetics of usnic acid-loaded PLGA microspheres

The *in vitro* release of usnic acid from PLGA-microspheres is characterised by a typical bimodal behaviour (figure 3). Initially, a large burst effect (35 ± 0.13 %) occurs the first hour. This effect might be associated to the presence of usnic acid crystals on or nearby the surface of microspheres. This burst step is followed by a gradual increase in the release of usnic acid reaching 92 ± 0.04 % within 5 days. However, a slight decrease in the usnic acid after this period was observed. This UA decline can be attributed to photodegradation and chemical instability. The bimodal kinetic profile could be explained by the presence of a part of the drug in the external surface of the microspheres (burst effect) and a part of the drug entrapped in the polymeric matrix (plateau), which requires a longer time for degradation. Therefore, it can be postulated that the release mechanism of usnic acid from PLGA-microspheres is governed by diffusion and polymeric matrix erosion by hydrolytic degradation of the copolymer. In fact, it is well-known that PLGA containing a 50:50 ratio of lactic and glycolic acids is hydrolysed faster than those containing a higher proportion of one of the two monomers (Lewis, 1990).

Kinetic profiles of drug from PLGA microspheres reported in literature are quite controversial and fundamentally dependent on the monomeric lactic (LA) and glycolic (GA) acid ratio on the polymeric chain. In addition, the *in vitro* experimental conditions seem to play an important role on the drug release behaviour. In this way, the usnic acid kinetic profile is corroborated by that reported for the release of taxol from PLGA 50/50 microspheres (Wang *et al.*, 1997) with a faster drug release attaining 80% in 2 days. Conversely, a controlled release of taxol from microspheres prepared with PLGA with a LA/GA ratio of 75/25 or 100/0 was reported. On the other hand, Singh and Udupa (1997) observed a triphasic behaviour of methotrexate from PLGA (50/50) microspheres. Kinetics were characterised by an initial burst effect followed by a slow release and finally a secondary burst effect occurred. It was suggested that the burst effect corresponds to the release of the drug located

on or near the surface of the microspheres or to the immediately release of poorly entrapped drug. The slow release period was attributed to the diffusion of the medium of release into the polymeric matrix bringing upon its degradation and allowing drug diffusion from microspheres. Finally, the secondary burst effect occurs when the polymeric matrix becomes more water-soluble resulting in its erosion and collapse. On the contrary, Cleek *et al.* (1997) reported a controlled release of dextran or IgG from PLGA (50/50)/PEG blends. The kinetic profile was PEG concentration dependent. A similar kinetic profile of camptothecin (CPT) isolated from the oriental tree *Camptotheca acuminata* encapsulated into PLGA microspheres was quoted by Ertl *et al.* (1999). Recently, it was reported a slower constant release of 5-fluorouracil from microspheres prepared with PLGA (75/25) for a 3week period (Roullin *et al.*, 2002).

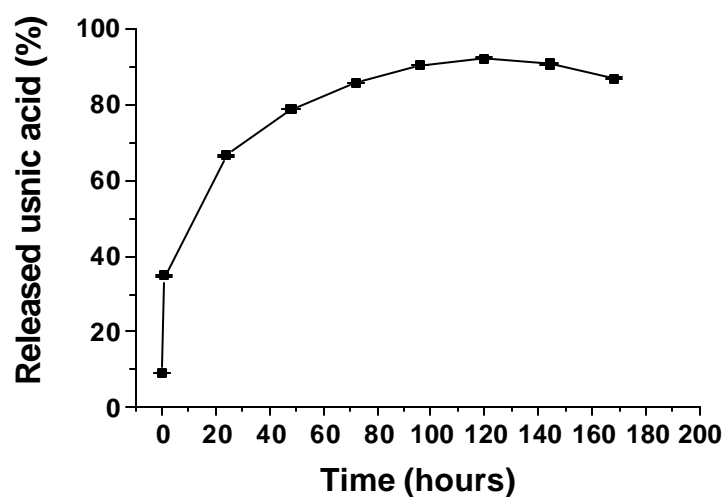


Figure 3. *In vitro* release profile of usnic acid from PLGA-microspheres. Errors bars represent means \pm standard deviation for $n=3$.

Cytotoxicity of usnic acid-loaded PLGA microspheres

Results of cell viability for the incubation at different concentration of free and encapsulated usnic acid are shown in figure 4. Concentration required to inhibit 50% of cell proliferation (IC_{50}) were 12.6 and 14.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$, for free and encapsulated usnic acid, respectively. Therefore there was no significant difference between the cytotoxicity of free and encapsulated usnic acid, presenting the same IC_{50} magnitude order. No cytotoxic effects were observed for cells incubated with unloaded microspheres. This last result confirms the cell biocompatibility of the microspheres prepared with PLGA, PEG and PVA.

Controversial results of usnic acid cytotoxicity are reported in literature for different *in vitro* assays using several cell lines. Correché *et al.* (1998) evaluated the *in vitro* cytotoxic of the usnic on cultured lymphocytes isolated from the spleen of Hoffman rats. It was observed that usnic acid ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) completely inhibited cell proliferation. A concentration of 1.42 dpm of ^3H thymidine was measured for cells treated with usnic acid while 3.37 dpm was detected in cells treated with colchicine, a reference drug. Kumar and Müller (1999) reported a potent *in vitro* antiproliferative action of usnic acid on human keratinocyte cell line HaCaT with an IC_{50} equals to 2.1 μM . Results indicated that such an effect has cytostatic rather than cytotoxic nature. On the contrary, it was verified that usnic acid alone, or as a care formulation had no *in vitro* cytotoxicity against cell strains of KB human epidermoid, gingival keratinocytes and fibroblats from human biopsies (Cochietto *et al.*, 2002). In a recent investigation (+)-usnic acid solubilized in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin exhibited antiproliferative activity against the malignant K-562 cell line with an ED_{50} of 4.7 $\mu\text{g/ml}$ (Kristmundstóttir *et al.*, 2002).

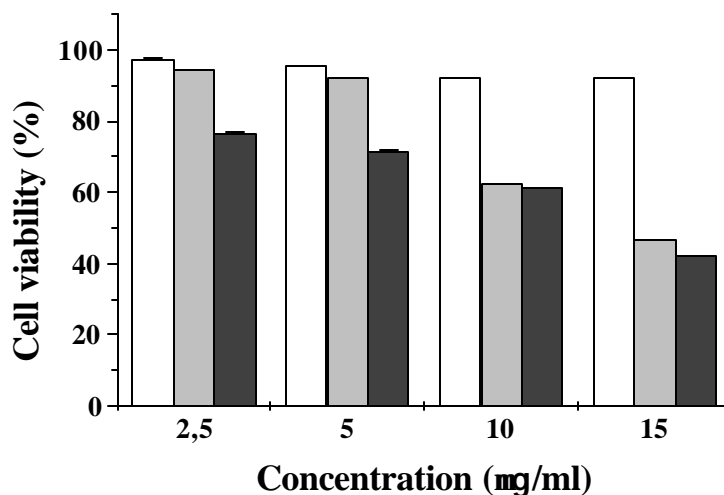


Figure 4 Cytotoxicity of free and microencapsulated usnic acid against HEp-2 cells, MTT test (mean of four wells). Usnic acid-loaded microspheres (■); unloaded microspheres (□); usnic acid in phosphate buffered saline (pH 7.4) (■).

Antitumour activity of usnic acid-loaded microspheres

The effect of the intraperitoneal administration of free and encapsulated usnic acid on the inhibition of Sarcoma 180-bearing mice was examined (figure 5). Usnic acid-loaded PLGA-microspheres promoted a 63% inhibition on the tumour growth while the inhibition was smaller for free usnic acid (42%). Therefore, an improvement of 21% on tumour inhibition was achieved with microencapsulation of usnic acid into PLGA microspheres. The antitumoural activity of usnic acid previously reported (Takai *et al.*, 1979; Cocchietto *et al.*, 2002; Ingólfssdóttir, 2002) was thus corroborated in this study. Furthermore, no weight loss of animals was detected encapsulated with usnic acid. Achievements of in the present work were corroborated by those reported on literature, which presented the potential effect of the drug microencapsulation as a promise alternative for an effective chemotherapy.

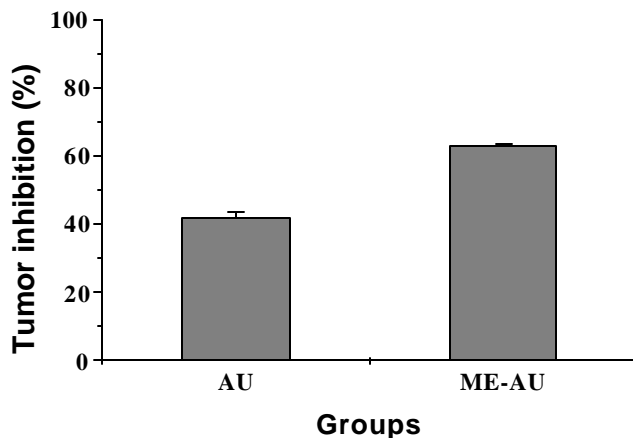


Figure 5. Evaluation of the antitumoral activity of the usnic acid against Sarcoma-180; free usnic acid (UA); usnic acid-loaded microspheres (ME-UA).

Histopathological analysis of tumour and organs

Histopathological analysis of tumour and liver of animals treated with free and encapsulated usnic are illustrated in figures 6 and 7, respectively. Microphotographs revealed extensive necrotic areas on tumour tissue after treatment with free usnic acid while this abnormality was slighter with loaded usnic acid (figure 6b,c). Morphological alterations were detected in the liver of the animals treated with free usnic acid (Figure 7c). Vacuolisation of hepatocytes and the presence of neutrophilic cells were also detected. On the other hand, liver of animals treated with usnic acid loaded-microspheres presented only morphological uncharacterized hepatocytes. No significant abnormalities were verified for the treatment with unloaded-microspheres. No histological alterations were observed in spleen and kidneys of all animals treated with free or encapsulated usnic acid.

