

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde

CAMILLA VILA NOVA SOARES SILVA

**ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO EM LIPOSSOMAS E
MICROESFERAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA EM
RATOS WISTAR**

Recife

2016

CAMILLA VILA NOVA SOARES SILVA

**ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO EM LIPOSSOMAS E
MICROESFERAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA EM
RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientador: Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

Recife

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Silva, Camilla Vila Nova Soares

Estudo da encapsulação de ácido gálico em lipossomas e microesferas e avaliação da atividade gastroprotetora em ratos Wistar. / Camilla Vila Nova Soares Silva. – Recife: O Autor, 2016.

130 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stella Santos Magalhães

Coorientadora: Noemia Pereira da Silva Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Nanotecnologia 2. Úlcera gástrica 3. Lipossomas I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orient.) II. Santos, Noemia Pereira da Silva (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-443

CAMILLA VILA NOVA SOARES SILVA

**ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO EM LIPOSSOMAS E
MICROESFERAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA EM
RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 15/09/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto
Núcleo de Ciências da Vida do Centro Acadêmico do Agreste – CAA/UFPE

Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti
Núcleo de Enfermagem do Centro Acadêmico de Vitória – CAV/UFPE

Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior
Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami – LIKA/UFPE

Dra. Milena Sales Ferraz
Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami – LIKA/UFPE

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

A José Freitas, por todo amor, cuidado e ajuda.

À Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos, pela oportunidade, confiança, paciência e por seu apoio durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, pelo auxílio e esforço para a concretização deste trabalho e pela oportunidade de participar do grupo de Sistemas de Liberação Controlada (SLC).

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás pela disponibilidade e auxílio na elaboração e análise de dados.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, coordenador do PPGBAS.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami – LIKA, por ceder as instalações físicas para realização deste trabalho.

A todos os colegas do grupo SLC, pela amizade, auxílio e saudável convivência em laboratório.

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

A José Alex, Sandrelly, Jefferson, Victor e Jéssica Andreia, pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos amigos Thiers, Rebecca, Milena, Laís, Círia e Danielle, pela amizade, colaboração, cumplicidade, palavras de incentivo e momentos de descontração.

Aos membros da banca examinadora, por suas contribuições e críticas construtivas.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) e ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV) pela disponibilidade da infraestrutura e suporte dado a este trabalho.

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

Aos funcionários do biotério do LIKA Maria Helena e Felipe pelos cuidados com os animais experimentais utilizados neste trabalho.

Aos técnicos da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE-PE) e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) - FIOCRUZ PE.

A todos os animais que participaram desta pesquisa doando suas vidas em prol deste estudo científico.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

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

RESUMO

Com o objetivo de criar um sistema de liberação controlada adequado para o tratamento da úlcera gástrica, este estudo propôs o desenvolvimento e caracterização de microesferas de PLGA (copolímero de ácido láctico e glicólico) contendo ácido gálico (AG), bem como de complexos de inclusão contendo ácido gálico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (AG:HP β CD) e sua encapsulação em lipossomas. Microesferas contendo ácido gálico foram obtidas, com tamanho médio de partícula de $15,89 \pm 1,33 \mu\text{m}$, índice de polidispersão 1,33, carga negativa e eficiência de encapsulação de $58,33 \pm 0,08 \%$. Foi realizada a indução de úlcera gástrica por indometacina em ratos Wistar. As análises histológicas mostraram que no grupo AG livre os animais permaneceram com média da área de muco no estômago semelhante ao grupo controle positivo, onde não houve indução de úlcera ($6,5 \pm 1,5 \mu\text{m}^2$ e $7,85 \pm 1,9 \mu\text{m}^2$). Por outro lado, o grupo Micro-AG exibiu uma área ($7,0 \pm 1,4 \mu\text{m}^2$) próxima ao grupo com úlcera não tratada ($6,05 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$), apresentando atividade antiulcerogênica moderada, mas sem potencialização do efeito do ácido gálico. A investigação dos danos epiteliais do grupo AG livre apresentou valores superiores aos demais grupos tratados ratificando novamente sua ação gastroprotetora. As análises de muco no duodeno a pH 2,5 revelaram uma área média de $14,5 \pm 13,7 \mu\text{m}^2$ para o grupo controle positivo, $5,3 \pm 3,42 \mu\text{m}^2$ para o controle negativo, $6,0 \pm 3,52 \mu\text{m}^2$ e $7,03 \pm 3,67 \mu\text{m}^2$ para os grupos AG livre e Micro-AG, respectivamente. Os resultados de caracterização dos complexos AG:HP β CD sugerem a formação de um complexo de inclusão. Lipossomas convencionais contendo complexo de inclusão AG:HP β CD apresentaram teor e uma eficiência de encapsulação de $97,20 \pm 1,54 \%$ e $91,66 \pm 0,16 \%$, respectivamente, com tamanho médio de partícula de $95,9 \pm 0,4 \text{ nm}$, índice de polidispersão de $0,39 \pm 0,02$, pH $6,7 \pm 0,05$ e carga positiva. Na forma de liófilos, permaneceram estáveis por 60 dias. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que os sistemas contendo ácido gálico desenvolvidos mostram-se promissores para utilização em testes de atividades biológicas, sendo a encapsulação do ácido gálico uma rota para superar suas limitações físico-químicas.

Palavras-chave: Ácido gálico. Úlcera. Microesferas. Complexos de inclusão. Lipossomas.

ABSTRACT

Aiming to create a suitable controlled release system for the treatment of gastric ulcer, this study suggested the development and characterization of PLGA microspheres containing gallic acid (GA) as well as inclusion complexes containing gallic acid:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (GA:HP β CD) and its encapsulation in liposomes. Microspheres containing gallic acid were obtained, with an average particle size of $15.89 \pm 1.33 \mu\text{m}$, polydispersity index of 1.33, negative charge and encapsulation efficiency of $58.33 \pm 0.08 \%$. Gastric ulcer was induced by indomethacin in Wistar rats. Histological analysis showed that free GA group have remained with an average area of mucus in the stomach similar to the group where there was no induction of ulcer ($6.5 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$ and $7.85 \pm 1.9 \mu\text{m}^2$). On the other hand, the Micro GA group exhibited an area ($7.0 \pm 1.4 \mu\text{m}^2$) next to the group treated with non ulcer ($6.05 \pm 1.7 \mu\text{m}^2$) with moderate antiulcer activity but no potentiation of gallic acid effect. The investigation of epithelial damage of free GA group had higher values than the other groups treated again confirming its gastroprotective action. The duodenum mucus analyzes at pH 2.5 showed an average area of $14.5 \pm 13.7 \mu\text{m}^2$ for the control group, $5.3 \pm 3.42 \mu\text{m}^2$ to the indomethacin group, $6.0 \pm 3.52 \mu\text{m}^2$ and $7.03 \pm 3.67 \mu\text{m}^2$ for free GA groups and Micro GA, respectively. The results of GA:HP β CD complexes characterization suggest the formation of an inclusion complex. Conventional liposomes containing GA:HP β CD inclusion complex presented content and encapsulation efficiency of $97.20\% \pm 1.54$ and $91.66 \pm 0.16\%$, respectively, with an average particle size of $95.9 \pm 0.4 \text{ nm}$, a polydispersity index of 0.39 ± 0.02 , pH 6.7 ± 0.05 and positive charge. Lyophilized liposomes remained stable for 60 days. Based on these results, we can conclude that the developed systems containing gallic acid show promise for use in in vivo anti-ulcer activity testing, being the gallic acid encapsulation a route to overcome their physicochemical limitations.

Keywords: Gallic acid. Ulcer. Microspheres. Inclusion complexes. Liposomes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

Figura 1 –	Considerações acerca da fisiopatologia da úlcera gástrica	18
Figura 2 –	Divisão anatômica do estômago	19
Figura 3 –	Tipos celulares da mucosa gástrica	20
Figura 4 –	Estrutura do ácido gálico	24
Figura 5 –	Estrutura química do (a) ácido gálico e do (b) ânion do ácido gálico	25
Figura 6 –	Estrutura química de uma ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) ilustrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE)	35
Figura 7 –	Estrutura molecular da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina	37
Figura 8 –	Esquema da associação entre ciclodextrina e molécula hóspede: (A) complexos de inclusão 1:1 e (B) complexos de inclusão 1:2	39
Figura 9 –	Método <i>freeze-drying</i> de preparação de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrinas	40
Figura 10 –	Diagrama de solubilidade de fases mostrando os tipos e subtipos de curvas A (A_L , A_P e A_N) e B (B_S e B_I)	41
Figura 11 –	Formação de estruturas fechadas em bicamadas a partir de fosfolípídeos em meio aquoso	44
Figura 12 –	Classificação dos lipossomas quanto ao número de bicamadas e tamanho	46
Figura 13 –	Classificação dos lipossomas quanto à sua constituição. A - Lipossoma convencional, B - Lipossoma furtivo, C - Lipossoma teranóstico e D – Lipossoma sítio-específico	48
Figura 14 –	Representação esquemática da classificação das micropartículas: (A) microesfera (sistema matricial) e (B) microcápsula (sistema reservatório)	49
Figura 15 –	Método de preparação de microesferas por emulsificação (o/a) e evaporação do solvente: (1) solubilização dos componentes	50

na fase oleosa orgânica, (2) mistura da fase orgânica com a fase contínua contendo emulsificante sob agitação, (3) evaporação do solvente, (4) separação das microesferas

Capítulo I

Figura 1 –	Microscopia eletrônica de varredura de microesferas brancas de PLGA (a) e contendo ácido gálico (Micro-AG) (b). Magnificação de 1000x	74
Figura 2 –	Análise histomorfométrica da área contendo muco em epitélio glandular do estômago de ratos Wistar, apresentando (setas) células com muco (mucinas). A – Controle positivo, B – Controle negativo, C – AG livre, D – Micro-AG. Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b)	75
Figura 3 –	Análise histomorfométrica da área contendo muco em Alcian Blue pH-2,5 (a) e pH-1,0 (b) em epitélio glandular do estômago de ratos. a e b são diferentes estatisticamente ($p<0,05$)	76
Figura 4 –	Análise histopatológica e histomorfométrica da espessura do epitélio glandular do estômago de ratos Wistar. (a) Controle positivo, (b) Controle negativo, (c) AG livre, (d) Micro-AG. G - Epitélio glandular, MM – Muscular da mucosa, Ec - Esfoliação celular, Fg - Fosseta gástrica	77
Figura 5 –	Análise histomorfométrica da espessura (μm) do epitélio glandular do estômago de ratos Wistar. a , b , c e d são diferentes estatisticamente ($p<0,05$)	78
Figura 6 –	Análise histomorfométrica da área contendo muco em epitélio glandular do duodeno de ratos Wistar, apresentando (setas) células com muco (mucinas). A – Controle positivo, B – Controle negativo, C – AG livre, D – Micro-AG. Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b)	79
Figura 7 –	Análise histomorfométrica da área contendo muco em Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b) em epitélio glandular do duodeno de ratos. a e b são diferentes estatisticamente ($p<0,05$)	80

Figura 8 –	Análise histomorfométrica da espessura (μm) do epitélio glandular (a) e vilosidades duodenais (b) de ratos Wistar. a, b, c e d são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$)	81
------------	--	----

Capítulo II

Figura 1 –	Micrografia eletrônica de varredura do ácido gálico (a), HP β CD (b), mistura física (c) e complexo de inclusão AG:HP β CD (d). Magnificação de 1000x	98
------------	---	----

Capítulo III

Figure 1 –	Chemical structure of diffractaic acid ($\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_7$, MW = 374 g/mol).	108
Figure 2 –	Phase-solubility diagram of diffractaic acid (DA) in the presence of HP- β -CD in water at 25 °C.	109
Figure 3 –	Infrared spectra of diffractaic acid (a), 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) (b), DA:HP- β -CD inclusion complex (c) and physical mixture (d).	110
Figure 4 –	X-ray powder diffraction patterns of diffractaic acid (a), physical mixture (b), DA:HP- β -CD inclusion complex (c) and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) (d).	111
Figure 5 –	Thermogravimetric analyses of diffractaic acid (a), 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) (b), physical mixture (c) and DA:HP- β -CD inclusion complex (d).	111
Figure 6 –	Differential scanner calorimetry of diffractaic acid (a), 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) (b), physical mixture (c) and DA:HP- β -CD inclusion complex (d).	111
Figure 7 –	Environmental scanning electron microscopy of DA (a), HP- β -CD (b), DA and HP- β -CD physical mixture (c) and DA:HP- β -CD inclusion complex (d) using magnification of 500x.	112
Figure 8 –	Optimized geometries found for DA:1xHP- β -CD inclusion complexes formed by: metoxy (a) and carboxylic (b) moieties; and DA:2xHP- β -CD inclusion complex (c). The emphasised	113

lines represent two hydrogen bonds between the carboxylic moiety of DA and HP- β -CD.

- Figure 9 – Environmental scanning electron microscopy of PCL unloaded MS (a) (magnification of 1500 $\times$), DA-MS (b) (magnification of 1000 $\times$) and DA:HP- β -CD-MS (c) (magnification of 1000 $\times$). 114
- Figure 10 – Release kinetics of diffractaic acid from microspheres formulations in pH 7.4 buffer at 37 °C: DA-MS (■) and DA:HP- β -CD-MS (●). Each point represents the mean of three different experiments $\pm$ S.D. The lines represent the data fit using nonlinear Fickian diffusion model. 114
- Figure 11 – Evaluation of the cytotoxicity of diffractaic acid (DA), inclusion complex (DA:HP- β -CD), microspheres containing diffractaic acid (DA-MS) and microspheres containing inclusion complex (DA:HP- β -CD-MS) in different concentrations (6.5, 13, 26 and 52 μ g/ml) in front of Vero cells. *Statistically significant differences of formulations were compared with diffractaic acid ($p < 0.05$). 115

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1 –	Dados de IC ₅₀ e mecanismos de ação do ácido gálico frente a linhagens de células cancerígenas	27
Tabela 2 –	Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas	36

Capítulo I

Tabela 1 –	Eficiência de encapsulação, tamanho médio de partícula (d_v), polidispersão (<i>span</i>) e potencial zeta (ζ) de microesferas de PLGA (225 mg) na razão fármaco:polímero 1:11	72
------------	--	----

Capítulo II

Tabela 1 –	Tamanho de partícula, índice de polidispersão, pH e potencial zeta dos lipossomas obtidos	99
Tabela 2 –	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH de lipossomas com AG:HP β CD, antes e após os testes de estresse mecânico e centrifugação	100
Tabela 3 –	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH de Lipossomas com AG:HP β CD em tempos pré-determinados	101

Capítulo III

Table 1 –	¹ H NMR signals of DA and DA:HP- β -CD inclusion complex (shifts observed in signals of DA).	110
Table 2 –	¹ H NMR signals of HP β -CD and DA:HP- β -CD inclusion complex (shifts observed in signals of HP β -CD).	110
Table 3 –	Pre-formulation study of DA-loaded PCL microspheres at different drug:polymer ratios.	112
Table 4 –	Drug content, encapsulation efficiency, mean particle size (d_v), span and zeta potential (ζ) of PCL microspheres.	113
Table 5 –	Burst effect and release kinetic parameters (k_1 and k_2) to PCL microspheres containing DA or DA:HP- β -CD inclusion complex.	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido gálico
AG:HP β CD	Complexo de inclusão ácido gálico e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
CDs	Ciclodextrinas
CH	Colesterol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ECI	Enterocromafinas
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
HCl	Ácido clorídrico
HClO	Ácido hipocloroso
HP β CD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
IV	Infravermelho
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MG1	Monossialogangliosídeo 1
MIC	Concentração inibitória mínima
MLV	Vesículas multilamelares grandes
MPO	Mieloperoxidase
NBF	Formol neutro tamponado
PC	Fosfatidilcolina
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PDI	Índice de Polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
PGA	Polímero de ácido glicólico
PLA	Polímero de ácido láctico
PLGA	Copolímero de ácido láctico e glicólico
PSC	Espectroscopia de correlação de fótons
PVA	Álcool polivinílico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SA	Estearilamina

SUV	Vesículas unilamelares pequenas
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mL

LISTA DE SIMBOLOS

%	Por cento
±	Mais/menos
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
g	Grama
Hz	Hertz
h	Hora
Kg	Quilograma
m	Metro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
mm ³	Milimetro Cúbico
Mol/%	Mol por cento
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo Geral	17
1.1.2 Objetivos Específicos	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 ÚLCERA GÁSTRICA	18
2.1.1 Tratamento farmacológico da úlcera gástrica	22
2.2 ÁCIDO GÁLICO	23
2.2.1 Propriedades físico-químicas do ácido gálico	23
2.2.2 Propriedades farmacológicas do ácido gálico	26
2.2.2.1 Atividade antitumoral	27
2.2.2.2 Atividade antioxidante	28
2.2.2.3 Atividade neuroprotetora	29
2.2.2.4 Atividade antidiabética e antialérgica	29
2.2.2.5 Atividade nefroprotetora e hepatoprotetora	31
2.2.2.6 Atividade antimelanogênica	30
2.2.2.7 Atividade antiviral	30
2.2.2.8 Atividade antibacteriana	31
2.2.2.9 Atividade anti-inflamatória	31
2.2.2.10 Atividade gastroprotetora	32
2.2.3 Tecnologia farmacêutica aplicada ao ácido gálico	33
2.3 CICLODEXTRINAS	35
2.3.1 Complexos de inclusão com ciclodextrinas	38
2.3.2 Preparação e caracterização de complexos de inclusão com ciclodextrinas	39
2.3.3 Utilização de ciclodextrinas	42
2.4 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA: SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	43
2.4.1 Lipossomas	44
2.4.2 Microesferas	48
REFERÊNCIAS	52

CAPÍTULO I

Microesferas contendo ácido gálico e avaliação da atividade gastroprotetora em ratos Wistar	63
---	----

CAPÍTULO II

Desenvolvimento de lipossomas contendo complexo de inclusão ácido gálico:ciclodextrinas	86
---	----

CAPÍTULO III

Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP- β -CD inclusion complex encapsulated in microspheres	106
---	-----

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
------------------------	-----

ANEXOS	118
--------	-----

1 INTRODUÇÃO

As úlceras são doenças caracterizadas por lesões ulcerosas agudas ou crônicas que podem aparecer em qualquer porção do trato gastrointestinal quando exposta à ação agressiva do suco ácido-péptico. Estas doenças são geralmente associadas a danos causados na mucosa gástrica, constituindo um agravo de mal estar provocado por inúmeros fatores desencadeantes com sintomas ligados aos reflexos orgânicos mais comuns como: dores estomacais, náuseas, hemorragias, entre outras (CALAM; BARON, 2001).