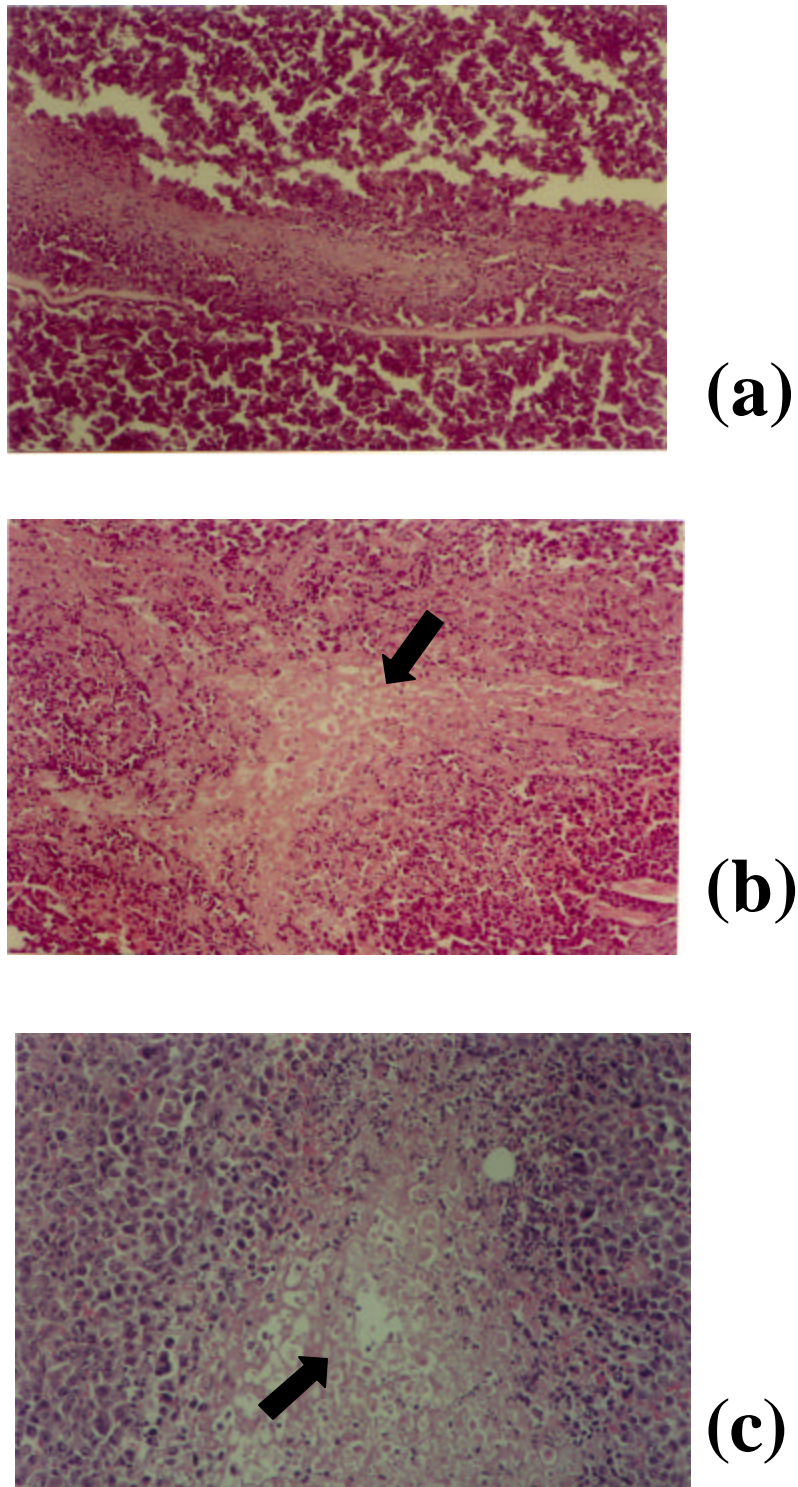



Figure 6. Histopathological analysis (H & E) tumour of mice treated with: control group (a); UA-loaded PLGA microspheres (b) and free usnic acid (c). The magnification for tumour observation was 200x ( arrays denote area of necrosis).

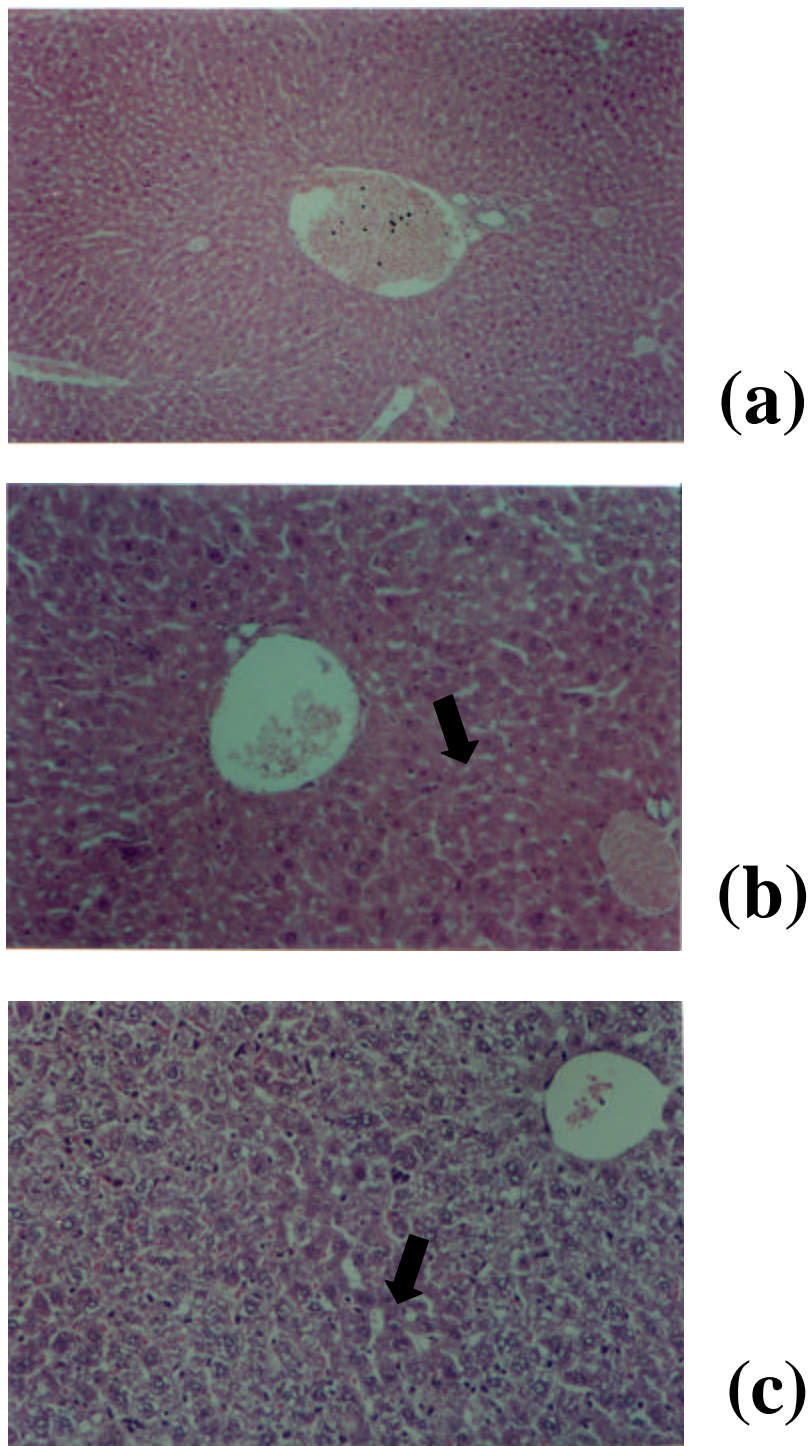



Figure 7 Histopathological analysis (H & E) liver of mice treated with: control group (a); UA-loaded PLGA microspheres (b) and free usnic acid (c). The magnification for liver observation was 100x ( arrays indicate morphological alteration).

Conclusions

PLGA microspheres containing usnic acid were obtained with a relative homogeneity in the size distribution of particles. The presence of PEG 4000 as emulsifier of the simple emulsion in the first aqueous phase of the system improved the morphology of the microspheres. The encapsulation efficiency of usnic acid (10 mg) was remarkable in 460 mg of microspheres.

The *in vitro* kinetic study revealed that usnic acid presented a typical release biphasic behaviour.

The cytotoxicity of free and encapsulated usnic acid was not significantly different. Moreover, the microencapsulation promoted an increase on tumour inhibition activity of usnic acid.

Acknowledgements

This work received partial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), under Grant 479979/01-4. RMRC and NSSM are grateful to CNPq for M.Sc. and researcher fellowships. Authors also wish to thank Dr. Nicodemos Teles for his valuable technical assistance on the histopathological analysis.

References

- Al-Bekari, A. M., Quereshi, S., Chaudhry, M. A., Krishna, D. R., Shah, A. H., 1991, Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. *Journal Ethnopharmacology*, **33**, 217-220.
- Alley, M. C., Scudiero D. A, Monks A., Hursey M. L., Czerwinski M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker R. H., Body M. R., 1988, Feasibility of Drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, **48**, 589-601.