Esse tipo de lesão leva à necrose que acomete toda a superfície da mucosa gástrica e possivelmente a camada muscular (HALTER et al., 1995). Sua prevalência é de 8 a 10% da população dos países industrializados, acreditando-se que a incidência desta patologia ocorra devido a jornadas de trabalho estressantes, maus hábitos alimentares, uso contínuo de café, álcool e tabaco, os quais são fatores predisponentes para redução da defesa da mucosa gástrica (NASCIMENTO, 2013).

Atualmente, com casos da doença em ascensão, há um grande interesse no estudo de compostos bioativos que previnam o aparecimento dessas lesões e/ou estimulem uma aceleração no reparo das úlceras, diminuindo assim o tempo de tratamento. Consequentemente, promovendo uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes, uma vez que as características clínico-epidemiológicas da úlcera conferem um problema de saúde pública (KUTTY, et al., 2005, LIU et al., 2015).

O ácido gálico (AG), ácido 3,4,5-triidróxi-benzóico, é uma substância fenólica, intermediária do metabolismo secundário de plantas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). É conhecido por apresentar uma grande variedade de funções biológicas, como antioxidante (FIUZA et al., 2004), antimicrobiana (DÍAZ-GÓMEZ et al., 2013; NEO et al., 2013) e antitumoral, apresentando citotoxicidade seletiva para células cancerígenas e baixa citotoxicidade para células saudáveis, fazendo deste fármaco uma importante biomolécula para uso terapêutico (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

Apesar de suas promissoras atividades biológicas, o uso terapêutico do ácido gálico apresenta limitações, pois o mesmo apresenta-se como sendo facilmente oxidável, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais (como ferro e manganês), da luz, do calor, e na presença de oxigênio ou em

meio alcalino, resultando no escurecimento de suas soluções (ROSA et al., 2013). Partindo disto, o uso da nanotecnologia surge como uma alternativa eficaz para remediar estas propriedades limitantes.

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

Nas últimas décadas, a tecnologia farmacêutica contribuiu fortemente para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos para variadas aplicações terapêuticas (TORCHILIN, 2012). Esta área das ciências farmacêuticas está envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SAKATA et al., 2007). O emprego de várias técnicas de encapsulação, aplicados a extratos e/ou compostos polifenólicos de plantas confirmaram que a encapsulação é um meio atraente para potencializar suas atividades (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Dentre os sistemas nanotecnológicos de liberação controlada de fármacos destacam-se lipossomas, que são vesículas contendo uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Estes sistemas possuem a capacidade de carrear tanto fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos, são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos (BATISTA et al., 2007).

Da mesma forma, os sistemas particulados poliméricos, como as microesferas, trazem perspectivas científicas promissoras, uma vez que apresentam estabilidade físico-química e biológica, já sendo utilizados para a encapsulação de várias substâncias, tais como: proteínas (BENOIT et al. 1999), antígenos (FLORINDO et al., 2008) e fármacos (LE RAY et al., 2003; PETITTI et al., 2009). Na obtenção desses sistemas, polímeros sintéticos biodegradáveis são utilizados, com

destaque para o copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO et al., 2008).

Diante do abordado, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar complexos de inclusão contendo ácido gálico, visando conferir proteção e preservação a fim de aumentar o seu potencial biológico, promovendo sua encapsulação em lipossomas e avaliação de sua capacidade antiúlcera, bem como o desenvolvimento de microesferas de PLGA contendo ácido gálico e a avaliação de potencial atividade gastroprotetora.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar a encapsulação de ácido gálico em lipossomas e microesferas e avaliar a atividade gastroprotetora e antiulcerogênica em ratos Wistar.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Obter e caracterizar complexos de inclusão ácido gálico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina;
- b) Preparar e caracterizar lipossomas contendo complexos de inclusão ácido gálico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina;
- c) Preparar microesferas de PLGA contendo ácido gálico;
- d) Realizar estudos de estabilidade acelerada e a longo prazo dos lipossomas obtidos;
- e) Determinar as características físico-químicas dos sistemas obtidos;
- f) Investigar a ação gastroprotetora in vivo do ácido gálico livre e encapsulado em microesferas;
- g) Avaliar histologicamente as úlceras gastroduodenais induzidas.

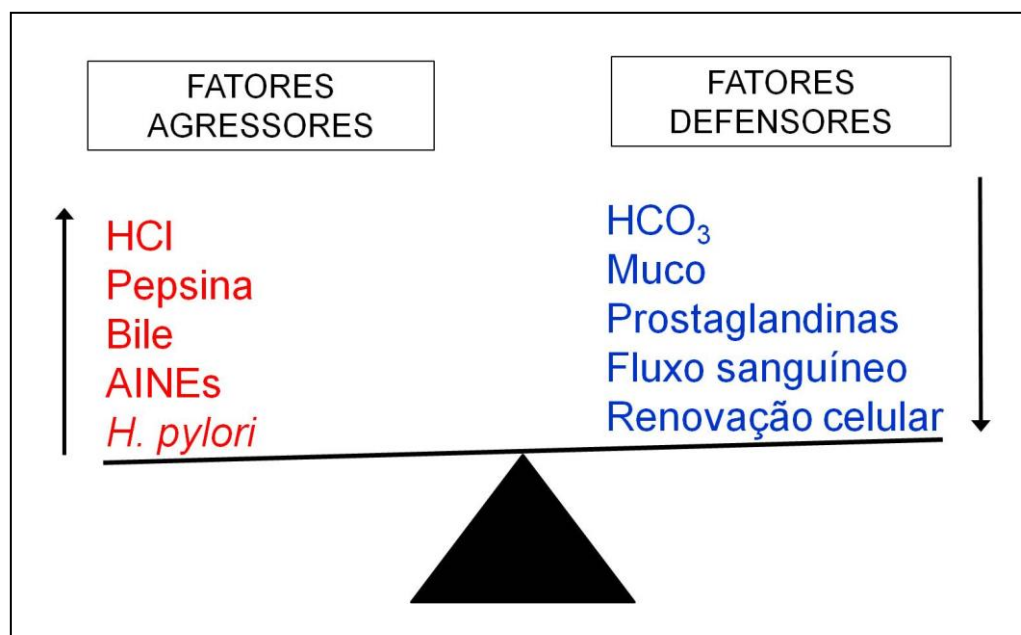
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÚLCERA GÁSTRICA

A úlcera gástrica é uma lesão profunda da mucosa, que pode destruir tanto os componentes do tecido epitelial como do conectivo, incluindo células do músculo liso, vasos e nervos (MILANI; CALABRO, 2001). Apesar de a etiologia desta doença ainda não ser totalmente conhecida, uma vez que muitos fatores estão envolvidos em sua gênese, é uma patologia que afeta um número considerável de pessoas em todo o mundo (CARVALHO, 2000). Quando não tratadas, as complicações podem ocorrer em até 30% dos pacientes com úlcera e incluem hemorragia digestiva alta (20%), perfuração (6%) e obstrução piloro-duodenal (4%), que são importantes causas de mortalidade (OFMAM, 2000).

A úlcera pode se desenvolver em qualquer idade, mas ocorre com maior frequência entre 50 e 70 anos e, quando acomete o duodeno, seu número é ligeiramente maior nos homens do que nas mulheres ao contrário das gástricas, que ocorre mais em mulheres. Esta doença pode se desenvolver quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores agressores e protetores que atuam no epitélio celular (Figura 1).

Figura 1 - Considerações acerca da fisiopatologia da úlcera gástrica



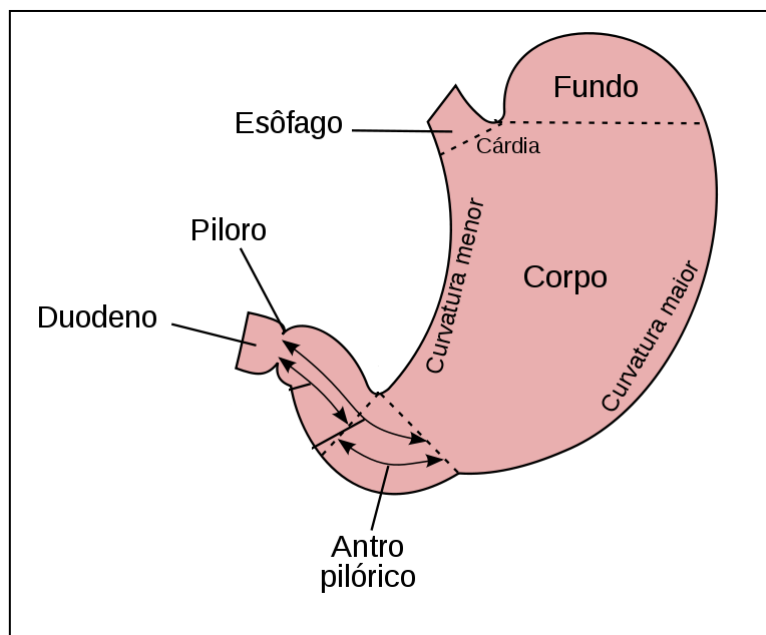
Fonte: A Autora (2016).

Alguns dos fatores agressivos mais comuns que afetam grande parte da população são: o *Helicobacter pylori*, ácido clorídrico (HCl), o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), pepsinas, ingestão de álcool, lesões relacionadas a isquemia, entre outros. Como fatores defensivos, apresentam-se: bicarbonato, camada mucosa, prostaglandinas, fatores de crescimento e fluxo sanguíneo (HAROLD; TOMIC-CANIC, 2007).

Embora o tratamento geralmente seja conduzido para a redução dos fatores agressivos, pode também ser dirigido para o fortalecimento das defesas da mucosa do estômago e duodeno (JAINU et al., 2006). A secreção de ácido gástrico é um processo controlado por mecanismos neural, endócrino e parócrino. Os mecanismos neuronais são comandados pela acetilcolina (ACh), os parócrinos pela histamina e os endócrinos pela gastrina (GOODMAN; GILMAN, 2012).

No corpo e fundo gástrico (Figura 2), a acetilcolina liberada dos neurônios colinérgicos estimula a secreção ácida via ação direta na célula parietal através de receptores muscarínicos tipo M3, e via ação indireta, pela eliminação do efeito inibitório que a somatostatina exerce tanto nas células parietais como nas células enterocromafins.

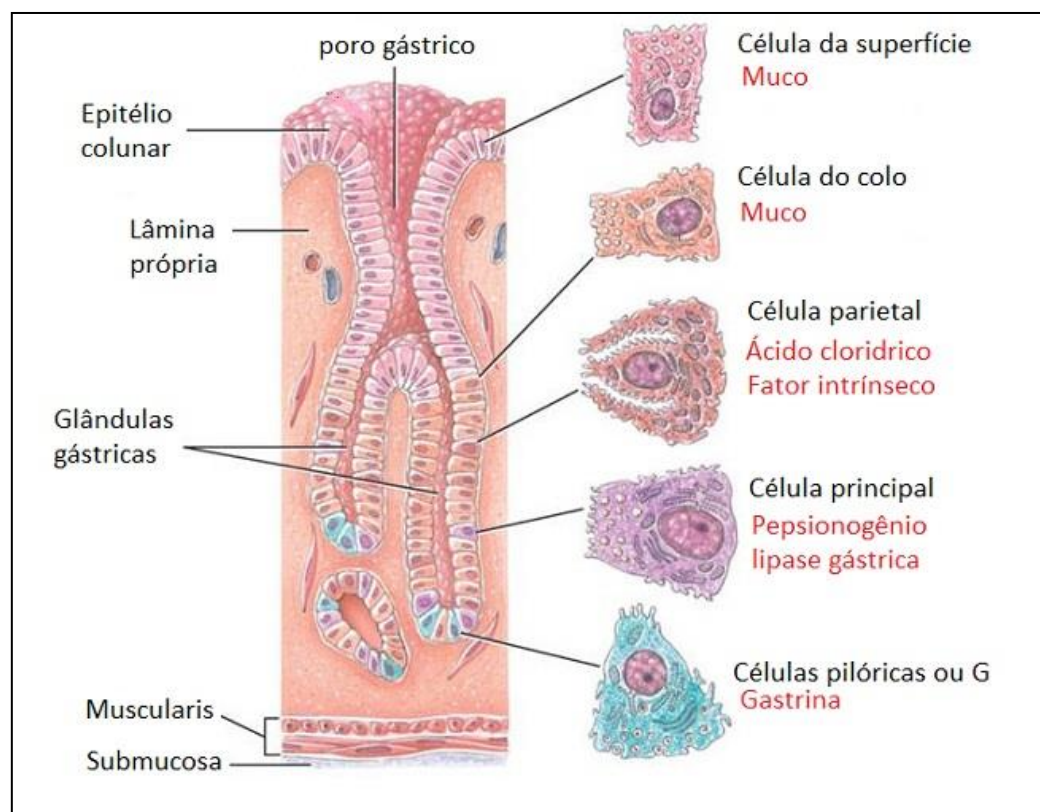
Figura 2 - Divisão anatômica do estômago



Fonte: WIKIMEDIA COMMONS, THE FREE MEDIA REPOSITORY (2016).

As células enterocromafins no estômago produzem histamina, que fica armazenada em vesículas secretoras (MÖSSNER; CACA, 2005), que quando liberada estimula as células parietais a secretarem ácido pela ligação em receptores H₂ (KAZUMORI et. al., 2004). A gastrina é produzida pelas células G no antro do estômago e, em menor quantidade na região proximal do intestino delgado, cólon e pâncreas (SCHUBERT, 2004) agindo em receptores CCK₂ nas células parietais (Figura 3) (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Figura 3 - Tipos celulares da mucosa gástrica



Fonte: MEDICINA GERIÁTRICA, GERIATRIA E GERONTOLOGIA (2013).

A mucosa gástrica mantém certa integridade estrutural e resistência à agentes agressores uma vez que possui mecanismos de defesa pré-epitelial e epitelial. A primeira linha de defesa é constituída pela barreira mucobicarbonato que é considerada a barreira pré-epitelial, mantendo um pH neutro de aproximadamente 7,0 na interface luminal da superfície das células epiteliais, enquanto que o pH do lúmen é em torno de 1,0-3,0 (TARNAWSKI, 2005). Substâncias ulcerogênicas como sais biliares e os anti-inflamatórios não esteroidais causam a dissipação do muco,

ocasionando lesão gástrica (LAINE et al., 2008). O bicarbonato que é secretado pelas células epiteliais é retido pelo muco originando um revestimento alcalino para o estômago. Quando o alimento é ingerido, as taxas de secreção tanto de bicarbonato quanto de muco aumentam, protegendo esta mucosa (BERNE et al., 2004; LAINE et al., 2008).

Dentro do componente epitelial está uma camada contínua de células epiteliais da superfície conectadas por junções oclusivas e comunicantes, as quais secretam bicarbonato, muco, prostaglandinas, proteínas de choque térmico (TARNAWSKI, 2005). Também denominadas como a segunda defesa, a microcirculação facilita a chegada de oxigênio e nutrientes, além de remover substâncias tóxicas. As células endoteliais dos microvasos geram potentes vasodilatadores como a PGI₂ e o NO, que possuem a função de proteger a mucosa gástrica contra fatores agressores e se contrapõe a ação nociva de vários agentes vasoconstritores como tromboxanos, endotelinas e leucotrienos (WALLACE, 2001; LAINE et al., 2008).

Quase todos os mecanismos de defesa são estimulados ou facilitados pelas prostaglandinas, que compreendem a cicatrização da mucosa, a aceleração da restituição epitelial, a inibição da secreção ácida, a estimulação da secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídeos e o aumento do fluxo sanguíneo. A produção sucessiva de prostaglandina E₂ (PGE₂) e PGI₂ é decisiva para a manutenção da integridade da mucosa gástrica, para a proteção contra agentes ulcerogênicos e necrosantes, é dependente dos níveis de expressão da isoforma do tipo 1 da enzima ciclooxigenase (COX-1) (LAINE et al., 2008). A maior parte das ações protetoras das prostaglandinas na mucosa gástrica são mediadas principalmente por receptores do tipo EP₁, EP₃ e EP₄, que afetam a secreção de ácido e muco (LAINE et al., 2008).

O organismo também pode contar com mecanismos de defesa através de sistemas antioxidantes. As enzimas que compõem a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio incluem a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST). A segunda linha de defesa antioxidante ocorre por alguns compostos de moléculas químicas, incluindo vitaminas, flavonóides da dieta, carotenóides e a glutathione (GSH) (CNUBBEN et al., 2001).

2.1.1 Tratamento farmacológico da úlcera gástrica

Os fármacos utilizados no tratamento de úlceras gástricas não são totalmente eficazes na cicatrização das mesmas. Entre os empregados, temos antiácidos, antagonistas do receptor H₂ para histamina e inibidores de bomba de prótons. Entretanto, a maioria destes possui alto valor agregado e vários efeitos colaterais (HOOGERWERF; PASRICHA, 2003).

O principal objetivo farmacológico no tratamento da úlcera é restabelecer a integridade da mucosa gástrica, seja pela inativação dos fatores agressores ou pelo aumento dos fatores defensivos (HOOGERWERF; PASRICHA, 2003). Nos anos 70 surgiram os antagonistas de receptores H₂ histaminérgicos (cimetidina, ranitidina). Estes, assim como os inibidores da bomba de prótons H⁺/K⁺ATPase (omeprazol, pantoprazol), que apareceram no final dos anos 80, tem como função reduzir a secreção de ácido gástrico (BRUNTON, 2007).

Quando o omeprazol é utilizado por períodos prolongados, é possível observar efeitos colaterais dessa classe de fármacos. Assim, com a elevação do pH do suco gástrico por períodos prolongados tem sido observada a diminuição da absorção de nutrientes, e tem sido sugerido que com a H⁺/K⁺ATPase bloqueada, a gastrina exerce um efeito trófico, levando a hiperproliferação celular a qual pode estar associada com o desenvolvimento de câncer gástrico (BRUNTON, 2007).

Outras classes de medicamentos empregadas no tratamento da úlcera, ou fármacos utilizados para amenizar os sintomas são os antiácidos (hidróxido de magnésio, hidróxido de alumínio e bicarbonato de sódio) e protetores da mucosa, como o sucralfato, cuja ação está envolvida na neutralização do ácido já secretado e também atua como agente de barreira, ou seja, evita o contato direto do ácido na mucosa lesada, favorecendo a cicatrização da úlcera (BRUNTON, 2007).

Podem ser citados ainda os casos de úlcera causadas pelo *H. pylori*, em que se associa a terapia com anti-secretores, antibióticos (claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tinidazol, tetraciclina e fluorquinolonas, como levofloxaxino e moxifloxacino) e também compostos do bismuto que possuem efeito citoprotetor devido ao aumento da secreção gástrica de muco e bicarbonato e inibição da atividade da pepsina (HOOGERWERF; PASRICHA, 2003; RIMBARA, et. al. 2011).

Apesar da grande efetividade apresentada pelos antagonistas de receptores H₂ e dos inibidores da bomba de prótons, esses medicamentos podem apresentar

vários efeitos adversos quando utilizados por longos períodos devido à intensa supressão ácida. Dentre esses efeitos, pode se citar a osteoporose, riscos aumentados de infecções entéricas, metabolismo alterado de outros medicamentos, e desenvolvimento de pólipos gástricos que podem evoluir para câncer gástrico (CHUBINEH; BIRK, 2012).

Tendo em vista a magnitude do problema causado pelas úlceras gástricas, os estudos que buscam a incorporação de novos fármacos para sua prevenção e/ou tratamento tornaram-se de grande interesse. Com isso, a investigação de compostos bioativos que apresentem propriedade gastroprotetora se tornou uma alternativa em potencial, tendo como objetivo a diminuição da incidência de lesões e aceleração no processo de reparo tecidual.

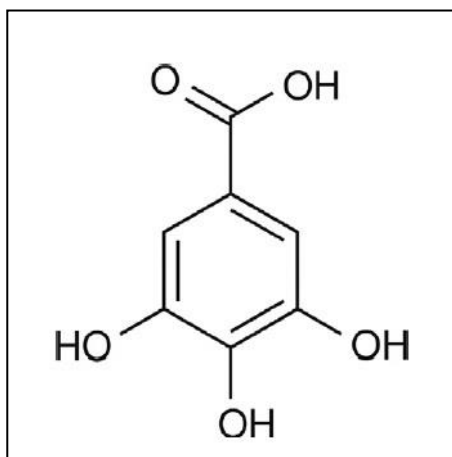
Diante do exposto, o ácido gálico surge como um possível composto promissor para proteção da mucosa gástrica.

2.2 ÁCIDO GÁLICO

2.2.1 Propriedades físico-químicas do ácido gálico

O ácido gálico (AG) (Figura 4), ácido 3,4,5-triidróxi-benzóico, é uma substância fenólica, intermediária do metabolismo secundário de plantas, originado pela rota biossintética via ácido chiquímico, sendo um derivado do ácido benzóico. É freqüentemente encontrado na natureza na forma de seu dímero de condensação, o ácido elágico. Tanto o ácido gálico como o ácido elágico são constituintes de taninos hidrolisáveis, dos quais são liberados por hidrólise ácida (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

Figura 4 - Estrutura do ácido gálico



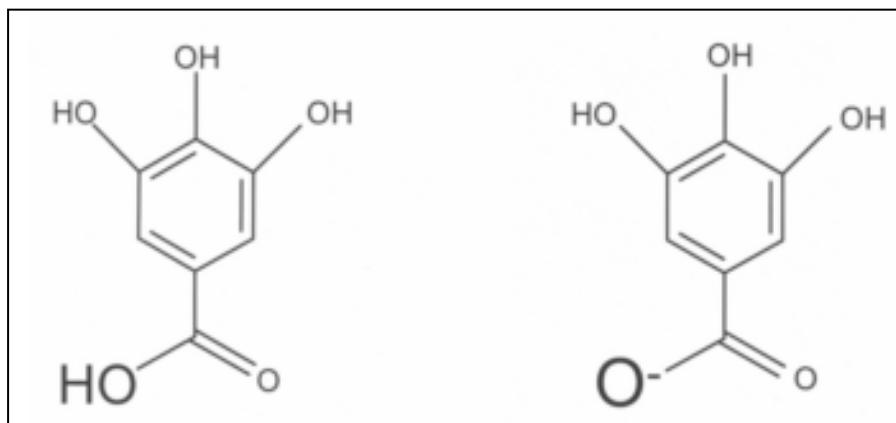
Fonte: SUN et al. (2014).

Uma série de substituintes na porção ácida do AG permite a obtenção de ésteres com uma variedade de análogos e propriedades farmacológicas distintas (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013); os sais e ésteres de AG são denominados galatos (MASOUD et al., 2012). O AG é encontrado em grande quantidade no chá verde, no sumagre, em nozes, em frutas como uva, romã, morango, abacaxi, banana, limão, manga e na casca de maçãs, bem como no vinho tinto e branco (YOU et al., 2010; BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

Ligado ao anel benzeno, o ácido gálico possui um grupo carboxílico e três grupos OH fenólicos nas posições 3, 4 e 5. Estes grupos apresentam uma constante de dissociação (pKa) de 4,4 ; 8,2; 10,7 e 13,1, respectivamente (MELO et al., 2009).

Polewski e colaboradores (2002), avaliaram as absorbâncias em UV-vis do ácido gálico solubilizado em soluções tamponadas com diferentes pH. Foi evidenciado o deslocamento do comprimento de onda de absorção do AG de 272 nm em pH 2,8 para 260 nm em pH 7. As mudanças observadas indicaram a existência de duas formas do ácido gálico, resultantes da dissociação de prótons no grupo carboxílico (COOH): forma neutra que existe abaixo do pKa aparente de 3,4 e a forma iônica acima deste pKa, apresentadas na figura 5.

Figura 5 - Estrutura química do (a) ácido gálico e do (b) ânion do ácido gálico



Fonte: POLEWSKI; KNIAT; SKA (2002).

O AG se apresenta instável em temperaturas extremas ou na presença de oxigênio ou luz (ROSA et al., 2013). Possui uma coloração amarelo esbranquiçada, apresentando-se na forma de cristais, com massa molecular de 170,12 g/mol, temperatura de fusão de 250 °C e solubilidade em água de 1.1% a 20 °C (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

Rosa e colaboradores (2013), descrevem que o AG apresenta baixa solubilidade em água. Contudo, pode formar ligações de hidrogênio, por possuir hidroxilas polarizadas de grupos fenólicos e carboxílicos, tanto intramoleculares como intermoleculares. No entanto, segundo o coeficiente de partição (LogP), que expressa a lipofilicidade relativa de uma substância, quanto maior o valor, maior é a lipossolubilidade de um determinado composto químico, o LogP do AG é de 0,89, bem menor que a maioria dos seus derivados galatos, podendo assim ser considerado uma substância relativamente solúvel em água (BENNETT et al., 2004).

O AG é conhecido principalmente por ser um antioxidante natural, atuando na prevenção da oxidação de biomoléculas, tais como, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídeos. Esta propriedade é de grande valia na preservação de alimentos e é caracterizada pela capacidade de atuar como doadores de hidrogênio ou elétrons para espécies reativas, como em outros polifenóis (GALLI, 2007).

Em adição, os compostos fenólicos são quimicamente muito reativos e esta reatividade também pode ser inferida ao ácido gálico (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). Além disso, são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais (como ferro e manganês), da luz e do calor, ou, em meio alcalino, ocasionando o escurecimento de suas

soluções. Outra característica relacionada é a capacidade de complexação com metais, tornando o AG conhecido como um forte agente quelante que forma complexos de alta estabilidade com o ferro (POLEWSKI; KNIAT; SKA, 2002).

O espectro de absorção do AG apresenta dois picos no UV-vis, que variam conforme o solvente em que se encontra solubilizado, o pH da solução e o meio propício para mudanças decorrentes de reações com outros constituintes ao longo do tempo. Em solução aquosa oxigenada e tamponada em pH 7,4, o comprimento de onda (λ) de maior energia absorve em 220 nm e o de menor energia em 260 nm, logo após solubilização do AG no meio. À medida que o tempo transcorre outras três bandas de absorção, em 320 nm, 400 nm e 630 nm surgem, indicando a oxidação do composto sob estas condições (GIL-LONGO; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2010).

Durante a auto-oxidação dos ânions de AG, o oxigênio é consumido e ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são produzidos (GIL-LONGO; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2010). Em soluções aquosas ligeiramente alcalinas, mesmo na ausência do O_2 , mas na presença de polifenóis, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser formado (MELO et al., 2009).

Em experimentos de fotodecomposição por irradiação UV a concentração do AG em meio aquoso decai com o tempo de reação. Isto foi observado com uma maior velocidade nos maiores valores de pH. Sendo atribuído à forma dissociada (ionizada), por apresentar maior reatividade que o oxidante, no caso o peróxido de hidrogênio e a irradiação UV, enquanto a forma não dissociada (neutra) tem menor reatividade (BENITEZ et al., 2005).

2.2.2 Propriedades farmacológicas do ácido gálico

O ácido gálico é reconhecido por apresentar diversas atividades terapêuticas benéficas. Demonstrou possuir atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral, antialérgica, anti-inflamatória, antimelanogênica, antituberculostática, antimutagênica, anticolesterol, antiobesidade, imunomodulatória e antiúlcera. Exibe ainda potencial neuroprotetor, cardioprotetor, hepatoprotetor e nefroprotetor (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

2.2.2.1 Atividade antitumoral

O ácido gálico apresenta citotoxicidade frente a uma variedade de linhagens de células cancerígenas, em decorrência de diferentes mecanismos de ação já elucidados, destacando-se o apoptótico (YOU; PARK, 2010), antiproliferativo (MADLENER et al., 2007), antiangiogênico (LU et al., 2010) e antimetastático (HO et al., 2010) (Tabela 1). Esta ação faz deste fármaco uma importante biomolécula para uso terapêutico. Além disso, apresenta citotoxicidade seletiva para células cancerígenas e baixa citotoxicidade para células saudáveis (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

Tabela 1 - Dados de IC₅₀ e mecanismos de ação do ácido gálico frente a linhagens de células cancerígenas

Linhagem de célula cancerígena	Tipo de célula	IC₅₀	Mecanismo de ação	Referências
Calu-6	Câncer de pulmão	10–50 µM	Apoptótico	(YOU; PARK, 2010)
A459	Câncer de pulmão	100–200 µM	Apoptótico	(YOU; PARK, 2010)
HL-60	Leucemia	24 µM	Antiproliferativo	(MADLENER et al., 2007)
Hela	Câncer cervical	80 µM	Apoptótico	(YOU et al., 2010)
AGS	Carcinoma gástrico humano	10 µM	Apoptótico	(HO et al., 2010)
DU145	Carcinoma de próstata	25 µM	Apoptótico	(KAUR et al., 2009)
22Rv1	Carcinoma de próstata	40 µM		(KAUR et al., 2009)
3T3L1	Adipócitos	100 µM	Apoptótico	(HSU; LO; YEN, 2007)
U-2 OS	Osteosarcoma humano	20 µM	Antimetastático	(LIAO et al., 2012)

Fonte: adaptado de VERMA; SINGH; MISHRA (2013).

Lu e colaboradores (2010) confirmaram essa característica seletiva do AG quando constataram a inibição de 95%, 91%, e 89% do crescimento celular em células endoteliais normais do cérebro de camundongos nas concentrações de 20,

30, e 40 µg/mL, respectivamente. Enquanto que, para as linhagens U87 e U251n, nas mesmas concentrações foi de 70%, 54% e 38% para a primeira linhagem e 81%, 67% e 49% para a segunda linhagem. Esta seletividade do ácido gálico para células cancerígenas, também foi observado por Kaur e colaboradores (2009) em células epiteliais da próstata não neoplásicas (PWR-1E) tratadas sob as mesmas condições de células cancerígenas da próstata, mas diferentemente das linhagens cancerígenas não apresentaram inibição significativa da proliferação celular.

Raina e colaboradores (2008) testaram a eficácia quimioprotetora do AG contra câncer de próstata em modelos transgênicos de adenocarcinoma de próstata (camundongos TRAMP). Os animais foram alimentados com água suplementada com AG (0,3% e 1%) da 4ª a 24ª semana de vida, tendo como controle um grupo alimentado com água não suplementada. O tratamento com AG inibiu o crescimento do câncer de próstata e a progressão do adenocarcinoma em estágio avançado nos camundongos TRAMP, via forte supressão da progressão do ciclo e proliferação celular e aumento da apoptose.

Ainda com relação a estudos *in vivo* da ação antitumoral do AG, constatou-se que o mesmo suprimiu carcinogênese na pele de camundongos Swiss induzida por DMBA (7,12-dimetil Benz[a]antraceno). Onde nos grupos tratados com AG houve uma redução da incidência de tumores e inibição de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SUBRAMANIAN et al., 2014). Em adição, o AG ocasionou uma significativa diminuição do peso do baço e do fígado em camundongos Balb/c induzidos a leucemia por células WEHI-3 (HO et al., 2009).

Os efeitos citotóxicos do AG e seus derivados galatos são decorrentes da sua ação pró-oxidante, e não antioxidante (YOSHINO et al., 2002). Várias evidências apontam que antioxidantes naturais são capazes de inibir o crescimento de células cancerígenas. Além disso, tem-se sugerido que estes compostos podem ser utilizados de várias formas, quer como agentes de prevenção do câncer ou mesmo como fármacos na terapia do câncer (SUBRAMANIAN et al., 2014).

2.2.2.2 Atividade antioxidante

Como antioxidante é capaz de capturar espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e ácido hipocloroso (FIUZA et al., 2004). Este efeito pode beneficiar a prevenção e controle

de muitas doenças, como as cardiovasculares (GIL-LONGO; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2010). Senevirathne e colaboradores (2012) demonstraram a atenuação do estresse oxidativo induzido por um hidroperóxido orgânico em células do fígado, por inibição da geração de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e aumento dos níveis de enzimas antioxidantes.

2.2.2.3 Atividade neuroprotetora

O ácido gálico apresentou ação farmacológica sobre a depressão, tendo evidenciado resultados ainda melhores quando encapsulado em nanopartículas de quitosana, as quais foram administradas na mesma dose que o AG livre em camundongos. A ação ansiolítica pode ser atribuída à diminuição dos níveis de nitrito no plasma, com o efeito acentuado pela captação do ácido gálico a partir das nanopartículas pelo cérebro (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013).

Em modelos animais de doença de Parkinson onde o estresse oxidativo cerebral e o déficit de memória foi induzido por 6-hidrodopamina, o tratamento com ácido gálico aumentou significativamente a memória de esquia passiva, níveis de tiol total e glutathione peroxidase (GPx). Níveis de malondialdeído (MDA) também foram reduzidos no hipocampo e no corpo estriado, sugerindo que o AG atuou como um neuroprotetor via aumento da defesa antioxidante do cérebro (MANSOURI et al., 2013).