- Barrio, G. G., Novo, F. L., Irache, J. M., 2003, Loading of plasmid DNA into PLGA microparticles using TROMS (Total Recirculation One-Machine System): evaluation of its integrity and controlled release properties. *Journal of Controlled Release*, **86**, 123-130.
- Blanco-Príeto, M. J., Fattal, E., Puisieux, F., Couvreur, P., 1998, Nouvelles approches pour encapsulation de peptides au sein de microspheres de PLG. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **56(6)**, 256-263.
- Campanella, L., Delfini, M.; Ercole, P., Iacoangeli, A., Risuleo, G., 2002, Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. *Biochimie*, **84**, 329-334.
- Cleek, R. L., Ting, K. C., Eskin, S. G., Mikos, A. G., 1997, Microparticles of poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) blends for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **48**, 259-268.
- Cochietto, M., Skert, N., Nimis, P. L., Sava, G., 2002, A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, **89**, 137-149.
- Correché, E. R., Carrasco, M., Escudero, M. E., Velázquez, L., Gúzmán, A. M. S., Giannini, F., Enriz, R. D., Ceñal, J. P., Giordano, O. S., 1998, Study of cytotoxicity and antimicrobial activities of usnic acid derivatives. *Fitoterapia LXIX*, **6**, 493-501.
- Ertl, B., Platzer, P., Wirth, M., Gabor, f., 1999, Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery stabilization of camptothecin. *Journal of Controlled Release*, **61**, 305-317.
- Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M., Abbott, B. J., 1972, Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems. 3 edition, Cancer Chemotherapy Reports, 3, Part III, 2.
- Ingólfssdóttir, K., 2002, Molecules of interest usnic acid. *Phytochemistry*, **61**, 729-736.

- Jain, R. A., 2000, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **21**, 2475-2490.
- Jain, R. A., Rhodes, C. T., Railkar, A. M., Malick, A. W., Shah, N. H., 2000, Controlled release of drugs from injectable *in situ* formed biodegradable, PLGA microspheres: effect of various formulation variables. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, 257-262.
- Kristmundstóttir, T., Aradóttir, H. A. E., Ingólfssdóttir, K., Ögmundsdóttir, H. M., 2002, Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, **54**, 11.
- Kumar, K. C., Müller, K., 1999, Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffrataic acid on human keratinocyte growth. *Journal of Natural Products*, **62**, 821-823.
- Kumar, N., Ravikumar, M. N. V., Domb A. J., 2001, Biodegradable Block Copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **53**, 23-44.
- Lamprecht, A., Schäfer, U. F., Lehr, C. M., 2000, Visualization and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal laser scanning microscopy (CLSM). *International of Journal Pharmaceutics*, **196**, 223-226.
- Lewis, D. H., 1990, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, edited by M. Chasin and R. Langer (New York, Marcel Dekker).
- Le Ray, A. M., Chiffolleau, S., Iooss, P., Grimandi, G., Gouyette, A., Daculsi, G., Merle, C., 2003, Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, *in vitro* release and cytocompatibility. *Biomaterials*, **24**, 443-449.

- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, **65**, 55-63.
- Müller, K., 2001, Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiological Biotechnology*, **56**, 9-16.
- O'Hagan, D. T., Singh, M., Gupta, R. K., 1998, Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **32**, 225-246.
- Rafati, H., Coombes, A. G. A., Adler, J., Holland, J., Davis, S. S., 1997, Protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. *Journal of Controlled Release*, **43**, 89-102.
- Roullin, V. G., Deverre, J. R., Laurent, L., Hindré F., Julienne, M. C. V., Vienet, R., Benoit, J. P., 2002, Anti-cancer drug diffusion within living rat brain tissue: an experimental study using [³H] (6)-5-fluorouracil-loaded PLGA microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **53**, 293-299.
- Sing, U. V., Udupa, N., 1997, In vitro characterization of methotrexate loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and antitumour efficacy in Sarcoma-180 mice bearing tumour. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, **72**, 165-173.
- Takai, M., Uehara, Y., Beisler, J. A., 1979, Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **22**, 1380.
- Venkataramana, D., Krishna, D. R., 1992, High-performance liquid chromatographic determination of usnic acid in plasma. *Journal of Chromatography*, **575**, 167-170.
- Verma, R. K.; Garg, S., 2001, Drug Delivery Technologies and Future Directions. *Pharmaceutics Technology*, **25**, 1-14.
- Wang, Y. M., Sato, H., Horikoshi, I., 1997, *In vitro in vivo* evaluation of taxol release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres containing isopropyl myristate and degradation of the microspheres. *Journal of Controlled Release*, **49**, 157-166.

Yang, Y., Chung T S., Ping, N. N., 2001a, Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, **22**, 231-241.

Yang, Y., Wan, J., Chung, T., Pallathadka, P. K., Steve, N., Heller, J., 2001b, POE-PEG-POE triblock copolymeric microspheres containing protein I. Preparation and characterization. *Journal of Controlled Release*, **75**, 115-128.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- ❖ Foram obtidas microesferas de PLGA contendo ácido úsnico na concentração de 1,0 mg/ml, com elevada taxa de encapsulação e diâmetro médio de $7 \pm 2 \mu\text{m}$;
- ❖ O polietilenoglicol (PEG) utilizado na preparação das microesferas de PLGA contendo ácido úsnico interferiu na morfologia da superfície das partículas, formando microesferas bem definidas;
- ❖ As microesferas de PLGA contendo ácido úsnico quando armazenada a 4°C apresentaram um decréscimo no conteúdo do princípio ativo em 17 meses;
- ❖ O perfil cinético da liberação *in vitro* do ácido úsnico a partir de microesferas de PLGA apresentou comportamento bimodal, demonstrando uma liberação gradual;
- ❖ As concentrações requeridas para inibir 50% do crescimento celular (IC_{50}) das células de câncer de laringe (HEp-2) frente ao ácido livre e encapsulado não apresentaram diferenças significativas;
- ❖ O ácido úsnico encapsulado potencializou em 21% a atividade antitumoral frente ao sarcoma-180 quando comparado ao composto livre;
- ❖ O tratamento com ácido úsnico encapsulado provocou intensa área de necrose na região central do tumor;
- ❖ Microesferas de PLGA contendo ácido úsnico reduziu os efeitos tóxicos ao nível de hepatócitos. Não foram verificadas alterações morfológicas em nível de rins e baço dos animais dos grupos tratados;
- ❖ As microesferas de PLGA contendo ácido úsnico podem ser exploradas como alternativa para o tratamento da quimioterapia contra o câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

ABO-KHATWA, A. N.; AL-ROBAL A. A.; JAWHART, D. A. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. *Natural Toxins*, 4, 96-102, 1996.

AIN, Q.; SHARMA, S.; GARG, S. K.; KHULLER, G. K. Role of poly (DL-lactide-co-glycolide) in development of a sustained oral delivery system for antitubercular drug(s). *International Journal of Pharmaceutics*, 239, 37-46, 2002.

AL-BEKARI, A. M.; QUERESHI, S.; CHAUDHRY, M. A.; KRISHNA, D. R.; SHAH, A. H. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. *Jour. of Ethnophar.*, 33, 217-220, 1991.

ALZA Corporation: commercial products, http://www.alza.com/wt/how.zoo?page_name=products).

BARRIO, G. G.; NOVO, F. L.; IRACHE, J. M. Loading of plasmid DNA into PLGA microparticles using TROMS (Total Recirculation One-Machine System): evaluation of its integrity and controlled release properties. *Journal of Controlled Release*. 86, 123-130, 2003.

BERKLAND, C.; KIM, K. K.; PACK, D. W. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions, *Journal of Controlled Release*, 73 (1), 59-74, 2001.

BLANCO-PRÍETO, M. J.; FATTAL, E., PUISIEUX, F.; COUVAEUR, P. Nouvelles approches pour encapsulation de peptides au sein de microspheres de PLG. *Ann. Pharmaceutics françaises*, 56(6), 256-263, 1998.

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

CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; NARDONE, F.; ALESIANE, O.; ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cel. Mol. Life Sci.*, vol. 53 (8), 667-672, 1997.

CAVIGLIA, A. M.; NICORA, P.; GIORDANI, P.; BRUNIALTI, G.; MODENESI, P. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soredians* (Lichenes). *Il Farmaco*, 56, 379-382, 2001.

CLELAND, J. L.; LIM, A.; BARRÓN, L.; DUENAS, E. T.; POWELL, M. F. Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1: Part 4. Optimizing microencapsulation and pulsatile release of MN rgpl20 from biodegradable microspheres. *Journal of Controlled Release*, 47, 135-150, 1997.

COCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89, 137-149, 2002.

CONTI, B.; BUCOLO, C.; GIANNAVOLA, C.; PUGGLISI, G.; GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: *in vitro* / *in vivo* evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5, 287-293, 1997.

CORRECHÉ, E. R.; CARRASCO, M.; ESCUDERO, M. E.; VELÁZQUEZ, L.; GUZMÁN, A. M. S.; GIANNINI, F.; ENRIZ, R. D.; JAÚREGUI, E. A.; CEÑAL, J. P.; GIORDANO, O. S. Study of citotoxicity and antimicrobial activities of usnic acid derivates. *Fitoterapia*, LXIX (6), 493-501, 1998.

CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the indication of lichen products by standized thin layer-chromatographic method. *J. Chromatog.*, 72, 1113-1125, 1972.

DELIE, F. Evaluation of nano – and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34, 221-233, 1998.

DUNN, R. L. & OTTENBRITE, R. M. Polymeric drugs and Drug Delivery Systems. American Chemical Society, Washington DC, 1991.

ERBA, E.; POCAR, D.; ROSSI, L. M. New esters of R(+)-usnic acid. *Il Farmaco*, 53, 718-720, 1998.

ERTL, B.; PLATZER, P.; WIRTH, M.; GABOR, F. Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery and stabilization of camptothecin. *Journal of Controlled Release*, 61, 305-317, 1999.

FAISANT, N.; SIEPMANN, J.; BENOIT, J. P. PLGA-based microparticles: evolution of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, 355-366, 2002.

FATTAL, E.; PECQUET, S.; COUVREUR, P., ANDREMONT, A. Biodegradable microparticles for the mucosal delivery of antibacterial and dietary antigens. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 15-24, 2002.

FLORENCE, A. T. The oral absorption of micro and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharmaceutical Research*, 14 (3), 259-266, 1997.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; ORTIZ, S. T.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; QUILHOT, W.; FERNADEZ E.; HIDALGO, M. E. Activity of compounds isolated from chilean lichens against experimental cutaneous *Leinsmaniasis*. *Comp. Biochem. Physion.*, 16C (1), 51-54, 1997.

FRANSSEN, O.; HENNINK, W. E. A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents. *International Journal of Pharmaceutics*, 168, 1-7, 1998.