2.2.2.4 Atividades antidiabética e antialérgica

Liu e colaboradores (2013) desenvolveram um novo método mediado por radicais livres para síntese de conjugados de quitosana com ácido gálico, que se destacou como candidato a agente anti-diabético, constatado pela inibição da atividade de α -glucosidase e α -amilase, enzimas que participam da hidrólise de carboidratos.

Foi constatado também o efeito anti-alérgico *in vitro* e *in vivo* do AG, sugerindo que o mecanismo de ação estaria associado à inibição da liberação de histamina a partir de mastócitos, evitando a hipersensibilidade imediata e impedindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (KIM et al., 2006).

2.2.2.5 Atividades nefroprotetora e hepatoprotetora

AG exibiu comportamento nefroprotetor frente a nefrotoxicidade induzida por lindano, ácido nitriloacético férrico e fluoreto de sódio. A intoxicação pode exaurir os níveis do sistema de defesa antioxidante, resultando em dano celular por estresse oxidativo. Diversos estudos demonstraram a habilidade deste composto em reestabelecer a atividade dos antioxidantes endógenos. Adicionalmente, o ácido gálico isolado de *Peltiphyllum peltatum* (Darmera) exibiu efeito protetor frente a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e estresse oxidativo induzidos por fluoreto de sódio (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

Ainda com relação ao efeito nefroprotetor do AG, Peng e colaboradores (2012) relataram ação protetora quando do tratamento de doença renal crônica induzida por doxorrubicina. O tratamento do ácido gálico aumentou significativamente o peso dos rins e o volume glomerular, mantendo a taxa de filtração glomerular em níveis normais.

2.2.2.6 Atividade antimelanogênica

A produção exacerbada de melanina, determinante da cor da pele, pode levar a variadas desordens dermatológicas. O potencial do AG como um agente protetor da pele foi demonstrado através da sua ação contra a hiperpigmentação, inibindo a atividade da tirosinase. Neste estudo, mostrou-se mais efetivo que o ácido kójico, um agente antitirosinase padrão (KIM, 2007).

2.2.2.7 Atividade antiviral

Kratz e colaboradores (2008) investigaram o efeito inibidor do ácido gálico e seus N-alkil derivados frente aos vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e herpes simples tipo 1 (HSV-1). Os achados indicaram inibição da replicação do HIV-1 e inibição da ligação do HSV-1 às células e sua penetração.

O efeito do AG sobre o vírus da hepatite C (HCV) foi descrito por Govea-Salas e colaboradores (2016). Os resultados revelaram que na dose de 300 µM, este composto foi capaz de diminuir a expressão do HCV a nível transcricional em um sistema de cultura de células replicativo de HCV transfectado com replicons. As

células tratadas expressaram menores níveis de proteínas NS5A-HCV, sugerindo que o AG pode diminuir a taxa de translação de proteínas virais ou diminuir a estabilidade da proteína viral. Observou-se ainda que o presente composto foi hábil em diminuir os níveis de ROS (espécies reativas de oxigênio) induzidos por H_2O_2 , indicando uma atenuação do estresse oxidativo celular.

2.2.2.8 Atividade antibacteriana

Diversos autores demonstraram o efeito bactericida dos compostos fenólicos contra *H. pylori*, uma bactéria associada com um grande número de doenças gastrointestinais. Díaz-Goméz e colaboradores (2013) verificaram uma diminuição do efeito dose-dependente do AG sobre duas cepas de *H. pylori*, onde durante 90 min de exposição a 1 mg/mL do composto os valores das UFC/mL diminuíram continuamente de 2×10^6 para 8×10^1 (*H. pylori* 26695) e de 2×10^7 para 10^0 (*H. pylori* 43504). Observou-se também um aumento dose-dependente nos diâmetros dos halos de inibição em culturas em placas de ágar de ambas as linhagens bacterianas, sugerindo que o ácido gálico tem um efeito inibidor significativo sobre o crescimento de *H. pylori*.

A investigação da atividade do ácido gálico frente a *Escherichia coli* apontou um efeito inibitório evidente em doses acima de 2,5 mg/mL, com total inibição observada nas doses de 3,5 mg/mL ou mais. Os valores das UFC/mL exibiram uma diminuição de 1×10^9 para 2×10^3 nas concentrações acima de 3,0 mg/mL de AG no meio, com a concentração inibitória mínima (MIC) para produzir 99% de inibição no crescimento de *E. coli* sendo de 3,25 mg/mL do composto. Os diâmetros dos halos de inibição em cultura em placa de ágar aumentaram gradualmente em relação ao teor de ácido gálico na faixa de 0 para o controle até 12 mm na presença de 2,5 mg de AG. A inibição foi significativamente maior que o controle em doses de ácido gálico iguais ou superiores a 1 mg (DÍAZ-GÓMEZ et al., 2014).

2.2.2.9 Atividade anti-inflamatória

Os ácidos fenólicos, incluindo os galatos, exibem uma forte inibição da mieloperoxidase (MPO), uma enzima chave nos processos de infecção e inflamação. O ácido gálico e seus derivados N-alquil éster (diferentes em

lipofilicidade) demonstraram atividade anti-inflamatória a partir de dois mecanismos: (1) potente inibição da atividade da MPO, inibindo diretamente a produção de ácido hipocloroso (HClO), e (2) retirada de espécies reativas nocivas produzidas pela enzima (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

2.2.2.10 Atividade gastroprotetora

O ácido gálico possui a capacidade de restaurar lesões da mucosa gástrica induzidas por indometacina através da modulação da resposta inflamatória. Este composto pode quelar Fe (III) livre, formando um complexo, demonstrando assim um possível potencial para prevenir a gastropatia induzida por indometacina através da quelação do Fe (III) e bloqueando a apoptose das células da mucosa gástrica mediada pelo estresse oxidativo (MASOUD et al., 2014; PAL et al., 2010).

Pal e colaboradores (2010) descreveram que em estudos *in vivo* o AG bloqueou o estresse oxidativo mitocondrial mediado por AINEs, prevenindo a formação de proteína carbonilada mitocondrial, peroxidação lipídica e depleção de tiol. Os estudos *in vitro* demonstraram que este composto capturou os radicais livres e bloqueou o dano oxidativo mediado através de OH. Ademais, foi capaz de atenuar a apoptose de células da mucosa gástrica *in vivo* e *in vitro*, prevenir a ativação da caspase 9 induzida por AINEs e restabelecer o potencial transmembrana mitocondrial e a atividade da dehidrogenase. Por conseguinte, a inibição do estresse oxidativo mitocondrial pelo ácido gálico está associada com a inibição da disfunção mitocondrial induzida por AINEs e ativação da apoptose em células da mucosa gástrica, as quais são responsáveis por injúria gástrica ou gastropatia.

Estudos visando avaliar o mecanismo antiulcerogênico do AG demonstraram que em lesões gástricas induzidas por etanol, o tratamento com o composto em questão foi capaz de proteger o estômago de ratos e modulou de forma significativa os níveis de pH gástrico, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), marcadores imunológicos e de apoptose. Onde acredita-se que as propriedades antioxidantes *in vivo*, proteínas imunomoduladoras e a inibição da apoptose mitocondrial podem contribuir para a atividade gastroprotetora do ácido gálico (ABDELWAHAB, 2013).

Asokkumar e colaboradores (2014), ao investigarem o efeito sinérgico entre o ácido gálico e famotidina na proteção da mucosa gástrica de ratos, relataram que o

AG protege e repara danos na mucosa gástrica induzidos por AINEs, prevenindo ainda a ativação da via de apoptose mitocondrial em células da mucosa gástrica durante o tratamento com estes fármacos. Devido a isto, o ácido gálico apresenta-se com potencial terapêutico para o tratamento da gastropatia induzida por anti-inflamatórios não esteroidais.

2.2.3 Tecnologia farmacêutica aplicada ao ácido gálico

Os polifénóis estão entre os compostos ativos mais veementes sintetizados por plantas, e apresentam combinações únicas de atividades químicas, físicas e biológicas. Contudo, sua limitada solubilidade e/ou estabilidade, frequentemente associadas a uma baixa biodisponibilidade, têm de ser contornadas para torná-los capazes de responder às demandas nas áreas de cosméticos, nutrição e saúde. Foi constatado que o emprego de várias técnicas de encapsulação aplicadas a extratos e/ou compostos polifenólicos de plantas, confirmaram que a encapsulação é um meio atraente para potencializar suas atividades (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Como já mencionado, o AG é um polifenol e apesar das suas promissoras atividades biológicas, a sua instabilidade a temperatura, presença de oxigênio e luz, restringe o seu uso terapêutico. Visando contornar estes empecilhos, há relatos na literatura da encapsulação do AG em complexos de inclusão, micropartículas e nanopartículas, além de conjugados com este fármaco (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

De acordo com as necessidades de cada campo de aplicação, as partículas contendo AG foram elaboradas para desempenhar as seguintes funções:

- Proteção do composto da degradação a partir do seu meio circundante (ROSA et al., 2013; NEO et al., 2013; LIU et al, 2013);
- Preservação e aumento da eficácia terapêutica de algumas de suas atividades biológicas (BOZIC et al, 2012; BITAN-CHERBAKOVSKY; ASERIN; GARTI, 2013);
- Desenvolvimentos de sensores para aplicação bioanalítica (HUANG; YU; TSENG, 2010; SU et al., 2012);
- Funcionalização do polímero, com o qual foi conjugado (PASANPHAN; CHIRACHANCHAI, 2008; BOZIC et al, 2012);

- Controle na liberação do AG encapsulado (HUANG; YU; TSENG, 2010; LI et al., 2011; YU et al., 2011);

Filmes funcionalizados de quitosana também foram adquiridos por meio da conjugação com AG, obtendo-se uma nova estratégia para realização da modulação sinérgica de atividades características do polímero e do polifenol, antibacteriana e antioxidante respectivamente, de materiais à base de quitosana (BOZIC et al, 2012). O efeito protetor ao dano celular ocasionado pelo estresse oxidativo induzido por terc-butilhidroperóxido (T-BHP) em células saudáveis do fígado, foi evidenciado naquelas pré-tratadas com conjugados de quitosana e ácido gálico (SENEVIRATHNE et al., 2012).

A encapsulação do ácido gálico em microesferas de quitosana (AG/C) e xantana (AG/X) e sua complexação a β -ciclodextrina (AG- β -CDS) resultou na preservação da capacidade antioxidante do AG após a encapsulação em todas as matrizes, destacando-se as micropartículas AG/C que obtiveram a mais elevada porcentagem de eficiência de encapsulação (91,07%) (ROSA et al., 2013).

Microcápsulas constituídas da associação de gelatina e agarose, para aplicação tópica e oral foram desenvolvidas contendo AG, estas apresentaram uma eficiência de encapsulação de 70,28%, e liberação de 90% após duas horas em condições de pH intestinal, e proteção no tratamento da toxicidade hepática e renal aguda em camundongos (LAM et al., 2012).

Complexos nanoparticulados de quitosana, ácido gálico e Fe^{2+} foram preparados, caracterizados e considerados estáveis, bem como promissores para o futuro uso como carreadores de proteínas antioxidantes e produtos naturais (YU et al., 2011).

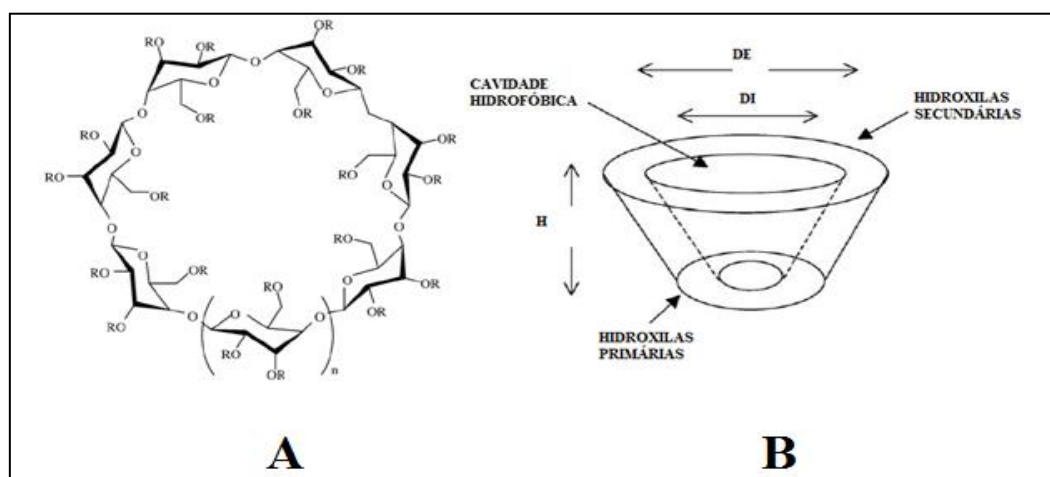
Um estudo de otimização de nanopartículas contendo ácido gálico foi realizado por meio de um planejamento fatorial, que variou as concentrações de quitosana e Tween 80®, esse utilizado com o intuito de servir como agente de entrega a células cerebrais. A administração dos sistemas nanotecnológicos com a adição de Tween 80® propiciou um aumento na atividade ansiolítica quando comparado com as nanopartículas na ausência do tensoativo, refletida pelos modelos comportamentais e a redução nos níveis de nitrito no plasma (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013).

O AG foi co-encapsulado com dendrímeros em carreadores lipídicos, onde as macromoléculas apresentaram uma possível modulação na liberação da droga, decorrente de interações eletrostáticas, entre o AG e os dendrímeros (BITANCHERBAKOVSKY; ASERIN; GARTI, 2013). Este composto também foi utilizado na síntese de nanopartículas de ouro, agindo como um agente redutor e atuando na detecção fluorescente de ciromazina, um inseticida (SU et al., 2012); e na detecção de Pb^{2+} (HUANG; YU; TSENG, 2010).

2.3 CICLODEXTRINAS

A fermentação enzimática de alguns carboidratos, como celulose, amido e sacarose, é capaz de produzir uma mistura de monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos, resultando assim em dextrinas lineares e cíclicas, sendo as últimas também conhecidas como ciclodextrinas (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007). As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que possuem estrutura rígida e são formados por unidades de glicopirranose unidas por ligações α (1-4). Têm a forma de um cone truncado, onde os grupos OH secundários ligados aos carbonos C-2 e C-3 ocupam a base de maior diâmetro do tronco, enquanto as hidroxilas primárias ligadas ao carbono C-6 localizam-se na base menor do tronco (Figura 6) (CHALLA et al., 2005).

Figura 6 - Estrutura química de uma ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) ilustrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE)



Fonte: adaptado de BREWSTER; LOFTSSON (2007).

A formação de uma cavidade central hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica nas ciclodextrinas é favorecida pela disposição espacial dos grupamentos químicos, permitindo, desta forma, o processo de complexação molecular. Geralmente, substâncias químicas de baixa polaridade podem alojar-se no interior da cavidade das CDs formando complexos de inclusão dinâmicos em solução (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Podem ser classificadas de acordo com o número de unidades de glicopirranose. As ciclodextrinas naturais α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, contêm respectivamente seis, sete e oito unidades glicosídicas (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Apresentam diferentes propriedades, como tamanho de cavidade, reatividade, solubilidade, capacidade de complexação e efeito na estabilidade química das moléculas hóspedes (Tabela 2) (CONNORS, 1997).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas

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

Fonte: CONNORS (1997).

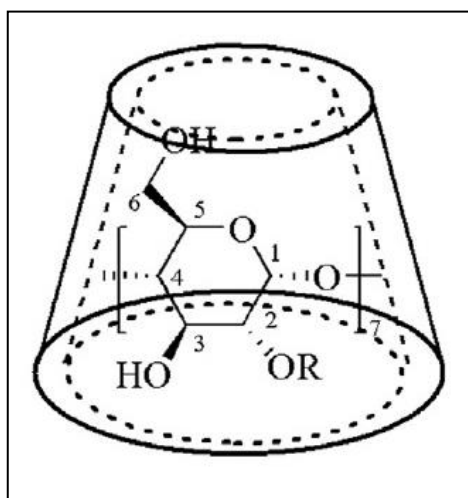
Dentre as ciclodextrinas naturais, a β CD é a mais utilizada por ter baixo custo e possuir afinidade com muitas moléculas hidrofóbicas. No entanto, a sua menor solubilidade em água limita o seu uso (Tabela 2). Esse fato se deve a ligação relativamente forte de suas moléculas em estado sólido associada à diminuição da habilidade de formação de ligações de hidrogênio com a água (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

Diversos derivados semi-sintéticos de ciclodextrinas têm sido produzidos com o objetivo de otimizar a solubilidade e estabilidade de ciclodextrinas primárias. Evidenciou-se que a substituição de qualquer um dos grupos hidroxilas por grupamentos hidrofóbicos resulta em um aumento significativo da solubilidade

aquosa. Outros tipos de modificações estruturais como aminação, esterificação das hidroxilas primárias e secundárias também podem ser realizadas (CALABRÒ et al., 2004; DAVIS; BREWSTER, 2004; DEL VALLE, 2004; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

A 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) (Figura 7) é um derivado obtido pelo tratamento de uma solução de β CD com propilenoóxido, resultando em uma mistura de isômeros devido à substituição randômica dos grupamentos hidroxílicos (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

Figura 7 - Estrutura molecular da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina



Fonte: WANG et al. (2016).