GIUNCHEDI, P.; CONTI, B.; SCALIA, S.; CONTE, U. In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination. *Journal of Controlled Release*, 56, 53-62, 1998.

HALE, M. E. *The Biology of lichen*. 3^a ed. London, p. 90, 1983.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 1, 2002. **In Press**.

HUSMANN, M.; SCHENDERLEIN, S.; LÜCK, M.; LINDNER, H.; KLEINEBUDDE, P. Polymer erosion on PLGA microparticles produced by phase separation method. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 277-280, 2002.

HUSSAIN, M.; BEALE, G.; HUGHES, M.; AKHTAR, S. Co-delivery an antisense oligonucleotide and 5-fluoracil using sustained release poly(lactide-co-glycolide) microsphere formulations for potential combination therapy in cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 234, 129-138, 2002.

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

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecules of interest usnic acid. *Phytochemistry*, 61, 729-736, 2002.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G. A. C.; SKÚLASON, V. G.; GISSURARSON, S. R.; VILHELMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. *Eur. J. of Pha. Sci.*, 6, 141-144, 1998.

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

JAIN, R. A.; RHODES, C. T.; RAILKAR, A. M. MALICK, A. W.; SHAH, N. H. Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable, PLGA microspheres: effect of various formulation variables. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 257-262, 2000.

JAIN, R.; SHAH, N. H.; MALICK, A. W.; RHODES, C. T. Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester). *Drugpevelopme Indrustrial Phannancy*, 24(8), 703-727, 1998.

JALÓN, E. G.; BLANCO-PRÍETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. PLGA microparticles: posible vehicles for topical drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 226, 181-184, 2001.

JANG FU; FIEGEL, J.; KRAULAND, E.; HANES, J. New polymeric carriers for controlled drug delivery following inhalation or injection, *Biomaterials*, 23 (22), 4425-4433, 2002.

KALLINTERI, P.; ANTIMISIARIS, S. G.; KARNABATIDIS, D.; KALOGEROPOULOU, C.; TSOTA, I.; SIABLIS, D. Dexamethasone incorporating liposomes: an in vitro study of their applicability as a slow releasing delivery system of dexamethasone from covered metallic stents, *Biomaterials*, 23 (24), 4819-4826, 2002.

KANG, J.; SCHWENDEMAN, S. P. Comparison of the effects of Mg(OH)₂ and sucrose on the stability of bovine serum albumin encapsulated in injectable poly(D,L-lactide-co-glycolide) implants. *Biomaterials*, 23, 239-245, 2002.

KUMAR, N.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DOMB A. J. Biodegradable Block Copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 23-44, 2001.

LAMPRECHT A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C.M. Visualization and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal laser scanning microscopy (CLSM). *International Journal of Pharmaceutics*, 196, 223-226, 2000.

LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K; PETER, T.; MARRE, R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpínico and (+)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob. Agent. Chemoth.*, 39, 2541-2543, 1995.

LAWREY, L. D. Biological role of lichen substances. *Bryologist*, 89, 111-122, 1986.

LINHARDT, R. J. Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate. In *Morton Rosoff.*, p. 53-95, 1989.

LODETTI, G.; GIGOLA, P.; BERTASI, B.; D'AMBROSCA, F.; PONCHIO, G.; FISHBACH, M.; LOSIO, M. N. Valutazione in vitro della citossicità indotta da prodotti per l'igiene orale contenenti acido úsnico, agente antimicrobiano naturale estrato dai licheni *Gimmoc.*, 4, 67-72, 2000.

MANDAL, T. K.; BOSTANIAN, L. A.; GRAVES, R. A.; CHAPMAN, S. R.; IDODO, T. U. Porous biodegradable microparticles for delivery of pentamidine. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*. 52, 91-96, 2001.

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

NASH, T. H. *Lichen Biology*. Cambridge University. Press. 1ª ed., p. 303, 1996.

NYKAMP, G.; CARSTENSEN, U.; MÜLLER, B. W. Jet milling – a technique for microparticle preparation. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 79-86, 2002.

O'HAGAN, D. T.; SINGH, M.; GUPTA, R. K Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release bacines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32, 225-246, 1998.

OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; YAMAZAKI, M.; KINOSHIDTA, Y.; YAMAMOTO, Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.*, vol. 61 (2), p. 113-115, 1995.

PEPPAS, L. B. Polymers in Controlled Drug Delivery. *Medical plastics and biomaterials magazine*. Disponível em: <<http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>> acesso em 05 de janeiro de 2003.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16 (4-5), 305-312, 2002.

QVIST, M. H.; HOECK, U.; KREILGAARD, B.; MADSEN, F.; FROKJAER, S. Release of chemical permeation enhancers from drug-in-adhesive transdermal patches, *International Journal of Pharmaceutics*, 231 (2), 253-263, 2002.

RANCAN, F.; ROSAN, S.; BOEHM, K.; FERNÁNDEZ, E.; HIDALGO, M. E.; QUILHOT, W.; RUBIO, C.; BOEHM, F.; PIAZENA, H.; OLTMANS, U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *J. of Photoche. and Photob. B: Biology*, 68, 133-139, 2002.

Ré, M. I. Tecnologia Industrial. *Ciência Hoje*, 27 (162), 24-29, 2000.

ROGERS, J. A. Recent Developments in drug delivery. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, 35 (6), 170-174, 1982.

RÖSLER, A.; VANDERMEULEN, G. W. M.; KLOK, H-A Advanced drug delivery device via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 95-108, 2001.

ROULLIN, V. G., DEVERRE, J. R., LAURENT, L., HINDRÉ F., VENIER-JULIENNE, M. C., VIENET, R., BENOIT, J. P. Anti-cancer drug diffusion within living rat brain tissue: an experimental study using [³H] (6)-5-fluorouracil-loaded PLGA microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53, 293-299, 2002.

SCIRPA, P.; SCAMBIA, G.; MASCIULLO, V.; BATTAGLIA, F.; FOTI, F.; LOPEZ, R.; VILLA, P.; MALECORE, M.; MANCUSO, S. Terapia adjuvante con un preparato a base di zinco solfato e acido úsnico delle lesioni genitali da human papilloma virus (HPV) dopo trattamento chirurgico distruttivo. *Minerva Ginecol*, 51, 255-260, 1999.

SHAHIDI, F.; HAN, X-Q Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501-547, 1993.

SHARMA, R. K.; JANNKE, P. J. Acidity of usnic acid. *Ind. J. Chem.*, 4, 16-18, 1966.

SHISHIDO, S. M. Sistemas auto-organizados com polímeros na liberação controlada de drogas. QP – 433, outubro 2001.

SINGH, M.; SHIRLEY, B.; BAJWA, K.; SAMARA, E.; HORA, M.; O'HAGAN, D. Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles, *Journal of Controlled Release*, 70 (1-2, 21-28), 2001.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* 70 (1-20), 2001.

STURESSON, C.; ARTURSSON, P.; GHADERI, R.; JOHANSEN, K.; MIRAZIMI, A.; UHNOO, I.; SVENSSON, L.; ALBERTSSON, A-C; CARLFORS, J. Encapsulation of rotavirus into poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release*, 59, 377-389, 1999.

STURESSON, C.; WIKINGSSON, L. D. Comparioson of poly(acryl starch) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres as drug delivery system for a rotavirus vaccine. *Journal of Controlled Release*, 68, 441-450, 2000.

TAGUCHI, H.; SANKAWA, U.; SHIBATA, S. Biosynthesis of natural products. VI Biosynthesis of usnic acid in lichen (1). A general scheme of biosynthesis of usnci acid. *Chem. Pharm. Bull*, 17, 2054-2060, 1969.

TAKANI, M.; YAJIMA, T.; MASUDA, H.; YAMAUCHI, O. Spectroscopic and structural characterization of copper(II) and palladium(II) complexes of a lichen substance usnic acid and its derivatives. Possible forms of environmental metals retained in lichens. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91, 139-150, 2002.

THOMASIN, C.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Drug microencapsulation by PLA/PLGA Coacervation in the Light of Thermodynamics. 2. Parameters Determining Microsphere Formation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87 (3), 269-275, 1998.

TINSLEY-BOWN, A. M.; FRETWELL, R.; DOWSETT, A. B.; DAVIS, S. L.; FARRAR, G. H. Formulation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for rapid plasmid DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 66, 229-241, 2000.

TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of controlled Release* 73, 137-172, 2001.

VENKATARAMANA, D. & KRISHNA, D. R. High-performance liquid chromatographic determination of usnic acid in plasma. *Journal of Chromatography*, 575, 167-170, 1992.

VENKATARAMANA, D. & KRISHNA, D. R. Pharmacokinetics of d(+)-usnic acid in rabbits after intravenous administration. *Eur. J. Drug Meta.*, 18 (2), 161-163, 1993.

VERMA, R. K.; GARG, S. Drug Delivery Technologies and Future Directions. *Pharmaceutical Technology On-Line*, 25(2), 1-14, 2001.

VICENTE, C. Fisiología de las substancias líquénicas. Madrid: Allandra, p. 162., 1975.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M. K.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A. B.; SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*, 71, 564-566, 2000.

WANG, F.-J.; LEE, T.; WANG, C.-H. PEG modulated release of etanidazole from implantable PLGA/PDLA discs. *Biomaterials*, 23 (17), 3555-3566, 2002.

WANG, Y. M.; SATO, H.; HORIKOSHI, I. In vitro in vivo evaluation of taxol release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres containing isopropyl myristate and degradation of the microspheres. *Journal of Controlled Release*, 49, 157-166, 1997.

WEERT, M. V.; HENNINK, W. E.; JISKOOT, W. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharmaceutical Research*, 17 (10), 1159-1167, 2000.

WICHERT, B. AND ROHDEWALD, P. A new method for the preparation of drug containing polylactic acid microparticles without using organic solvents. *Journal of controlled release*, 14 (3), 269-283, 1990.

YANG, Y.; WAN, J.; CHUNG, T.; PALLATHADKA, P. K.; STEVE, N.; HELLER, J. POE-PEG-POE triblock copolymeric microspheres containing protein I. Preparation and characterization. *Journal of Controlled Release*, 75, 115-128, 2001.

YANG, Y-Y.; CHUNG, T-S; BAI, X-L; CHAN, W-K Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science*. 55, 2223-2236, 2000.

YEH, M-K.; COOMBES, A. G. A.; JENKINS P. G.; DAVIS, S. S. A novel emulsification-solvent extraction technique for production of protein loaded biodegradable microparticles for vaccine and drug delivery. *Journal of controlled release*, 33(3), 437-445, 1995.

YOUAN, B. B. C.; JACKSON, T. L.; DICKENS, L.; HERMANDEZ, C.; OWUSU-ABABIO, G. Protein release profiles and morphology of biodegradable microcapsules containing an oily core. *Journal of Controlled Release*, 76, 313-326, 2001.

ZHOU, S.; LIAO, X.; LI, X.; DENG, X.; LI, H. Poly-DL-lactide-co-poly(ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 2002. **In Press.**

ZHUANG, F. F.; LIANG, R.; ZOU, C. T.; MA, H.; ZHENG, C. X.; DUAN, M. X. High efficient encapsulation of plasmid DNA in PLGA microparticles by organic phase self-emulsification. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 52, 169-178, 2002.

Resumos enviados para congresso

Resumos enviados para congresso

1. Ribeiro-Costa, R.M; Estanislau, T; Santos, N.P.; Pereira, E.C.; Silva, N.H.; Honda,N.K.; Santos-Magalhães, N.S. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of the microencapsulation of the usnic acid. In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR – SBBq, Caxambu - Minas Gerais, 17 A 20 de maio de 2003.

2. Santos, N. P.; Souza, A. O.; Wanderley, M.S.O.; Ribeiro-Costa, R.M.; Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Honda, N. K.; ; Silva,C. L.; Santos-Magalhães, N .S. *In vitro* tuberculosis activity of particulated polymeric systems containing usnic acid. . In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR – SBBq, Caxambu - Minas Gerais, 17 a 20 de maio de 2003.

3. Ribeiro-Costa, R. M.; Carvalho, T. E.; Santos, N. P.; Nascimento, S. C.; Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S. Cytotoxicity and antitumoral activity of PLGA microspheres containing usnic acid. In: VII PHARMATECH – IV ENECQ, João Pessoa – Paraíba, agosto de 2003.

Prêmio recebido pelo trabalho decorrente da Tese de Mestrado

III Congresso de Graduação - CONGRAD
PROACAD - UFPE



III CONGRESSO
DE ENSINO
PESQUISA
E EXTENSÃO
DA UFPE

A UNIVERSIDADE E O
DESENVOLVIMENTO SOCIAL

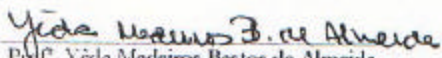
P R Ê M I O C O N G R A D
U F P E - 2 0 0 2

Conferimos ao trabalho "MICROESFERAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO E O ESTUDO IN VIVO DA ATIVIDADE ANITUMORAL" de autoria de Tácia Estanislau de Carvalho o presente **Diploma**, pela sua participação no III Congresso de Graduação da UFPE, realizado no período de 13 a 15 de dezembro de 2002, no campus da UFPE, o qual fez jus ao primeiro lugar no Prêmio CONGRAD - UFPE 2002 na Categoria Acadêmico - Manutenção Acadêmica instituído pela Universidade Federal de Pernambuco.

Recife, 15 de dezembro de 2002.




Prof. Roberto Quental Coutinho
Pró-Reitor para Assuntos Acadêmicos


Prof. Yeda Medeiros Bastos de Almeida
Coordenadora do III Congresso
de Graduação



Validação do método de dosagem

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSAGEM DO ÁCIDO ÚSNICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EFICIÊNCIA

Ribeiro-Costa, R. M.^{1,2}; Santos-Magalhães, N. S.^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Bioquímica, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária. 50670-901, Recife, PE, Brazil

²Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Química-Farmacêutica (LTQF), Av. Prof. Artur Sá, s/ nº, Cidade Universitária. 50670-901, Recife, PE, Brazil

KEYWORDS: Usnic acid, validation, HPLC

*Corresponding author

Dr. Nereide Stela Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Grupo de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

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

50670-901, Recife, PE, Brazil

Tel: +55-081-32718587; fax: +55-081-23718485

E-mail: nssm@ufpe.br

1. INTRODUÇÃO

Validação é a comprovação e verificação da efetividade e reprodutibilidade de uma técnica, com o objetivo voltado para a confiabilidade analítica do laboratório e do método escolhido ou desenvolvido para se obter resultado (USP XXV, 2002; FDA, 2001). No processo de validação não existe modelo pronto, deve-se fazer adaptações adequando-o as necessidades. No entanto, um método sem validação resulta apenas um número e não em um resultado (Leite, 1998).

Num processo analítico qualquer a concentração sempre é obtida de forma indireta, a partir de medidas de outras grandezas como absorção ou emissão da luz. O processo de calibração normalmente, consiste em duas etapas. Na primeira, a etapa descritiva, medidas feitas numa série de padrões analíticos de concentrações conhecidas são usadas para construir um modelo que relacione a grandeza medida com a concentração da espécie de interesse. Na segunda etapa, conhecida como preditiva, usa-se esse modelo para prever concentrações de novas amostras (Pimentel e Barros Neto, 1996; Swartz e Krull, 1998).

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados para tanto, deve-se apresentar precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade adequados á análise (ANVISA, 2002; Ermer, 2001). Na validação a análise de variância é utilizada para verificação da falta de ajuste ou bom desempenho do método (Wieling *et al.*, 1996).

O objetivo principal deste trabalho é validar o método de dosagem do ácido úsnico a partir de formas farmacêuticas de sistemas de liberação controlada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2. METODOLOGIA

Os parâmetros utilizados para validação do método de doseamento do ácido úsnico foram sensibilidade, seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e robustez avaliados de acordo com os requerimentos do FDA (2001), USP 25 e ANVISA (2002).

2.1. Sensibilidade

Esta grandeza depende de quanto o método é capaz de discriminar entre amostras com teores de analito semelhantes. Depende da inclinação da curva analítica ou curva de calibração. Se dois métodos têm igual precisão, o mais sensível é o que possui a curva de calibração com maior inclinação.

2.2. Seletividade

Seletividade é a capacidade do método analítico para diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra. Depende de quanto o método é indiferente à presença na amostra de espécies que poderiam interferir na determinação do analito. A espécie de interesse deve ter o sinal analítico isento de interferências que possam levar à confusão na identificação ou dar margem de não confiabilidade ao resultado quantitativo.

2.3. Limite de Detecção

É calculado na prática como sendo correspondente à concentração que produziria um valor do sinal medido 3 vezes maior que o nível de ruído médio medido com a solução de controle ou branco. Pode ser definido matematicamente através do quociente entre o desvio padrão e a sua inclinação utilizando o fator multiplicador apropriado.

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{ci}$$

2.4. Limite de Quantificação

É o menor nível determinado do fármaco com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser definido matematicamente através do quociente entre o desvio padrão e a inclinação da curva utilizando o fator de multiplicação de 5 a 10 vezes, entre o sinal e o ruído da linha de base.

$$LQ = \frac{DP \times 5}{ci}$$

2.5. Linearidade

A busca da linearidade está em obter os resultados em proporção direta às concentrações das substâncias em estudo. Faz-se necessário à confecção de uma curva de calibração, sendo o eixo x o da concentração e o eixo y o da resposta. Os pontos para a obtenção da curva devem objetivar uma variação de 20% em torno do valor estimado para a substância a ser mensurada. O número de pontos que deve conter uma curva de calibração deve ser no mínimo 5.

2.6. Precisão

Precisão é a concordância de valores experimentais obtidos, quanto mais próximos entre si estiverem, ou seja, maior será a precisão quanto menor for a amplitude das medidas. A repetibilidade do método é verificada através de, no mínimo, nove determinações contemplando o limite de variação do procedimento, ou seja três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada, ou por seis determinações considerando-se a concentração média correspondente a 100% do esperado. Na precisão não se admite valores superiores a 15%.

2.7. Exatidão

Exatidão traduz a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, limite de variação e da especificidade do mesmo, sendo verificada através de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o limite de variação do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. Os ensaios devem ser realizados um mesmo dia (exatidão intradia) e em dias diferentes (exatidão inter-dias).

2.8. Robustez

A robustez do método é o grau de reprodutibilidade dos resultados diante de variações nas condições experimentais. Estas condições incluem diferentes laboratórios, analistas, instrumentos, reagentes e períodos experimentais.

3. Resultado do Processo de Validação

Seletividade

Durante o processo de pré-validação foi determinada a especificidade do método, de acordo com melhor sistema de fase móvel e fluxo. Para o referido teste foi avaliado na corrida analítica, conforme condições cromatográficas já definidas, a injeção dos seguintes sistemas: formulação de microesferas sem princípio ativo (Figura 1); formulação de microesferas contendo ácido úsnico (Figura 2). Para verificar alguma interferência de adjuvantes da formulação que possa confundir na determinação do analito.

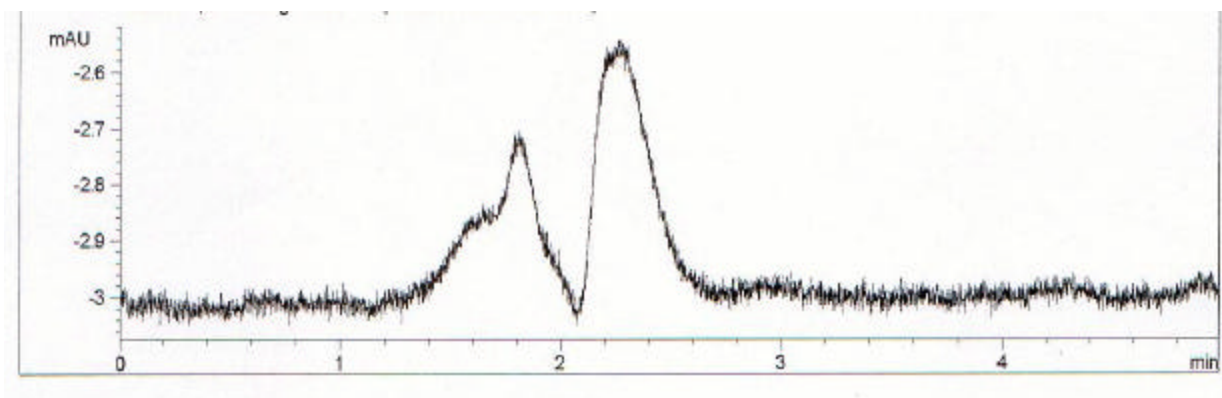


Figura 1. Cromatograma das microesferas de PLGA sem o ácido úsnico.