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

2.3.1 Complexos de inclusão com ciclodextrinas

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

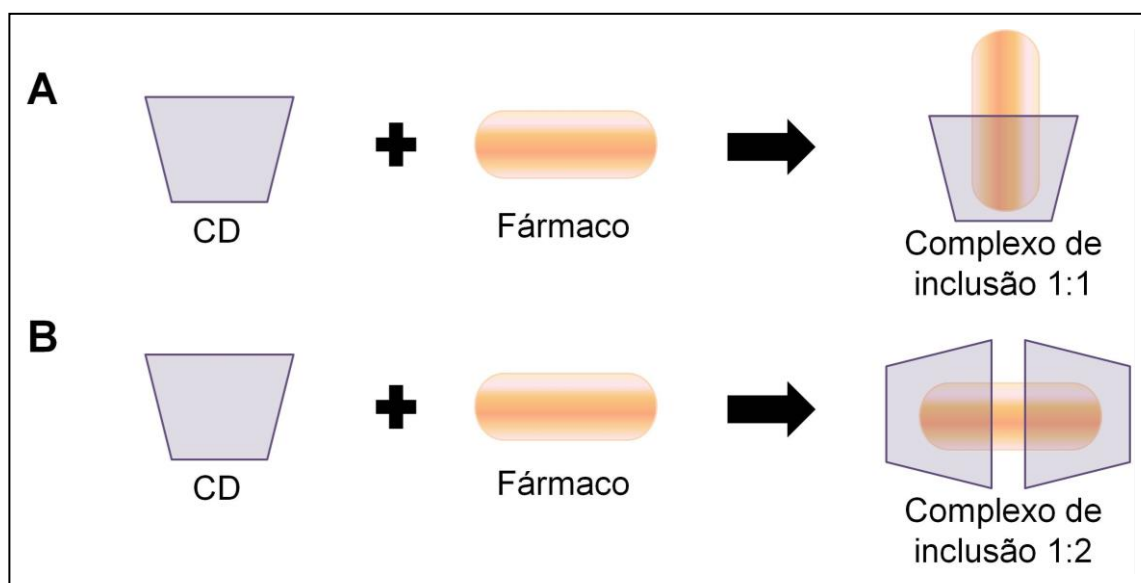
Os complexos de inclusão têm sido amplamente estudados porque promovem, principalmente, o aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água; ademais, a complexação proporciona uma melhoria na estabilidade química, maior biodisponibilidade e diminuição dos efeitos indesejáveis do princípio ativo. Na formação de complexos com ciclodextrina é necessário que a molécula hóspede, ou parte da molécula, entre em contato com a cavidade da ciclodextrina para que seja formada uma associação estável. Uma variedade de forças não-covalentes, como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, são responsáveis pela formação do complexo, não ocorrendo interações fortes como ligações covalentes (DEVARAKONDA et al., 2005).

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

Na formação de um complexo de inclusão 1:1 (mol/mol) (Figura 8), é necessário que a molécula hóspede ou parte dela, associe-se em um equilíbrio

dinâmico com a cavidade da ciclodextrina e estabeleça ligações de caráter não-covalente, como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Devido à natureza destas ligações, o complexo de inclusão fármaco:ciclodextrina está continuamente sendo formado e dissociado (DEL VALLE, 2004; LOFTSSON et al., 2005).

Figura 8 - Esquema da associação entre ciclodextrina e molécula hóspede: (A) complexos de inclusão 1:1 e (B) complexos de inclusão 1:2



Fonte: A Autora (2016).

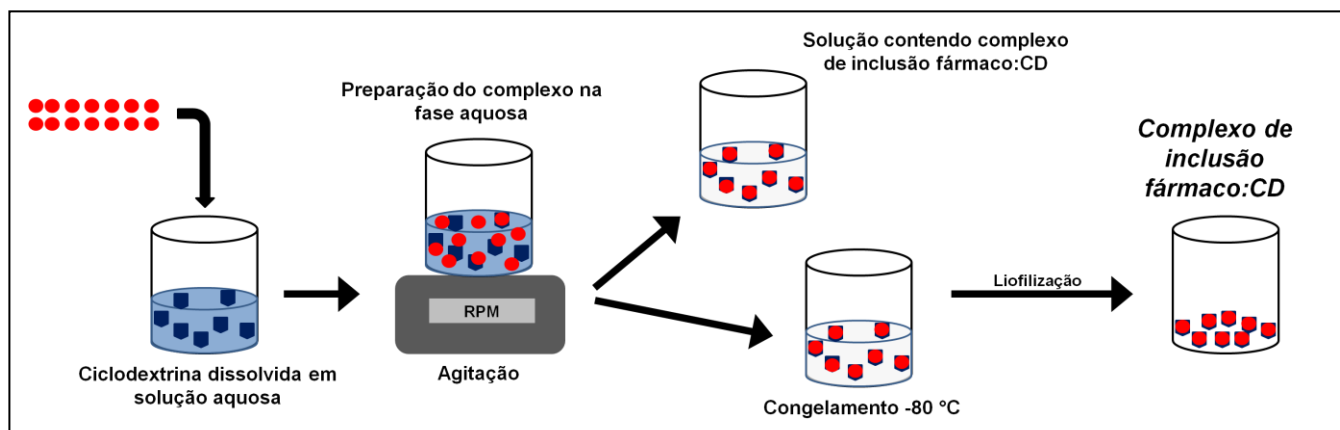
2.3.2 Preparação e caracterização de complexos de inclusão com ciclodextrinas

Para a escolha do método de preparação de complexos de inclusão, diversos fatores devem ser levados em consideração, tais como baixo custo, simplicidade do método, rapidez, rendimento elevado e facilidade de transposição de escala, visto que o método de preparação exerce grande influência na qualidade do complexo final obtido (MURA et al., 2015). Cada composto a ser complexado é um caso particular por possuir características específicas e, devido a isso, as condições ideais podem variar de acordo com as características tanto do composto utilizado quanto da ciclodextrina (MURA et al., 2015).

Os métodos de preparação de complexos de inclusão mais utilizados são: mistura física, pasta, co-evaporação, co-precipitação, *spray-drying* e *freeze-drying*.

(GHARIB et al., 2015). Este último tem como vantagem a possibilidade de ser utilizado em escala laboratorial e também em escala industrial. Para a obtenção de complexos de inclusão através deste método, a ciclodextrina é completamente solubilizada em água e posteriormente o fármaco é adicionado à solução de ciclodextrina. A mistura permanece sob agitação constante durante um período de tempo pré-determinado, sendo congelada em seguida e submetida à liofilização (Figura 9) (SILVA et al., 2016; CAVALCANTI et al., 2011).

Figura 9 - Método *freeze-drying* de preparação de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrinas



Fonte: adaptado de GHARIB et al. (2015).

Estudos experimentais e teóricos são realizados para caracterizar complexos de inclusão de moléculas com ciclodextrinas, dentre eles destacam-se: difração de raios-X (XRD), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR), estudos de dissolução, de modelagem molecular, ressonância magnética nuclear (RMN) e estudo de solubilidade de fases (SONG et al., 2009; MURA et al., 2015).

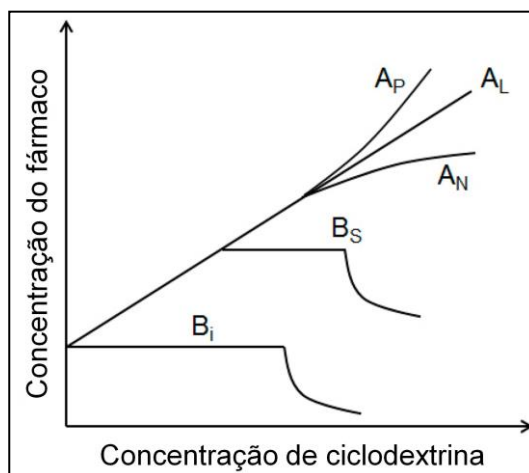
Na caracterização por RMN, o consenso estabelecido na literatura é que o complexo de inclusão é formado quando ocorrem mudanças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do interior da cavidade da ciclodextrina (3-H e/ou 5-H), sendo estes maiores do que os deslocamentos químicos correspondentes aos localizados no exterior da sua cavidade (2-H e/ou 4-H). Contudo, estudos demonstram que mesmo que a molécula hóspede esteja interagindo com o exterior

da cavidade da ciclodextrina, mudanças nas propriedades espectroscópicas da ciclodextrina e físicas das moléculas podem acontecer. Com base nisto, foi proposta a definição de interação por encapsulação para estes casos em que a molécula hospedeira interage com a ciclodextrina sem envolver necessariamente o fenômeno de complexação por inclusão (SONG et al., 2009).

Higuchi e Connors foram os primeiros a descrever o estudo de solubilidade de fases, no ano de 1965. Experimentalmente, um excesso do fármaco hidrofóbico é adicionado a um volume constante de diferentes soluções aquosas de ciclodextrina em concentrações crescentes. As amostras são submetidas a agitação a uma temperatura constante até que o equilíbrio seja atingido, com posterior concentração do fármaco determinada por técnicas analíticas como espectroscopia UV-Vis ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

A partir daí, um diagrama de solubilidade de fases é construído, podendo ser produzidas curvas do tipo A (que indicam a formação de complexos de inclusão solúveis com razão estequiométrica molar de 1:1 fármaco:ciclodextrina) ou B (que sugerem a formação de complexos de inclusão com pobre solubilidade). As curvas do tipo A são subdivididas em A_L (aumento linear da solubilidade do fármaco como uma função da concentração da ciclodextrina), A_P (desvio isotérmico positivo), e A_N (desvio isotérmico negativo) e as curvas do tipo B, em B_S (curva que denota complexos de limitada solubilidade) e B_I (curva que indica complexos insolúveis) (Figura 10) (CHALLA et al., 2005; CHO; JUNG, 2015).

Figura 10 - Diagrama de solubilidade de fases mostrando os tipos e subtipos de curvas A (A_L , A_P e A_N) e B (B_S e B_I)



Fonte: adaptado de CHO; JUNG (2015).

O diagrama de solubilidade de fases é obtido pela relação entre a concentração molar do fármaco e a concentração molar da ciclodextrina. A HP β CD, por exemplo, comumente forma complexos de inclusão solúveis, sendo produzidas, portanto, curvas do tipo A (CHALLA et al., 2005). Neste caso, como são formados complexos de inclusão 1:1, é possível calcular a constante de estabilidade a partir da porção linear da curva de solubilidade de fases utilizando a equação

$$K_{1:1} = \frac{slope}{S_0(1 - slope)}$$

em que “Slope” é a inclinação da reta e S_0 é a solubilidade intrínseca do composto, que pode ser assumida como igual ao valor do Y-intercepto da curva linear (CHALLA et al., 2005). No entanto, em decorrência da formação de interações hidrofóbicas, da presença de complexos múltiplos, bem como de condições não-ideais de saturação das soluções do fármaco, o valor de S_0 é frequentemente diferente do sugerido pelo Y-intercepto. Desta forma, a melhor maneira de comparar os efeitos solubilizantes das CDs é comparar suas eficiências de complexação (EC) (um parâmetro calculado sem levar em consideração a solubilidade intrínseca) pela utilização da seguinte equação: $EC = S_0 K_{1:1} = [D/CD]/[CD] = Slope/1 - Slope$, onde $[D/CD]$ é a concentração do complexo dissolvido; $[CD]$, a concentração de ciclodextrina livre dissolvida; e Slope é a inclinação do diagrama de solubilidade de fases (LOFTSSON et al., 2005).

2.3.3 Utilização de ciclodextrinas

Devido a sua capacidade de formar complexos de inclusão com diversos compostos, as ciclodextrinas vêm sendo amplamente utilizadas, principalmente pela indústria farmacêutica. Pesquisadores descreveram a utilização da HP β CD no aumento da solubilidade de produtos de origem natural, em particular, substâncias líquênicas, tais como: atranorina, ácido fumarprotocetrárico, ácido úsnico e ácido difractáico, todos compostos de baixa solubilidade em água (KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 2005; KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 2002; LIRA et al., 2009; SILVA et al., 2016).

Kristmundsdóttir e colaboradores (2005) observaram que o complexo de inclusão com ácido fumarprotocetrárico foi capaz de promover um aumento de quase 300 vezes em sua solubilidade; e ao testarem o complexo de inclusão com o

ácido úsnico obtido, verificaram que o mesmo apresentou atividade anti-proliferativa frente a linhagens celulares humanas malignas: T-47D (mama), Panc-1 (pâncreas) e PC-3 (próstata).

Há relatos na literatura de complexos de ciclodextrina com diversos fármacos, como β -lapachona (CAVALCANTI et al., 2011), sulfamerazina (RAJENDIRAN; MOHANDOSS; VENKATESH, 2014), clorzoxazona (TANG et al., 2015), clonidina (BRAGA et al., 2016), riluzol (WANG et al., 2016), dentre outros.

A despeito das inúmeras vantagens atribuídas à formação dos complexos de inclusão de fármaco com ciclodextrinas, muitas vezes apenas o mecanismo de complexação molecular não é suficiente para promover a liberação controlada do agente terapêutico. Com isso, a incorporação de complexos de inclusão em sistemas de liberação controlada poderia viabilizar a obtenção do perfil de liberação desejado (DE ROSA et al., 2005; FERNANDES et al., 2007).

A incorporação dos complexos de inclusão fármaco:ciclodextrina nestes sistemas pode aumentar a eficiência de encapsulação e a biodisponibilidade oral dos princípios ativos que estão associados, bem como, modular a cinética de liberação destes dispositivos terapêuticos (DUCHÊNE et al., 1999).

2.4 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA - SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

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

Os sistemas de liberação controlada desenvolvidos por essa tecnologia são dispositivos que liberam o princípio ativo de forma controlada, mantendo a concentração terapêutica apropriada por um longo período de tempo. Apresentam, assim, inúmeras vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, tais como: liberação progressiva do fármaco; direcionamento a alvos específicos; proteção do princípio ativo (diminuindo a sua retenção e/ou degradação pelo organismo); redução do número de doses e quantidade do fármaco administrado, bem como manutenção da concentração constante do princípio ativo no plasma;

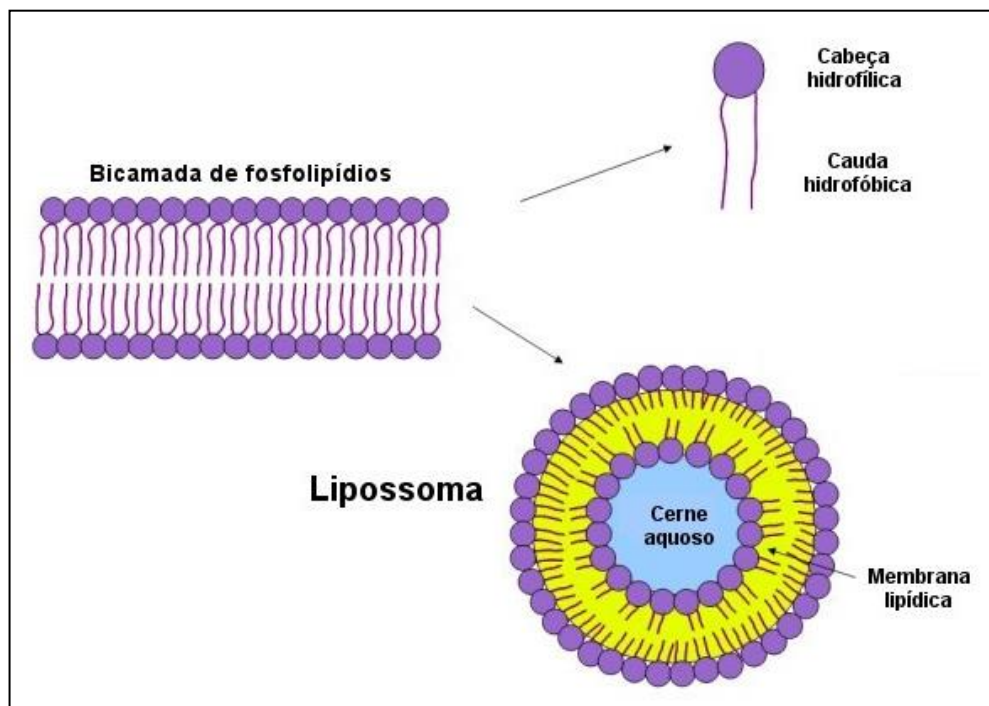
diminuição de efeitos adversos; maior conveniência para o paciente e redução dos custos na saúde (BRANNON-PEPPAS, 1995; PETITTI et al., 2008).

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

2.4.1 Lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas que possuem a propriedade de organizarem-se espontaneamente em meio aquoso. Os lipídeos se organizam de forma que suas cadeias hidrofóbicas interagem dando origem à bicamada e os grupos hidrofílicos orientam-se para solução extra-vesicular e a cavidade interna (Figura 11) (PAINI et al., 2015).

Figura 11 - Formação de estruturas fechadas em bicamadas a partir de fosfolipídeos em meio aquoso



Fonte: adaptado de BELHOCINE; PRATO (2011).