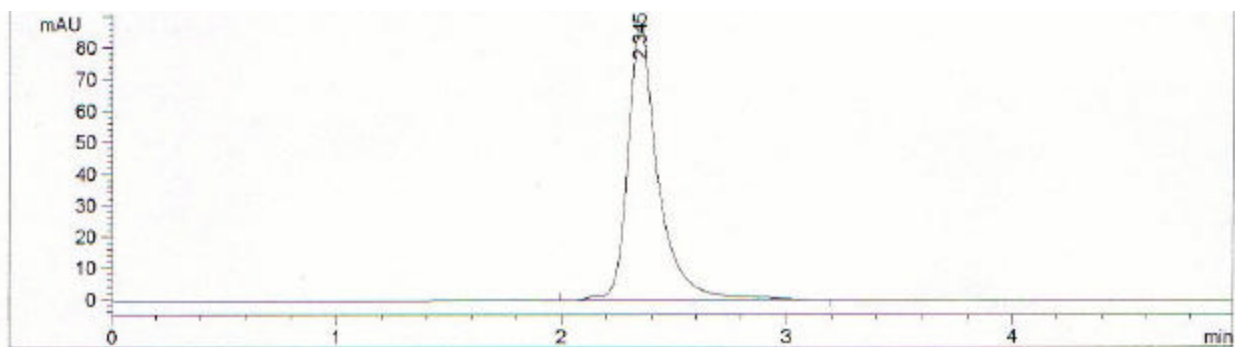


Figura 2. Cromatograma das microesferas de ácido úsnico de concentração 10 µg/ml..

Linearidade

A curva de calibração foi construída nas concentrações 01, 02, 04, 06, 08 e 10 $\mu\text{g/ml}$, mediante relação concentração x área do pico, de acordo com os dados estatísticos representados na tabela 1. A figura 3 traçada através do método dos mínimos quadrados comprova a linearidade do método analítico.

Tabela 1. Resultados da curva de calibração.

Concentração Teórica (mg/ml)	Curva I Área	Curva II Área	Curva III Área	Média Área	DP	CV%	Concentração Experimental (mg/ml)
01	74.79	74.17	75.98	74.98	0.75	1.00	1.01
02	143.40	144.11	146.21	144.57	1.19	0.83	1.99
04	294.46	287.27	280.55	287.43	5.68	1.98	4.00
06	426.97	427.13	429.27	427.78	1.05	0.25	5.97
08	566.28	573.00	576.32	571.87	4.17	0.73	8.00
10	714.550	715.51	714.43	714.83	0.49	0.07	10.02

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variação

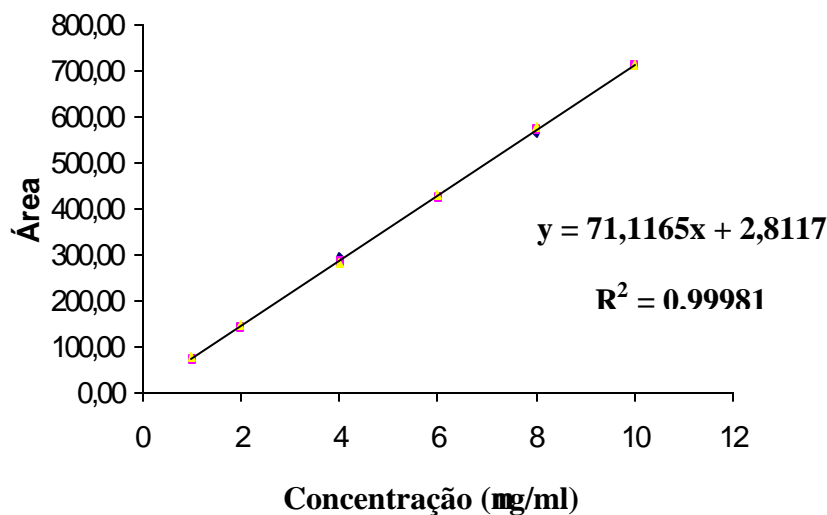


Figura 3. Gráfico da média da curva de calibração.

Podemos avaliar o modelo e a significância estatística da curva ajustada através da Análise de Variância (ANOVA) (tabela 2).

Tabela 2. ANOVA para o modelo linear ajustado.

Fonte	SQ	gl	MQ	F	F-crítico
Modelo	923003,73	1	923003,73	84768,6	4,4940
Residual	174,21	16	10,89		
Falta de ajuste	15,08	4	3,77	0,28442	3,2592
Erro puro	159,13	12	13,26		
Total	923177,95	17	54304,58		

A reta da regressão apresentou um $R^2 = 0,99981$, calculado pela relação entre a soma quadrática devido a regressão e a soma quadrática total

$$R^2 = \frac{SQ \text{ reg}}{SQ \text{ tot}} = \frac{923003,7328}{923177,9489} = 0,99981.$$

$$SQ \text{ tot} = 923177,9489$$

O valor máximo que R^2 poderia assumir pode ser dado pela expressão

$$R^2 = \frac{SQ \text{ tot} - SQ \text{ erp}}{SQ \text{ tot}} = \frac{923177,9489 - 159,1295369}{923177,9489} = 0,99982$$

O modelo conseguiu explicar 99,99% da variância explicável máxima, o que pode ser considerado um valor satisfatório.

O gráfico dos resíduos (Figura 4) mostra que o modelo está bem ajustado, os resíduos estão distribuídos aleatoriamente.

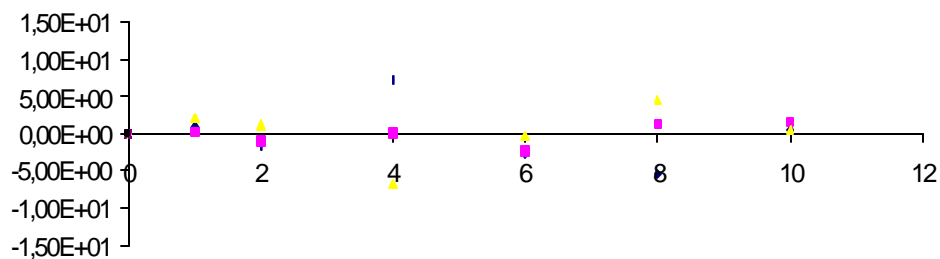


Figura 4. Gráfico dos resíduos deixados pelas três curvas de calibração.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Observada a linearidade da curva de calibração, foi determinado o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) (Tabela 3). Para realizar estes cálculos foi utilizados o desvio padrão do menor ponto da curva de calibração e o coeficiente angular da equação da reta.

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{ic} \quad \Rightarrow \quad LD = \frac{0,751 \times 3,3}{71,1165} = 0,035 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$LQ = \frac{DP \times 3,3}{ic} \quad \Rightarrow \quad LQ = \frac{0,751 \times 5}{71,1165} = 0,053 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Tabela 3. Limites de detecção e quantificação.

Limites	Concentração (mg/ml)
Detecção	0,035
Quantificação	0,053

Precisão

A precisão do método foi realizada por dois analistas diferentes, através de seis determinações da concentração de 6 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 4), onde foram obtidos desvio padrão e coeficiente de variação aceitáveis, ou seja, não admitindo valores para estes dados estatísticos superiores a 15%.

Tabela 4. Precisão do método analítico.

Número de Determinações	Analista 1 (mg/ml)	Analista 2 (mg/ml)
01	6.03	6.07
02	6.07	6.10
03	6.07	6.13
04	6.06	6.13
05	6.06	6.16
06	6.06	6.19
Média	6.06	6.14
DP	0.01	0.05
CV(%)	0.23	0.66

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variância

Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada intradias e interdias com três concentrações diferentes (baixa, média e alta). As determinações foram feitas nas concentrações de 01µg/ml; 06µg/ml e 10µg/ml os resultados intradia estão expressos nas tabelas 5a e 5b. Os resultados inter-dia estão expressos na tabela 6.

Tabela 5a. Análise intradia (período manhã)

Número de Determinação	Concentração baixa 01µg/ml	Concentração média 06µg/ml	Concentração alta 10µg/ml
01	1.00	5.95	10.05
02	1.02	5.96	10.02
03	1.02	5.97	9.98
Média	1.02	5.96	10.02
DP	0.01	0.01	0.03
CV %	0.57	0.12	0.28
Exatidão %	101.65	99.38	100.20

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variância

Tabela 5b. Análise intradia (período tarde)

Número de Determinação	Concentração baixa 01µg/ml	Concentração média 06µg/ml	Concentração alta 10µg/ml
01	1.00	5.98	9.99
02	0.99	5.99	9.99
03	1.01	6.01	10.01
Média	1.00	5.99	10.00
DP	0.01	0.01	0.01
CV %	0.79	0.18	0.09
Exatidão %	100.32	99.88	100.04

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variância

Tabela 6. Análise intradia.

Número de Determinação	Concentração baixa 01µg/ml	Concentração média 06µg/ml	Concentração alta 10µg/ml
Dia 1	1.00	5.95	10.05
Dia 2	1.03	6.08	10.04
Dia 3	1.04	5.91	9.96
Média	1.03	5.98	10.02
DP	0.02	0.07	0.04
CV %	1.53	1.19	0.42
Exatidão %	103.03	99.70	100.19

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variância

A análise de variância para a exatidão, intradia e interdia, foi realizada por concentrações individuais do analito, conforme mostra tabela 7a e 7b (ensaio intradia) e 8 (interdia).

Tabela 7a. ANOVA intradia (período manhã)

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.000577	2	0.000289	1.110515	0.388754	5.143249
Dentro dos grupos	0.00156	6	0.00026			
Total	0.002137	8				

Tabela 7b. ANOVA intradia (período tarde)

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.004369	2	0.002185	1.01085	0.418461	5.143249
Dentro dos grupos	0.012967	6	0.002161			
Total	0.017337	8				

Tabela 8. ANOVA interdia

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.003582	2	0.001791	2.219817	0.189844	5.143249
Dentro dos grupos	0.00484	6	0.000807			
Total	0.008422	8				

Robustez

O resultado da robustez descritos na tabela 9 e 10, mostra a variação dos tempos de retenção em função da mudança na proporção da fase móvel e do fluxo.

Tabela 9. Proporção da Fase móvel de (80:20)

Parâmetros Fase	Fluxo 1 ml/min		Fluxo 1,5 ml/min	
	Área	TR	Área	TR
MÓVEL				
MEOH/Tampão pH7,4 (70:30)	735.03	3.25	489.60	2.17
	739.31	3.26	489.50	2.17
	752.96	3.27	492.19	2.17
Média	742.43	3.25	490.43	2.17
DP	7.64	0.002	1.25	0.001
CV %	1.03	0.063	0.25	0.057

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variância

Tabela 10. Proporção da **Fase móvel de (70:30)**

Parâmetros Fase	Fluxo 1 ml/min		Fluxo 1,5 ml/min	
	Área	TR	Área	TR
MEOH/Tampão pH7,4 (70:30)	702.73	4.00	473.37	2.66
	707.12	3.97	472.37	2.66
	708.65	3.96	472.68	2.66
<i>Média</i>	706.17	3.98	472.81	2.66
DP	2.51	0.015	0.42	0.0009
CV %	0.35	0.38	0.08	0.04

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variância

Referências

ANVISA. Resolução – RE nº 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 março de 2002.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part 1: An integrated approach. J. Pharm. And Biomed. Analysis, 24, 755-767, 2001.

FDA - Food and Drug Administration. Guidance for industry bioanalytical method validation, U.S. Department of health and human services. May 2001.

LEITE, F. Validação em análise química. 3 ed. São Paulo: Átomo, 24-224, 1998.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos. Química Nova, 19 (3), 268-277, 1996,.

SWARTZ, M. R.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. Pharmaceutic Technology, 2 (1), 12-20, 1998.

US Pharmacopeia XXV, 2002. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, pp. 2256-2259.

WIELING, J.; HENDRIKS, G.; TAMMINGA, W. J.; HEMPENIUS, J.; MENSINK, C. K.; OOSTERHUIS, B. JONKMAN, J. H. G. Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. J. of Chromatography A, 730, 381-394, 1996.

Normas do *Journal of Microencapsulation*



The *Journal of Microencapsulation* is a well-established journal devoted to the preparation, properties and uses of individually encapsulated small particles. Its scope extends beyond microcapsules to all other small particulate systems which involve preparative manipulation. These forms find a wide variety of medical, biological, industrial and research applications. The journal covers the chemistry of encapsulation materials; the physics of release through the capsule wall; the techniques of preparation; content and storage; and the many uses to which microcapsules are put. Also found in every issue of the journal is an extensive information and reference section comprising patent briefing and literature alerts listings.

Submitting a paper to *Journal of Microencapsulation*

Please read these Guidelines with care and attention: failure to follow them may result in your paper being delayed. Note especially the referencing conventions used by *Journal of Microencapsulation*.

Journal of Microencapsulation considers all manuscripts on condition they are the property (copyright) of the submitting author(s) and that copyright will be transferred to *Journal of Microencapsulation* and Taylor & Francis Ltd if the paper is accepted.

Journal of Microencapsulation considers all manuscripts on the strict condition that they have been submitted only to *Journal of Microencapsulation*, that they have not been published already, nor are they under consideration for publication, nor in press elsewhere. Authors who fail to adhere to this condition will be charged all costs which *Journal of Microencapsulation* incurs, and their papers will not be published.

Writing your paper

- The manuscript should be typed on one side of good quality A4 (21x29.6cm) paper with double line spacing and wide margins throughout.
- In writing your paper, you are encouraged to review articles in the area you are addressing which have been previously published in the journal, and where you feel appropriate, to reference them. This will enhance context, coherence, and continuity for our readers.
- New submissions should be sent in triplicate. Manuscripts will not normally be returned unless the author includes a reply-paid postage label.

- The title page should contain the complete title of the manuscript, names and affiliations of all authors, name, address, telephone and fax numbers for correspondence, and a short title (running head) of not more than 45 characters.
- The abstract (250 words) should summarize the major findings and conclusions. Do not cite references in the summary.
- Keywords; up to five words or phrases that encapsulate the significant content of the paper should be provided.
- Introduction, results, discussion and experimental procedures should conform to standard scientific reporting style. Sufficient data must be given so that the study can be duplicated.
- Authors should include telephone and fax numbers as well as e-mail addresses on the cover page of manuscripts.
- Accepted manuscripts in their **final, revised versions**, should also be submitted as electronic word processing files on disk - see 'Electronic Processing'.

Nomenclature and units

All abbreviations and units should conform to SI practice. Drugs should be referred to by generic names; trade names of substances, their sources, and details of manufacturers of scientific instruments should be given only if the information is important to the evaluation of the experimental data.

Copyright permission

Contributors are required to secure permission for the reproduction of any figure, table, or extensive (more than fifty word) extract from the text, from a source which is copyrighted - or owned - by a party other than Taylor & Francis or the contributor.

This applies both to direct reproduction or 'derivative reproduction' - when the contributor has created a new figure or table which derives substantially from a copyrighted source.

The following form of words can be used in seeking permission:

Dear [COPYRIGHT HOLDER]

I/we are preparing for publication an article entitled

[STATE TITLE]

to be published by Taylor & Francis Ltd in *Journal of Microencapsulation*.

I/we should be grateful if you would grant us permission to include the following materials:

[STATE FIGURE NUMBER AND ORIGINAL SOURCE]

We are requesting non-exclusive rights in this edition and in all forms. It is understood, of course, that full acknowledgement will be given to the source.

Please note that Taylor & Francis are signatories of and respect the spirit of the STM Agreement regarding the free sharing and dissemination of scholarly information.

Your prompt consideration of this request would be greatly appreciated.

Yours faithfully

Code of experimental ethics and practice

Contributors are required to follow the procedures in force in their countries which govern the ethics of work done with human or animal subjects. The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) represents a minimal requirement.

When experimental animals are used, state the species, strain, number used, and other pertinent descriptive characteristics.

For human subjects or patients, describe their characteristics.

When describing surgical procedures on animals, identify the pre anaesthetic and anaesthetic agents used and state the amount of concentration and the route and frequency of administration for each. The use of paralytic agents, such as curare or succinylcholine, is not an acceptable substitute for anaesthetics. For other invasive procedures on animals, report the analgesic or tranquilizing drugs used; if none were used, provide justification for such exclusion.

When reporting studies on unanaesthetized animals or on humans, indicate that the procedures followed were in accordance with institutional guidelines.

Abstracts

Structured abstracts are required for all papers, and should be submitted as detailed below, following the title and author's name and address, preceding the main text.

For papers reporting original research, state the **primary objective** and any hypothesis tested; describe the **research design** and your reasons for adopting that methodology; state the **methods and procedures** employed, state the **main outcomes and results**, and state the **conclusions** that might be drawn from these data and results, including their implications for further research or application/practice.

For review papers, state the **primary objective** of the review; the reasoning behind your literature selection; and the way you critically analyse the literature; state the **main outcomes and results** of your review; and state the **conclusions** that might be drawn, including their implications for further research or application/practice.

Abstracts should not exceed 250 words.

Notes on style

Some specific points of style for the text of research papers, and reviews follow:

1. We prefer US to 'American', USA to 'United States', and UK to 'United Kingdom'.
2. We use conservative (British, not US, spelling, i.e. colour not color; behaviour (behavioural) not behavior; [school] programme not program; [he] practises not practices; centre not center; organization not organisation; analyse not analyze, etc.
3. Single 'quotes' are used for quotations rather than double "quotes", unless the 'quote is "within" another quote'.
4. Punctuation should follow the British style, e.g. 'quotes precede punctuation'.
5. Punctuation of common abbreviations should follow the following conventions: e.g. i.e. cf. Note that such abbreviations are not followed by a comma or a (double) point/period.
6. Dashes (M-dash) should be clearly indicated in manuscripts by way of either a clear dash (—) or a triple hyphen (---) (N-dash) should be indicated by a clear dash (–) or a double hyphen (--).
7. We are sparing in our use of the upper case in headings and references, e.g. only the first word in paper titles and all subheads is in upper case; titles of papers from journals in the references and other places are not in upper case.

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

9. All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelled out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. 'The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s ...'. Subsequently, 'The APU studies of achievement ...', in a reference ... (Department of Education and Science [DES] 1989a).

10. Brief biographical details of significant national figures should be outlined in the text unless it is quite clear that the person concerned would be known internationally. Some suggested editorial emendations to a 'typical' text are indicated in the following with square brackets: 'From the time of H. E. Armstrong [in the 19th century] to the curriculum development work associated with the Nuffield Foundation [in the 1960s], there has been a shift from heurism to constructivism in the design of [British] science courses'.

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

12. Material to be emphasized (italicized in the printed version) should be underlined in the typescript rather than italicized. Please use such emphasis sparingly.

13. *n* (not N), % (not per cent) should be used in typescripts.

14. Numbers in text should take the following forms: 300, 3000, 30 000. Spell out numbers under 10 unless used with a unit of measure, e.g. nine pupils but 9 mm (do not introduce periods with measure). For decimals, use the form 0.05 (not .05).