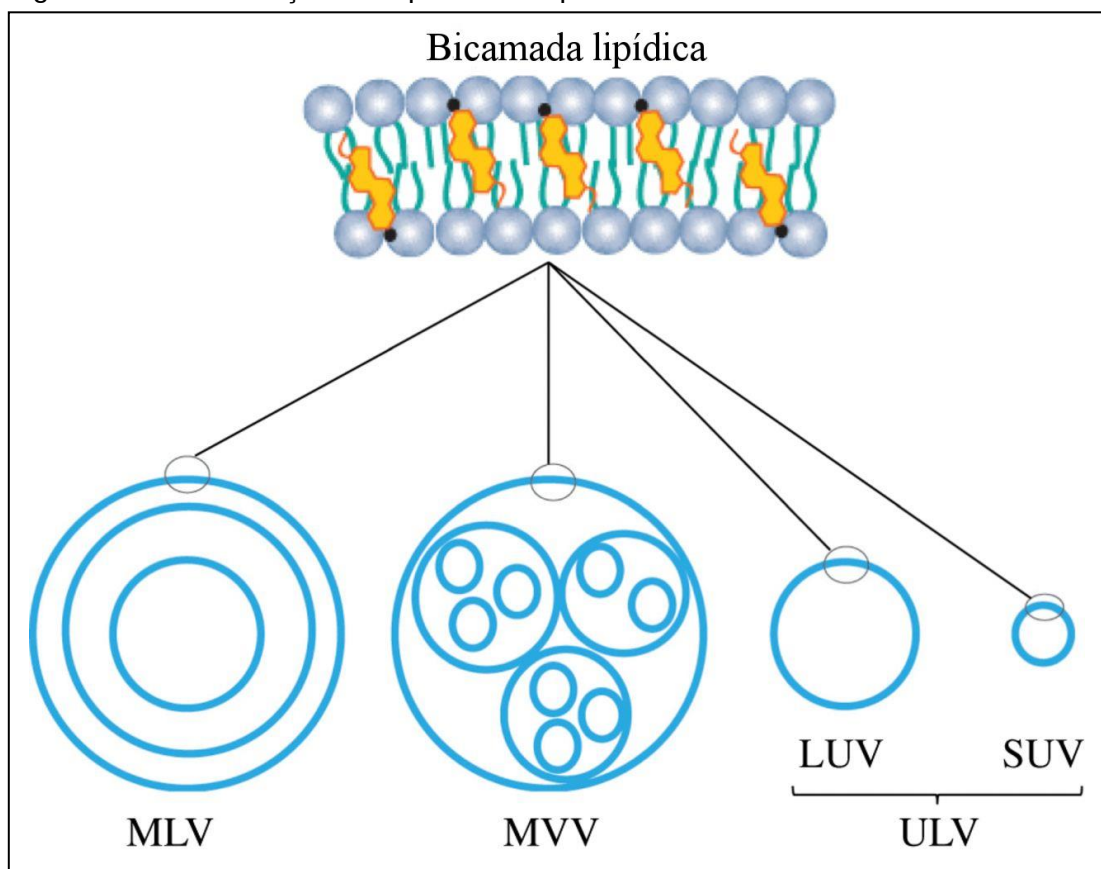
Tais partículas são consideradas excelentes formas de sistemas de liberação controlada de fármacos e substâncias biologicamente ativas graças a sua flexibilidade estrutural relacionada ao tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica e na sua capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas. Ademais, os lipossomas são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos, características bastante atrativas para o desenvolvimento de sistemas terapêuticos (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

Os lipossomas são constituídos basicamente de fosfolípídeos e esteróis (MONTEIRO et al., 2014). A fosfatidilcolina é o lipídeo mais empregado nas formulações de lipossomas, devido a sua grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA et al., 2007). Enquanto que o colesterol atua aumentando a fluidez da bicamada, reduzindo a permeabilidade a moléculas hidrossolúveis e melhorando a estabilidade das vesículas na presença de fluidos biológicos (MONTEIRO et al., 2014).

Recentemente, a literatura apontou o surgimento dos polimerossomos, que são vesículas poliméricas automontáveis formadas em meio aquoso por copolímeros em bloco anfífilos (SIMÓN-GRACIA et al., 2016). Por simularem lipossomas, uma vez que estes copolímeros de alto peso molecular possuem anfifilicidade similar aos lipídios, tornaram-se uma alternativa atrativa devido a sua alta capacidade de encapsular compostos hidrofílicos, hidrofóbicos ou anfífilos, caracterizando-os como sistemas excepcionais para a liberação de moléculas bioativas e a encapsulação de mais de um fármaco para terapia sinérgica (FIGUEIREDO et al., 2016; MARTIN et al., 2016).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com seu método de preparação, pelo número de bicamadas presentes na vesícula ou pelo seu tamanho; sendo as duas últimas as classificações mais utilizadas. Com base no número de bicamadas e vesículas, os lipossomas são classificados em vesículas unilamelares (ULVs), vesículas multilamelares (MLVs) ou vesículas multivesiculares (MVs). Além disso, com relação ao tamanho, os lipossomas unilamelares são classificados em vesículas unilamelares grandes (LUVs) e vesículas unilamelares pequenas (SUVs) (MONTEIRO et al., 2014) (Figura 12).

Figura 12 - Classificação dos lipossomas quanto ao número de bicamadas e tamanho



Fonte: adaptado de MONTEIRO et al. (2014).

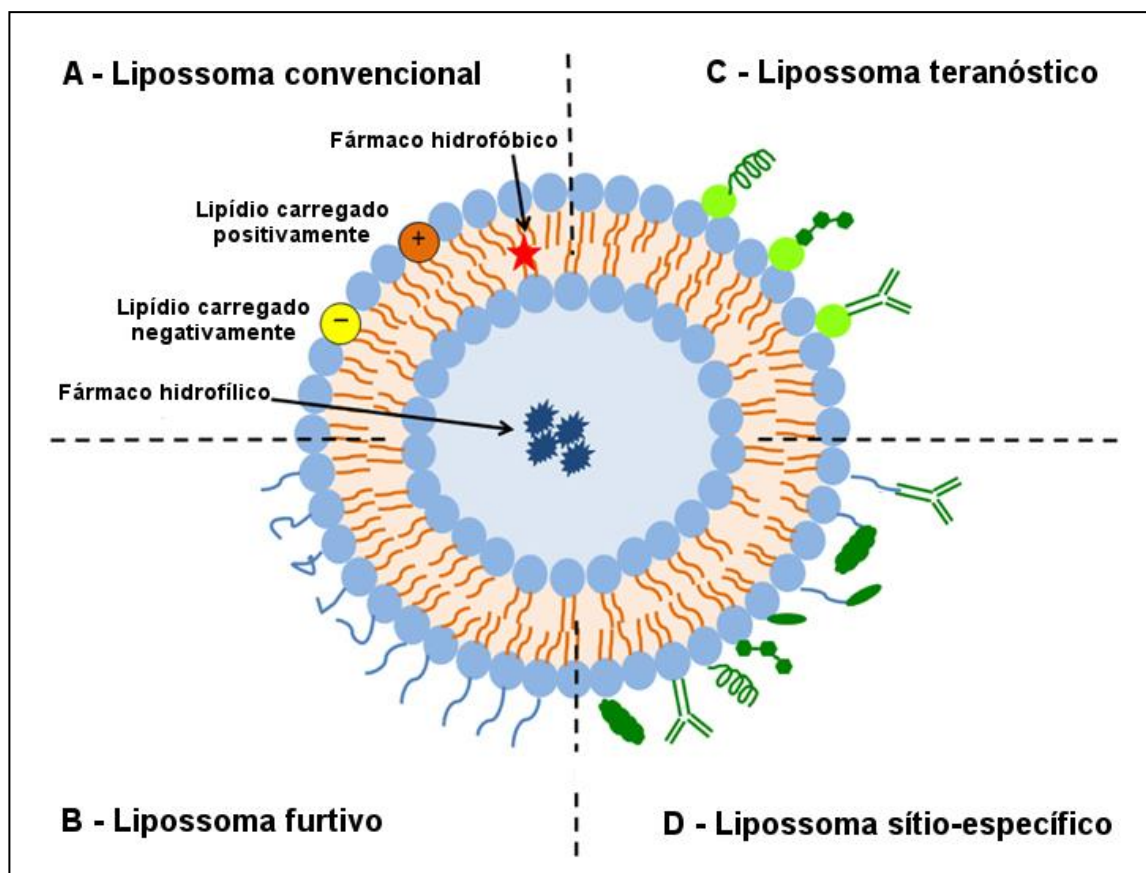
Diversos métodos foram desenvolvidos para a produção de lipossomas. O mais utilizado para a obtenção de formulações lipossomais é o método de hidratação do filme lipídico, onde os constituintes são dissolvidos em solvente orgânico, seguido pela evaporação do solvente e formação de um filme lipídico (LIRA et al., 2009; CAVALCANTI et al., 2011). Procede-se a hidratação do filme com água ou tampão sob agitação vigorosa, promovendo a formação da dispersão de lipossomas multilamelares. O momento da inclusão do fármaco durante a preparação das vesículas vai depender da natureza química do mesmo, sendo adicionados ao solvente orgânico (lipofílicos) ou solubilizados na solução tampão (hidrofílicos). Esta técnica produz lipossomas multilamelares, sendo necessária a aplicação de métodos mecânicos, eletrostáticos ou químicos para aquisição de lipossomas unilamelares, LUV's e SUV's. Os mais frequentes são os mecânicos, estando incluídos: a sonicação, o uso da prensa de French, homogeneizador/fluidificador e extrusão através de membrana de polycarbonato com variadas porosidades (BATISTA et al., 2007).

A aplicação de métodos para caracterização imediata seguida do preparo e armazenamento de lipossomas é requerida para o controle de qualidade da produção. Entre eles, prioriza-se a determinação do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão (PDI), pH, carga de superfície e o percentual da eficiência de encapsulação do fármaco (EE%) (VEMURI; RHODES, 1995). Ainda podem ser realizados estudos de estabilidade e análise dos aspectos macroscópicos, bem como a determinação da morfologia dos sistemas através de microscopia óptica e eletrônica (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000; ANDRADE et al., 2004).

Com relação a sua composição química, os lipossomas podem ser classificados em: lipossomas convencionais, que são compostos basicamente de fosfolípídeos, colesterol e/ou um lipídio com carga (positiva ou negativa); lipossomas de longa circulação ou furtivos, que são obtidos através do revestimento da superfície da bicamada lipídica com polímeros hidrofílicos sintéticos inertes e biocompatíveis, especificamente os polietilenoglicóis, ou componentes hidrofílicos naturais, como o monossialogangliosídeo (MG1) e fosfatidilinositol (TORCHILIN, 2005).

Além dos citados, existem ainda os lipossomas direcionados ou sítio-específicos, os quais caracterizam-se por apresentar em sua superfície moléculas como anticorpos, proteínas, carboidratos e peptídeos, sem o comprometimento da membrana lipídica e alteração na função do ligante. Outra categoria são os lipossomas polimórficos, aqueles que se tornam reativos devido a mudança na sua estrutura, mudança esta desencadeada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática. Dentre esses podemos citar os lipossomas catiônicos, sensíveis ao pH e termossensíveis. A literatura descreve ainda os lipossomas teranósticos, onde há um componente de imagem, um ligante direcionador e um agente terapêutico em um sistema único, sendo este simultaneamente uma ferramenta para terapêutica e diagnóstico (Figura 13) (BATISTA et al., 2007; SERCOMBE et al., 2015).

Figura 13 - Classificação dos lipossomas quanto à sua constituição. A - Lipossoma convencional, B - Lipossoma furtivo, C - Lipossoma teranóstico e D - Lipossoma sítio-específico

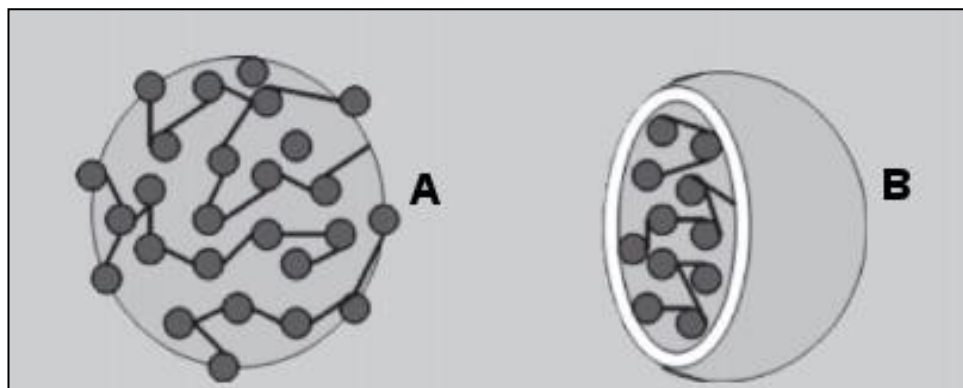


Fonte: adaptado de SERCOMBE et al. (2015)

2.4.2 Microesferas

As micropartículas são definidas como pequenas partículas sólidas e esféricas de tamanho entre 1 a 1000 μm . Nas micropartículas poliméricas, o fármaco pode estar encapsulado como um núcleo sólido, como uma solução, ou disperso na matriz polimérica; sendo classificadas em microcápsulas e microesferas. As primeiras são sistemas reservatórios contendo o fármaco em um núcleo central com revestimento polimérico que atua como um filme protetor; enquanto as microesferas são sistemas matriciais ou monolíticos, no qual o fármaco está uniformemente disperso e/ou dissolvido na matriz polimérica (Figura 14) (PETITTI et al., 2008; SINGH et al., 2001).

Figura 14 - Representação esquemática da classificação das micropartículas: (A) microesfera (sistema matricial) e (B) microcápsula (sistema reservatório)



Fonte: adaptado de PIMENTEL et al. (2007).

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

Os polímeros sintéticos mais comumente utilizados são ácidos poliamino, poliamidas, poliácridamidas, poliésteres, poliortoésteres e poliuretanos. Os poliésteres como poli- ϵ -caprolactona (PCL), polímero de ácido glicólico (PGA), polímero de ácido láctico (PLA) e copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) são bastante atrativos devido a características favoráveis, tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade e segurança para uso em humanos, já sendo oficialmente regulamentados para uso interno (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO et al., 2008).

Durante os últimos anos, pesquisas foram focadas no desenvolvimento de microesferas de polímeros biodegradáveis, como o PLGA, devido a inúmeros fatores, dentre os quais: capacidade de serem reabsorvidas pelo organismo, ação terapêutica prolongada e elevada eficiência de encapsulação associadas as suas dimensões, melhoria da estabilidade e da biodisponibilidade oral de fármacos,

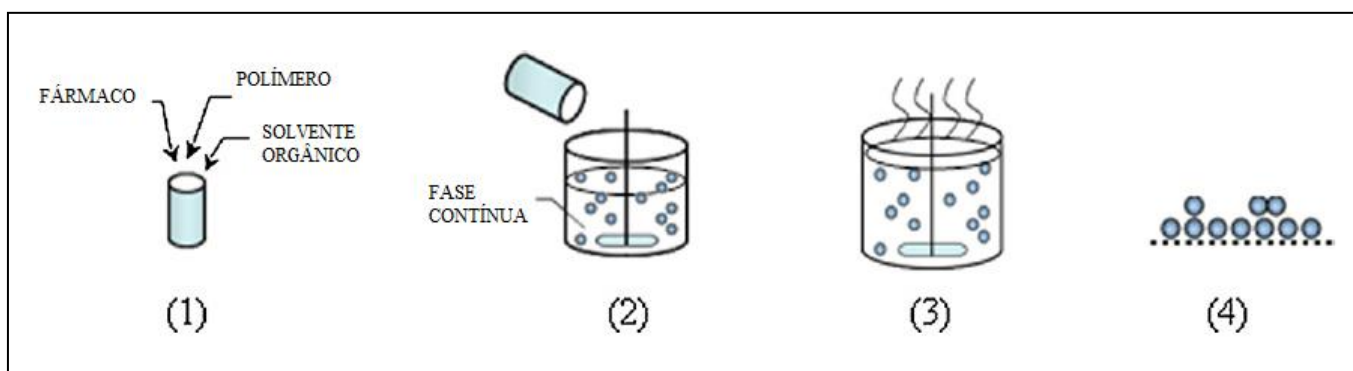
aumento da permeabilidade através do epitélio intestinal e facilidade de administração (MUTHU et al., 2009).

Os métodos usados na produção de microesferas geralmente envolvem princípios de evaporação e/ou difusão do solvente, coacervação, polimerização em emulsão, técnica de microemulsão, *spray-drying*, *salting out*, dentre outros (IQBAL et al., 2015).

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

As emulsões formadas nestes métodos podem ser do tipo simples, como de óleo/água (o/a, caracterizando um sistema rico em água) (Figura 15), óleo/óleo (o/o) ou múltiplas como água/óleo/água (a/o/a) (IQBAL et al., 2015).

Figura 15 - Método de preparação de microesferas por emulsificação (o/a) e evaporação do solvente: (1) solubilização dos componentes na fase oleosa orgânica, (2) mistura da fase orgânica com a fase contínua contendo emulsificante sob agitação, (3) evaporação do solvente, (4) separação das microesferas



Fonte: adaptado de LI et al. (2008).

Os parâmetros utilizados para caracterização físico-química dos sistemas obtidos são bem variados, podendo-se destacar: avaliação macroscópica e microscópica, tamanho e distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação, potencial zeta, interações e incompatibilidades entre os componentes da formulação, estudos de estabilidade acelerada e a longo prazo e cinética de liberação *in vitro* (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000).

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

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, S.I. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: involvement of immunomodulation markers, hsp70 and bcl-2-associated x protein. **International Immunopharmacology**, 16, 296–305, 2013.
- ANDRADE, C.A.S., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., NASCIMENTO, S.C., SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435-445, 2004.
- ASOKKUMAR, K.; SEN, S.; UMAMAHESWARI, M.; SIVASHANMUGAM, A.T.; SUBHADRADEVI, V. Synergistic effect of the combination of gallic acid and famotidine in protection of rat gastric mucosa. **Pharmacological reports**, 66, 594–599, 2014.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Adv.**, 5, 27540, 2015.
- BALMAYOR, E.R.; TUZLAKOGLU, K.; AZEVEDO, H.S.; REIS, R.L. Preparation and characterization of starch-poly-ε-caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1035–1045, 2009.
- BATISTA, C. M. et al. Complexos de inclusão e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, 2007.
- BELHOCINE, T.Z.; PRATO, F.S. Transbilayer phospholipids molecular imaging. **EJNMMI Research**, v. 1, n. 17, 2011.
- BENITEZ, F. J. et al. Gallic acid degradation in aqueous solutions by UV/H₂O₂ treatment, Fenton's reagent and the photo-Fenton system. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 126, p. 31–39, 2005.
- BENNETT, C. J. et al. Potential therapeutic antioxidants that combine the radical scavenging ability of myricetin and the lipophilic chain of vitamin E to effectively inhibit microsomal lipid peroxidation. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 9, p. 2079–98, 2004.
- BENOIT, M.-A.; BARAS, B.; GILLARD, J. Preparation and characterization of protein-loaded poly(ε-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 1999;184:73-84.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 5 edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2004.
- BITAN-CHERBAKOVSKY, L.; ASERIN, A.; GARTI, N. Structural characterization of lyotropic liquid crystals containing a dendrimer for solubilization and release of gallic acid. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 112, p. 87–95, 2013.

BOZIC, M.; GORGIEVA, S.; KOKOL, V. Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acid for modulating antioxidant and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n.4, p. 2388–2398, 2012.

BRAGA M.A; MARTINI M.F.; PICKHOLZ M.; YOKAICHIYA F.; FRANCO M.K.D; CABEC, L.F.; GUILHERME V.A.; SILVA C.M.G.; LIMIA C.E.G.; DE PAULA E. Clonidine complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: From physico-chemical characterization to in vivo adjuvant effect in local anesthesia. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 119, p. 27–36, 2016.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 1995;116:1-9.

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

BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2007.

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

CALAM, J.; BARON J.H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **BMJ** 2001 :323:980. 2001.

CARVALHO J. C. T, GOSMANN, G; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 519-535.

CARVALHO, A.S.T. Úlcera péptica. **Jornal de Pediatria**, v. 76, p. 127-134, 2000.

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

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

CHO, E.; JUNG, S. Supramolecular Complexation of Carbohydrates for the Bioavailability Enhancement of Poorly Soluble Drugs. **Molecules** v. 20, 19620-19646, 2015.

CHUBINEH, S.; BIRK, J. Proton pump inhibitors: the good, the bad, and the unwanted. **Southern Medical Journal**. v. 105, n. 11, p. 613-618, 2012.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.10, p.141-152, 2001.

CONNORS, K.A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. **Chem. Rev.**, v.97, p.1325-1358, 1997.

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

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

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

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

DÍAZ-GÓMEZ, R. et al. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 331–335, 2013.

DÍAZ-GOMEZ, R.; TOLEDO-ARAYA, H.; LOPEZ-SOLÍS, R.; OBREQUE-SLIER, E. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. **LWT - food science and technology**, 59, 896E900, 2014.

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

EDWARDS, K. A; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, n. 5, p. 1421–31, 2006.

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

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

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

FIGUEIREDO, P.; BALASUBRAMANIANA, V.; SHAHBAZIA, M.; CORREIA, A.; WU, D.; PALIVAN, C.G.; HIRVONEN, J.T.; SANTOS, H.A. Angiopep2-functionalized polymersomes for targeted doxorubicin delivery to glioblastoma cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, p. 794–803, 2016.

FIUZA, S. M. et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 13, p. 3581–9, 2004.

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

GALLI, F. Interactions of polyphenolic compounds with drug disposition and metabolism. **Current drug metabolism**, v. 8, n. 8, p. 830–8, 2007.

GHARIB, R.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S.; CHARCOSSET, C.; AUEZOVA, L. Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge. **Carbohydrate Polymers**, n. 129, p. 175-186, 2015.

GIL-LONGO, J.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Vascular pro-oxidant effects secondary to the autoxidation of gallic acid in rat aorta. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 4, p. 304–9, 2010.

GOVEA-SALAS, M.; RIVAS-ESTILLA, A.M., RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; LOZANO-SEPÚLVEDA, S.A.; AGUILAR-GONZALEZ, C.N.; ZUGASTI-CRUZ, A.; SALAS-VILLALOBOS, T.B.; MORLETT-CHÁVEZ J.A. Gallic acid decreases hepatitis c virus expression through its antioxidant capacity. **Exp ther med**, 11(2): 619–624, 2016.

HALTER, F.; SCHMASSMANN, A.; TARNAWSKI, A. Review article: healing of experimental gastric ulcers. Interference by gastric acid. **Digestive diseases and sciences**, v. 40, n. 11, p. 2481-2486, 1995.

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

HAROLD, B.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**. 117(5): 1219–1222. 2007

HO, C.-C. et al. Gallic acid inhibits murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes macrophage phagocytosis. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 23, n. 3, p. 409–13, 2009.

HO, H.-H. et al. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-kappaB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase

signals. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 48, n. 8-9, p. 2508–16, 2010.

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P. J. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003.

HSU, C.-L.; LO, W.-H.; YEN, G.-C. Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes via a Fas- and mitochondrial-mediated pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7359–65, 2007.

HUANG, K.-W.; YU, C.-J.; TSENG, W.-L. Sensitivity enhancement in the colorimetric detection of lead(II) ion using gallic acid-capped gold nanoparticles: improving size distribution and minimizing interparticle repulsion. **Biosensors & bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 984–9, 2010.

IQBAL, M.; ZAFAR, N.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 173–190, 2015.

KAUR, M. et al. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 9, p. 2133–40, 2009.

KAZUMORI, H.; ISHIHARA, S.; RUMI, M. A. K. Transforming growth factor directly augments histidine decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat enterochromaffin-like cells. **Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.** v.286, p. 508-514, 2004.

KIM, S.-H. et al. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 123–31, 2006.

KIM, Y.-J. Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid. **Biol. Pharm. Bull.**, 30, 1052–1055, 2007.

KRATZ, J.M.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; KOLLING, D.J.; LEAL, P.C.; CIRNE-SANTOS, C.C.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; FRUGULHETTI, I.CPP.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol.103 n.5, 2008.

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

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

KUTTY, K.; SCHAPIRA, R. M.; RUISWYK, J. V.; KOCHAR, M. S.; Úlcera péptica. In: **Tratado de Medicina Interna.**, Rio de Janeiro, Guanabara-koogan, p. 398-400, 2005.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.

LAM, P.-L. et al. Development of formaldehyde-free agar/gelatin microcapsules containing berberine HCl and gallic acid and their topical and oral applications. **Soft Matter**, v. 8, n. 18, p. 5027, 2012.

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

LI, D. et al. A straightforward method to determine the cytocidal and cytopathic effects of the functional groups of gallic acid. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2210–2214, 2011.

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

LIAO, C.-L. et al. Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 50, n. 5, p. 1734–40, 2012.

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

LIU, J. et al. Synthesis of chitosan-gallic acid conjugate: Structure characterization and in vitro anti-diabetic potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 321–9, 2013.

LIU, Y. H.; ZHANG, Z. B.; ZHENG, Y. F.; CHEN, H. M.; YU, X. T; CHEN, X.Y.; ZHANG, X; XIE, J. H.; SU, Z. Q.; FENG, X. X.; ZENG, H. F.; SU, Z. R. Gastroprotective effect of andrographolide sodium bisulfite against indomethacin-induced gastric ulceration in rats. **Int. Immuno.**, v. 26, p. 384–391, 2015.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 233–9, 2013.

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

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

LU, Y. et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, n. 2-3, p. 102–107, 2010.

MADLENER, S. et al. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 245, n. 1-2, p. 156–62, 2007.

MANSOURI, M. T. et al. Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 111, p. 90–6, 2013.

MARTIN,C.; MARINO, N.; CURRAN, C.; MCHALE, A.P.; CALLAN, J.F.; CALLAN, B. Cholesteryl to improve the cellular uptake of polymersomes within HeLa cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, p. 570–578, 2016.

MASOUD M.S.; ALI A.E.; HAGGAG S.S.; NASR NM. Spectroscopic studies on gallic acid and its azo derivatives and their iron(iii) complexes. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, 120:505-511, 2014.

MASOUD, M. S. et al. Synthesis and spectroscopic characterization of gallic acid and some of its azo complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1014, p. 17–25, 2012.

MEDICINA GERIÁTRICA, GERIATRIA E GERONTOLOGIA. **Dispepsia – O que é?** Disponível em: <<http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/celulas-parietais-do-estomago/>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

MELO, R. et al. Radiolytic degradation of gallic acid and its derivatives in aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2-3, p. 1185–92, 2009.

MILANI, S.; CALABRO, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microsc Res Tech** 53. p. 360-371, 2001.

MONTEIRO, N.; MARTINS, A.; REIS, R.L.; NEVES, N.M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **J. R. Soc. Interface** 11: 04, 59. 2014.

MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n.8, p.469-475, 2005.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds: a Review. **Pharmaceutics**, v.3, n.4, p.793–829, 2011.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 226–238, 2015.

MUTHU, M.S.; RAWAT, M.K.; MISHRA, A.; SINGH, S. PLGA nanoparticle formulations of risperidone: preparation and neuropharmacological evaluation. **Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.**, v. 5, n. 3, p. 323-333, 2009.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Optimization of brain targeted gallic acid nanoparticles for improved antianxiety-like activity. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 57, n. 0436, p. 83–91, 2013.

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; FERREIRA, D. M.; SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137–142, 2013.

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

NEO, Y. P. et al. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: a physicochemical study based on zein-gallic acid system. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 1013–21, 2013.

OFMAN, J. J. The quality of care for medicare patients with peptic ulcer disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, 2000.

PAINI, M.; DALY, S.R.; ALIAKBARIAN, B.; FATHI, A.; TEHRANY, E.A.; PEREGO, P.; DEHGHANI, F.; VALTCHEV, P. An efficient liposome based method for antioxidants encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 1067–1072, 2015.

PAL, C.; BINDU, S.; DEY, S.; ALAM, A.; GOYAL, M.; IQBAL, M.S.; MAITY, P.; ADHIKARI, S.S.; BANDYOPADHYAY, U. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. **Free radical biology & medicine**, 49, 258–267, 2010.

PASANPHAN, W.; CHIRACHANCHAI, S. Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 169–177, 2008.

PENG, C. C. Ferulic acid is nephrodamaging while gallic acid is renal protective in long term treatment of chronic kidney disease. **Clinical Nutrition**, v. 31, p. 405-414, 2012.

PETITTI, M.; BARRESI, A.A.; VANNI, M. Controlled release of vancomycin from PCL microcapsules for an ophthalmic application. **Chem. Eng. Res. Des.**, v.87, p.859-866, 2009.

PETITTI, M.; VANNI, M.; BARRESI, A.A. Controlled release of drug encapsulated as a solid core: Theoretical model and sensitivity analysis. **Chem. Eng. Res. Des.** v. 86, p. 1294–1300, 2008.

PIMENTEL, L.F.; JÁCOME-JÚNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V.C.F; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** vol. 43, n. 4, 2007.

POLEWSKI, K.; KNIAT, S.; SKA, D. S. Ł. A. W. I. N. Gallic acid , a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment : spectroscopic studies. **Current Topics in Biophysics**, v. 26, n. 2, p. 217–227, 2002.

RAINA, K. et al. Chemopreventive effects of oral gallic acid feeding on tumor growth and progression in TRAMP mice. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 5, p. 1258–67, 2008.

RAJENDIRAN, N.; MOHANDOSS, T.; VENKATESH, G. Investigation of inclusion complexes of sulfamerazine with α - and β -cyclodextrins: An experimental and theoretical study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 124, p. 441–450, 2014.

RIMBARA, E.; FISCHBACH, L.A.; GRAHAM, D.Y. Optimal therapy for Helicobacter pylori infections. **Gastroenterol. Hepatol.** 8:79-88, 2011.

ROSA, C. G. et al. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 138–146, 2013.

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

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzantine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, 2000;208:71-80.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 20, p. 519–525, 2004.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v.134, n.7, p.1842-1860, 2008.

SENEVIRATHNE, M. et al. Prevention of oxidative stress in Chang liver cells by gallic acid-grafted-chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 876–880, 2012.

SERCOMBE L; VEERATI T; MOHEIMANI F; WU SY; SOOD AK; HUA S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. **Front. Pharmacol.** 6:286, 2015.

SILVA, C.V.N.S.; BARBOSA, J.A.P.; FERRAZ, M.S.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; RABELLO, M.M.; HERNANDES, M.Z.; BEZERRA, B.P.; CAVALCANTI, I.M.F.; AYALA, A.P.; SANTOS, N.P.S.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP--CD inclusion complex encapsulated in microspheres. **Int. J. Biol. Macromol.**, n. 92, p. 494-503, 2016.

SIMÓN-GRACIA, L.; HUNT, H.; SCODELLER, P.; GAITZSCH, J.; KOTAMRAJU, V.R.; SUGAHARA, K.N.; TAMMIK, O.; RUOSLAHTI, E.; BATTAGLIA, G.; TEESALU, T. iRGD peptide conjugation potentiates intraperitoneal tumor delivery of paclitaxel with polymersomes. **Biomaterials**, v. 104, p. 247-257, 2016.

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

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

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

SU, H. et al. Fluorescence detection of cyromazine using gallic acid-reduced gold nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 174, p. 458–464, 2012.

SUBRAMANIAN, V. et al. Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 66C, p. 44–55, 18, 2014.

TANG, P.; LI, S.; WANG, L.; YANG, H.; YAN, J.; LI, H. Inclusion complexes of chlorzoxazone with α - and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p.297–305, 2015.

TARNAWSHI, A. Cellular and molecular mechanism of gastrointestinal ulcerhealing. **Dig. Dis. Sci.**, v.50, s.1, p.24-33, 2005.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 302–315, 2012.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 145–60, 2005.

VASIR, J. K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, n. 1-2, p. 13–32, 2003.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: molecular rival of cancer. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473–85, 2013.

WALLACE, J. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **Am J Med**. v.110, p. 19S–23S, 2001.

WANG, L.; YAN, J.; LI, Y.; XU, K.; LI, S.; TANG, P.; LI, H. The influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility, dissolution, cytotoxicity, and binding of riluzole with human serumalbumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 453–463, 2016.

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

WIKIMEDIA COMMONS, THE FREE MEDIA REPOSITORY. "**File:Estomago.svg**". Wikimedia Commons contributors. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Estomago.svg&oldid=185364786>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S.P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, 364:298-327, 2008.

YOSHINO, M. et al. Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 16, n. 6, p. 705–9, 2002.

YOU, B. R. et al. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 48, n. 5, p. 1334–40, 2010.

YOU, B. R.; PARK, W. H. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 24, n. 5, p. 1356–1362, 2010.

YU, S.-H. et al. Preparation and characterization of radical and pH-responsive chitosan–gallic acid conjugate drug carriers. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 794–802, 2011.

CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido ao *International Journal of Biological Macromolecules*

MICROESFERAS CONTENDO ÁCIDO GÁLICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA EM RATOS WISTAR

Camilla Vila Nova Soares Silva^{1,2,3}, Jefferson de Lima², José Alex Alves dos Santos⁴, Sandrelly Meridiana de Fátima Ramos dos Santos Medeiros⁴, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior⁴, Noemia Pereira da Silva Santos^{2,3}, Nereide Stela Santos Magalhães^{1,2*}.