15. When using a word which is or is asserted to be a proprietary term or trade mark authors' must use the symbol ® or TM or alternatively a footnote can be inserted using the wording below:

This article includes a word which is or is asserted to be a proprietary term or trade mark. Its inclusion does not imply it has acquired for legal purposes a non-proprietary or general significance, nor is any other judgement implied concerning its legal status.

Mathematics

Special care should be taken with mathematical scripts, especially subscripts and superscripts and differentiation between the letter 'ell' and the figure one, and the letter 'oh' and the figure zero. If your keyboard does not have the characters you need, it is preferable to use longhand, in which case it is important to differentiate between capital and small letters, K, k and x and other similar groups of letters. Special symbols should be highlighted in the text and explained in the margin. In some cases it is helpful to supply annotated lists of symbols for the guidance of the sub-editor and the typesetter, and/or a 'Nomenclature' section preceding the 'Introduction'.

For simple fractions in the text, the solidus / should be used instead of a horizontal line, care being taken to insert parentheses where necessary to avoid ambiguity, for example, $I/(n-1)$. Exceptions are the proper fractions available as single type on a keyboard.

Full formulae or equations should be displayed, that is, written on a separate line. Horizontal lines are preferable to solidi.

The solidus is not generally used for units: ms^{-1} not m/s, but note electrons/s, counts/channel, etc.

Displayed equations referred to in the text should be numbered serially (1, 2, etc.) on the right hand side of the page. Short expressions not referred to by any number will usually be incorporated in the text.

Symbols should not be underlined to indicate fonts except for tensors, vectors and matrices, which are indicated with a wavy line in the manuscript (not with a straight arrow or arrow above) and rendered in heavy type in print: upright sans serif **r** (tensor), sloping serif **r** (vector) upright serif **r** (matrix).

Typographical requirements must be clearly indicated at their first occurrence, e.g. Greek, Roman, script, sans serif, bold, italic. Authors will be charged for corrections at proof stage resulting from a failure to do so.

Braces, brackets and parentheses are used in the order $\{[()]\}$, except where mathematical convention dictates otherwise (i.e. square brackets for commutators and anticommutators).

Notes on tables and figures

Artwork submitted for publication will not be returned and will be destroyed after publication, unless you request otherwise. Whilst every care is taken of artwork, neither the Editor nor Taylor & Francis shall bear any responsibility or liability for non-return, loss, or damage of artwork, nor for any associated costs or compensation. You are strongly advised to insure appropriately.

1. Tables and figures should be valuable, relevant, and visually attractive. Tables and figures must be referred to in the text and numbered in order of their appearance. Each table and figure should have a complete, descriptive title; and each table column an appropriate heading.

Tables and figures should be referred to in text as follows: figure 1, table 1, i.e. lower case. 'As seen in table [or figure] 1 ...' (not Tab., fig. or Fig).

2. The place at which a table or figure is to be inserted in the printed text should be indicated clearly on a manuscript:

[Insert table 2 about here]

3. Each table and/or figure must have a title that explains its purpose without reference to the text.

4. All figures and tables must be on separate sheets and not embedded in the text. Original copies of figures should be supplied. All figures should allow for reduction to column width (130 mm) or page width (160mm). Please avoid figures that would require landscape reproduction, i.e., reading from bottom to top of the page. Photographs may be sent as glossy prints or negatives.

Please number each figure on the reverse in pencil.

Do not type the caption to a figure on that figure; the legends to any illustrations must be typed separately following the main text and should be grouped together.

Acknowledgements

Any acknowledgements authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript.

Citations in text

References should be cited using the author-date, or Harvard, system.

1. 'Ibid.' (and the like) are not used when repeating citations. Simply repeat the original citation verbatim, e.g. (Orwell 1945).

2. Citations should be included in prefatory material to quotes (wherever possible) rather than placing them at the end. Thus, for example, 'Orwell (1945: 23) reduces the principles of animalism to seven commandments, namely, ...' is preferred to 'Orwell reduced the principles of animalism to seven commandments, namely, ... (Orwell 1945: 23)'.

3. Multiple citations within parentheses should be divided by a comma, not a semi-colon, and there should be no use of '&' within such multiple references. References to works published in the same year should be cited as, e.g. (Smith 1991a, b).

4. Multiple citations within a text should be ordered by date, not alphabetically by authors name, e.g. (Smith 1902, Jones and Bower 1934, Brown 1955, 1958a, b, Green 1995).
5. 'et al.' may be used in references within the text when a paper or book has three or more authors, but note that all names should be given in the reference itself.
6. Page spans in references should be given in full, e.g. 'Sedgewick (1935: 102-103; emphasis added) outlines them as follows:'.

References

1. Reference to a book:

Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F., 1986, *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach* (Oxford: IRL Press).

2. Reference to a chapter in a book:

Carney, S. L., 1986, Proteoglycans in membranes. In *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, edited by M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (Oxford, IRL Press).

3. Reference to an article in a journal:

Ervasti, J. M., Kahl, S. D., and Campbell, K. P., 1991, Purification of dystrophin from skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 9161 - 9165.

4. Reference to a newspaper or magazine

Richards, H., 1996, Republican lite? *The Times Higher Education Supplement*, 1 November, 16.

5. Reference to an Internet source

Give the universal resource locator in full:

<http://acsinfo.acs.org/instruct/instruct.html>

6. Reference to a personal communication (in text only)

(Brannen, J., 1996, Personal communication).

7. Reference to a case in law

In text, italicize names of plaintiffs and defendants:

Miranda v. Arizona 1974

8. Reference to a report

Chang, R. R., Periera-Rosario, R., and Rudnic, E. M., 1990, International Patent #WO 90/016107.

9. Reference to proceedings

Shelly, K., Feakes, D. A., Hawthorne, M. F., Schmidt, P. G., Krisch, T. A., and Bauer, F., 1992, Model studies directed toward the boron neutron-capture therapy of cancer: Boron delivery to murine tumors with liposomes. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **89**, 9039–9043.

9. Reference to government legislation

US Congress, Senate Committee on Foreign Relations, 1956, *The Mutual Security Act of 1956*, 84th Congress, second session, report 2273.

US Congress, House Committee on Banking & Currency, 1945, *Bretton Woods Agreements Act: Hearings on HR 3314*, 79th Congress, first session, report 452.

Electronic Processing

We strongly encourage you to send us the **final, revised version** of your article in both hard (paper) and electronic (disk) forms. This Guide sets out the procedures which will assure we can process your article efficiently. It is divided into three sections:

1. a guide for authors using standard word-processing software packages
2. a guide for authors using LaTeX mathematical software packages
3. a guide for authors using graphics software packages

There are some general rules which apply to all three options.

- these guides do not apply to authors who are submitting an article for consideration and peer review; they apply only to authors whose articles have been reviewed, revised, and accepted for publication
- print out your hard (paper) copy from the disk you are sending; it is essential that the hard-copy printout is identical to the material on the disk; where versions differ, the hard copy will take precedence. We advise that you maintain back-ups of your files
- save and send your files on a standard 3.5 inch high density disk (Mac or PC); please do not attempt to send the article via file transfer protocol or email
- when saving your article onto a disk, please make sure that the files do not exceed a manageable size. Please ensure that figures are saved on a separate disk
- ensure that the files are **not** saved as read only
- virus-check your disk before sending it to the Editor
- label your disk
- package disks in such a way as to avoid damage in the post
- disks are not returnable after publication

1. A guide for authors using standard word-processing software packages

For the main text of your article, most standard PC or Mac word-processing software packages are acceptable, although we prefer Microsoft Word in a PC format.

Word-processed files should be prepared according to the journal style.

Avoid the use of embedded footnotes. For numbered tables, use the table function provided with the word-processing package.

All text should be saved in one file with the complete text (including the title page, abstract, all sections of the body of the paper, references), followed by numbered tables and the figure captions.

You should send the following to the Editor:

- a 3.5-inch disk containing the final, accepted version of the paper
- include an ASCII/text only version on the disk as well as the word processed version if possible
- two hard copy printouts

Disks should be clearly labelled with the following information:

1. Journal title
2. Name of author
3. File names contained on disk
4. Hardware used (PC or Mac)
5. Software used (name and version)

2. A guide for authors using LaTeX mathematical software packages

Authors who wish to prepare their articles using the LaTeX document preparation system are advised to use `article.sty` (for LaTeX 2.09) or `article.cls` (for LaTeX2e).

The use of macros should be kept to an absolute minimum but if any are used they should be gathered together in the file, just before the `\begin{document}` command

You should send the following to the Editor:

- a 3.5-inch disk containing the final, accepted version of the paper
- the files you send must be text-only (often called an ASCII file), with no system-dependent control codes
- two hard copy printouts

Disks should be clearly labelled with the following information:

1. Journal title
2. Name of author
3. File names contained on disk
4. Hardware used (PC or Mac)
5. Software used (name and version)

3. A guide for authors using graphics software packages

We welcome figures on disk, but care and attention to these guidelines is essential, as importing graphics packages can often be problematic.

1. Figures must be saved on a separate disk from the text.
2. Avoid the use of colour and tints for aesthetic reasons. Figures should be produced as near to the finished size as possible.
3. High quality reproducible hard copy for all line figures (printed out from your electronic files at a minimum of 600 dpi) must be supplied in case the disks are unusable; photographs and transparencies can be accepted as hard copy only. Photocopies will not be accepted.
4. All figures must be numbered in the order in which they occur (e.g. figure 1, figure 2 etc.). In multi-part figures, each part should be labelled (e.g. figure 1 (a), figure 1 (b) etc.)
5. The figure captions must be saved as a separate file with the text and numbered correspondingly.
6. The filename for the graphic should be descriptive of the graphic e.g. Figure1, Figure 2a.
7. Files should be saved as TIFF (tagged image file format), PostScript or EPS (encapsulated PostScript), containing all the necessary font information and the source file of the application (e.g., CorelDraw/Mac, CorelDraw/PC).

Disks should be clearly labelled with the following information:

1. Journal title
2. Name of author
3. Figures contained on disk
4. Hardware used (PC or Mac)
5. Software used (name and version)