¹*Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde/UFPE;*

²*Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)/UFPE;*

³*Laboratório de Nanotecnologia e Cultura de Células (NanoBioCel)/Centro Acadêmico de Vitória/UFPE,*

⁴*Laboratório de Biotecnologia e Fármacos/Centro Acadêmico de Vitória/UFPE.*

RESUMO

O presente estudo objetivou desenvolver e caracterizar microesferas de PLGA contendo ácido gálico, visando avaliar sua atividade antiúlcera. As microesferas foram preparadas pelo método de emulsão múltipla com evaporação do solvente e caracterizadas físico-quimicamente. A atividade gastroprotetora foi realizada utilizando ratos Wistar, divididos em quatro grupos (controle positivo, sem indução de úlcera; controle negativo, com indução de úlcera, sem tratamento; AG livre e Micro-AG), pré-tratados 30 minutos antes da indução da úlcera gástrica com indometacina por via oral. O estômago e o duodeno foram removidos para análise histológica, avaliando-se área com muco, espessura do epitélio glandular e vilosidades intestinais. Os resultados foram analisados pelo teste *t*-Student. Microesferas contendo ácido gálico foram obtidas, com tamanho médio de partícula de $15,89 \pm 1,33 \mu\text{m}$, índice de polidispersão 1,33, carga negativa e eficiência de encapsulação de $58,33 \pm 0,08 \%$. Em relação à área de muco no estômago, os resultados mostraram que no grupo AG livre os animais permaneceram com média da área de muco semelhante ao grupo onde não houve indução da úlcera ($6,5 \pm 1,5 \mu\text{m}^2$ e $7,85 \pm 1,9 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Por outro lado, o grupo Micro-AG exibiu uma área ($7,0 \pm 1,4 \mu\text{m}^2$) próxima ao grupo com úlcera não tratada ($6,05 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$), apresentando atividade antiulcerogênica moderada, mas sem potencialização do efeito do ácido gálico. A investigação dos danos epiteliais do grupo AG livre apresentou valores superiores aos demais grupos ratificando novamente sua ação gastroprotetora. As análises de muco no duodeno a pH 2,5 revelaram uma área média de $14,5 \pm 13,7 \mu\text{m}^2$ para o controle positivo, $5,3 \pm 3,42 \mu\text{m}^2$ para o controle negativo, $6,0 \pm 3,52 \mu\text{m}^2$ e $7,03 \pm 3,67 \mu\text{m}^2$ para os grupos AG livre e Micro-AG, respectivamente. Em relação à análise das vilosidades intestinais, o grupo Micro-AG apresentou atividade protetora, com uma extensão média de $391,48 \pm 117,02 \mu\text{m}$, tamanho este inferior ao grupo AG livre, mas superior ao controle negativo ($310,10 \pm 52,0 \mu\text{m}$). Deste modo, sugere-se que a encapsulação do ácido gálico em microesferas pode tornar-se uma alternativa para superar suas limitações, com o sistema podendo apresentar-se viável para aplicação no tratamento de úlceras gástricas.

Palavras-chave: Ácido gálico. Microesferas. Úlcera.

ABSTRACT

This study aimed to develop and characterize PLGA microspheres containing gallic acid, to evaluate its anti-ulcer activity. Microspheres were prepared by the method of multiple emulsion solvent evaporation and characterized physicochemically. The gastroprotective activity was performed using male Wistar rats divided into four groups (positive control, without ulcer induction; negative control, ulcer induction without treatment; free AG and Micro-AG), pre-treated 30 minutes before the induction of gastric ulcer, indomethacin orally. Stomach and duodenum were removed for histological analysis, by evaluating area with mucus, thickness of glandular epithelium and villi. The results were analyzed by t-test. Microspheres containing gallic acid were obtained, with an average particle size of 15.89 ± 1.33 micrometres, polydispersity index of 1.33, negative charge and an encapsulation efficiency of 58.33 ± 0.08 %. Regarding the mucus area in the stomach, results showed that the free AG group animals remained with a mean mucus area similar to the group where no ulcer was induced ($6.5 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$ and $7.85 \pm 1.9 \mu\text{m}^2$, respectively). On the other hand, the micro-AG group showed an area ($7.0 \pm 1.4 \mu\text{m}^2$) next to the group treated with non ulcer ($6.05 \pm 1.7 \mu\text{m}^2$) with moderate antiulcer activity but no potentiation of the gallic acid effect. The investigation of epithelial damage of free AG group had higher values than the other groups treated, again confirming its gastroprotective action. The mucus analyzes at the duodenum at pH 2.5 showed an average area of $14.5 \pm 13.7 \mu\text{m}^2$ for the positive control, $5.3 \pm 3.42 \mu\text{m}^2$ for the negative control, $6.0 \pm 3.52 \mu\text{m}^2$ and $7.03 \pm 3.67 \mu\text{m}^2$ for free AG groups and Micro-AG, respectively. Regarding the analysis of intestinal villi, the Micro-AG group showed protective activity, with an average length of $391.48 \pm 117.02 \mu\text{m}$ this lower than the free AG group, but higher than the negative control ($310.10 \pm 52.0 \mu\text{m}$). Thus, it is suggested that the encapsulation of gallic acid in microspheres can become an alternative to overcome the limitations, with the system being viable for application in the treatment of gastric ulcers.

Keywords: Gallic acid. Microspheres. Ulcer.

1 INTRODUÇÃO

O ácido gálico (AG) (3,4,5-ácido trihidroxibenzóico) caracteriza-se como um polifenol endógeno de plantas, encontrado abundantemente em chás, uvas e outras frutas, bem como no vinho (SINGH et al., 2004). Também é encontrado no caule de algumas árvores, como o carvalho (*Quercus robur*), castanheira (*Castanea sativa* L.) e outras (EYLES et al., 2004; MURUGANANTHAN et al., 2005). Tem coloração amarelo esbranquiçada, apresentando-se na forma de cristais, com massa molecular de 170.12 g/mol, temperatura de fusão de 250 °C e solubilidade em água de 1.1% at 20 °C (POLEWSKI et al., 2002).

Possui forte atividade antioxidante (KIM et al., 2002), anti-inflamatória (KROES et al., 1992), antimutagênica (GICHNER, 1987) e antitumoral (MIRVISH et al., 1975; INOUE et al., 1995). Também possui propriedade pró-oxidante em concentração dose-dependente na presença de íons metálicos.

O AG inibe a liberação de histamina a partir de mastócitos e impede a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais desempenham um papel importante no desenvolvimento da úlcera gastroduodenal. Possui ainda a capacidade de restaurar lesões da mucosa gástrica induzidas por indometacina através da modulação da resposta inflamatória. Estudos verificaram que o composto foi capaz de proteger hepatócitos humanos de estresse oxidativo induzido por H₂O₂, apresentando também atividade anti-apoptótica. O ácido gálico pode quelar Fe (III) livre, formando um complexo. Assim, verifica-se que o AG possui potencial para prevenir a gastropatia induzida por indometacina através da quelação do Fe (III) e bloqueando a apoptose das células da mucosa gástrica mediada pelo estresse oxidativo (PAL et al., 2010).

No entanto, apesar de todas as atividades biológicas que possui, o AG tem características físico-químicas que restringem seu uso na terapia. Visando contornar este fato, o emprego de sistemas de liberação controlada surge como um meio atraente para sua utilização e potencialização de suas atividades (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Dentro desse contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar microesferas de PLGA contendo ácido gálico, visando avaliar sua atividade gastroprotetora.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E AMOSTRAS

O ácido gálico (AG) foi fornecido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A acetonitrila, o metanol e o diclorometano foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), todos de grau analítico. PVA (PM 30.000-70.000) e PEG (PM 3.350), juntamente com o crioprotetor trealose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). PLGA foi obtido a partir da Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Alemanha). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada.

2.2 PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO GÁLICO (MICRO-AG)

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

2.2.1 Caracterização físico-química das microesferas

2.2.2.1 Tamanho de partícula e índice de polidispersão

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

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

2.2.2.2 Eficiência de encapsulação das microesferas

A eficiência de encapsulação do ácido gálico nas microesferas foi determinada por espectrofotometria (Ultrospec 3000 Pro, Amersham Pharmacia Biotech, EUA), utilizando método previamente validado. Amostras de microesferas liofilizadas (5 mg) foram diluídas em 25 mL de uma mistura de diclorometano:metanol (3:2) e submetidas à sonicação durante 10 min. Uma alíquota dessa solução foi então diluída para a concentração teórica de 5 µg/mL. O ácido gálico foi determinado em 268 nm utilizando-se curva padrão na faixa de concentração de 1 - 10 µg/mL em acetonitrila. Microesferas da formulação branca foram submetidas ao mesmo método de doseamento para demonstrar a ausência de interferência dos constituintes da formulação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.2.3 Carga de superfície

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

2.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia de superfície das microesferas foi examinada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se um microscópio JEOL JSM-5600LV (JEOL, Japão). Uma amostra de microesferas liofilizada foi colocada em uma extremidade do stub adesivo, coberta com ouro coloidal e analisada como mencionado acima (magnificação de 1000x).

2.3 ESTUDO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE MICROESFERAS CONTENDO ÁCIDO GÁLICO EM ÚLCERAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATOS WISTAR

2.3.1 Animais

O protocolo para estudos com animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (Processo 23076.034718/2015-14). Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando de 200 a 250 g, procedentes do Biotério do Departamento de Nutrição, UFPE. Os animais foram mantidos em ciclos claro-escuro de 12 h, a 24 ± 2 °C, com água e ração *ad libitum*. Nas 24 h anteriores ao experimento, os ratos foram submetidos a jejum de ração e água.

2.3.2 Desenho experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos (n = 5): grupo controle positivo (sem indução de úlcera), controle negativo (com indução de úlcera, sem tratamento), AG livre e Micro-AG (microesferas de PLGA contendo ácido gálico). Nos grupos AG livre e Micro-AG, os animais receberam tratamento 30 min antes da indução da úlcera gástrica, a qual ocorreu através da administração oral de indometacina na dose de 48 mg/kg. Após 4 h, os animais foram sacrificados por eutanásia com overdose do anestésico (Urethane 1,25 g/kg), estômago e duodeno foram retirados, lavados em tampão PBS pH 7,4 e fixados em formalina tamponada para posterior análise de histomorfometria e histopatologia.

2.3.3 Análises histopatológicas e histomorfométricas de estômago e duodeno de ratos

O estômago e o duodeno coletados foram clivados e imersos em uma solução de formol a 10 % neutro tamponado (NBF), permanecendo nesta solução por 48 h. Após esse procedimento, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 4 µm. Finalmente, os cortes obtidos foram transferidos para lâminas untadas com albumina e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C, por 24 h para secagem. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração por Alcian Blue e Hematoxilina-Eosina (H.E.).

As imagens histológicas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3.0) acoplada ao microscópio óptico (Nikon-E200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 10 campos por lâmina com aumento final de 400x. As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.3.4 Análise da presença de muco

A análise do muco presente tanto no estômago como no intestino foi efetuada através de cortes corados com Alcian Blue em pH 1,0 e 2,5, específicos para sulfomucinas e sialomucinas/sulfomucinas, respectivamente. A análise foi realizada

utilizando 50 campos de 100 μ m x 100 μ m, por grupo de animais, escolhidos aleatoriamente, utilizando a contagem automática do programa através da ferramenta de segmentação de cores. Os resultados foram obtidos a partir da área encontrada em μ m².

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROESFERAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO GÁLICO

A Tabela 1 mostra as propriedades de eficiência de encapsulação, tamanho médio de partícula (d_v), polidispersão (*span*) e potencial zeta (ζ) das Micro-AG comparadas à formulação branca.

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

Fármaco:Polímero (1:11)	Eficiência de Encapsulação $\pm$ D.P.* (%)	$d_v \pm$ D.P. (μ m)	<i>span</i>	Potencial Zeta (ζ) $\pm$ D.P. (mV)
Branca	-	12,23 $\pm$ 1,39	0,97	- 7,85 $\pm$ 0,56
AG	58,33 $\pm$ 0,08	15,89 $\pm$ 1,33	1,10	- 12,68 $\pm$ 0,32

* Desvio Padrão.

Fonte: A Autora (2016).

Wang e colaboradores (2009) também observaram diminuição da eficiência de encapsulação para a rodamina (usada como um modelo de fármaco hidrossolúvel) quando encapsulada em microesferas de PLGA visto a relativa hidrofobicidade do polímero. Quanto maior a afinidade entre fármaco e o polímero,

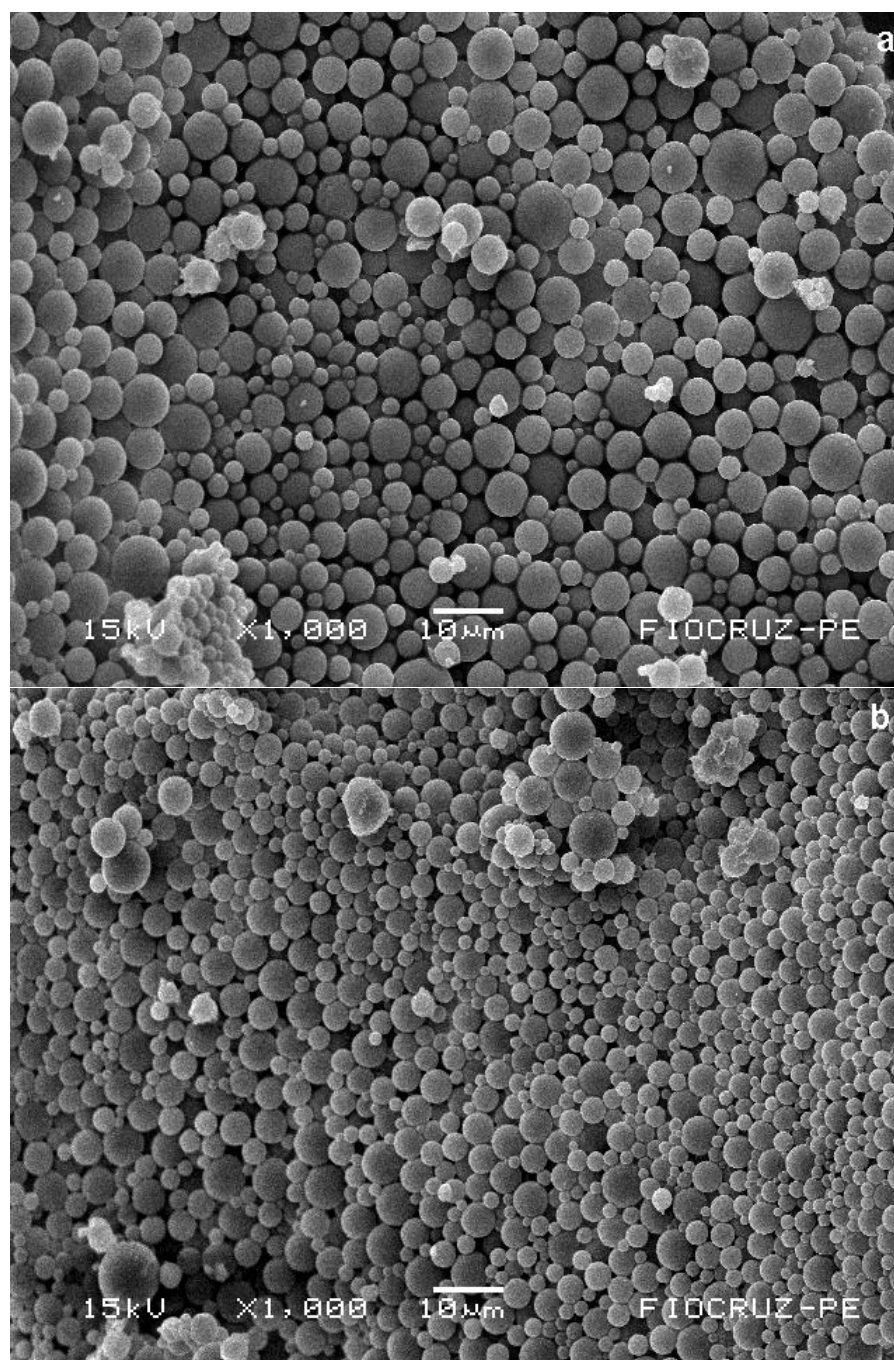
maior a tendência do fármaco ser incorporado à matriz polimérica (RUAN et al., 2002; ZHOU et al., 2004). Uma diminuição na eficiência de encapsulação também foi encontrada por Maestrelli e colaboradores (2008) quando da incorporação de cetoprofeno em microesferas de PLGA.

O tamanho das micropartículas poliméricas também foi fortemente influenciado pela presença e concentração de AG, produzindo partículas maiores com relação às microesferas brancas (DE ROSA et al., 2005). No entanto, houve um aumento no valor de *span* das Micro-AG (1,10) quando comparado ao *span* das microesferas brancas (0,97), sugerindo uma população heterogênea, uma vez que o valor foi maior que 1,00 (RIBEIRO-COSTA et al., 2009).

O potencial zeta (ζ) das microesferas de PLGA da formulação branca e das Micro-AG (Tabela 1) revelou que os valores do potencial zeta das Micro-AG tornaram-se mais negativos em relação às microesferas de PLGA brancas ($\zeta = -7,85 \pm 0,56$ mV). Esse fenômeno pode estar associado provavelmente à presença de moléculas do fármaco adsorvidas na parede polimérica das microesferas, o que pode influenciar na carga de superfície (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

As micrografias apresentaram microsferas com boa esfericidade e superfície lisa, sem poros (Figura 1). A encapsulação do ácido gálico em microesferas de PLGA não provocou nenhuma mudança significativa em sua morfologia (SILVA et al., 2016).

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura de microesferas brancas de PLGA (a) e contendo ácido gálico (Micro-AG) (b). Magnificação de 1000x

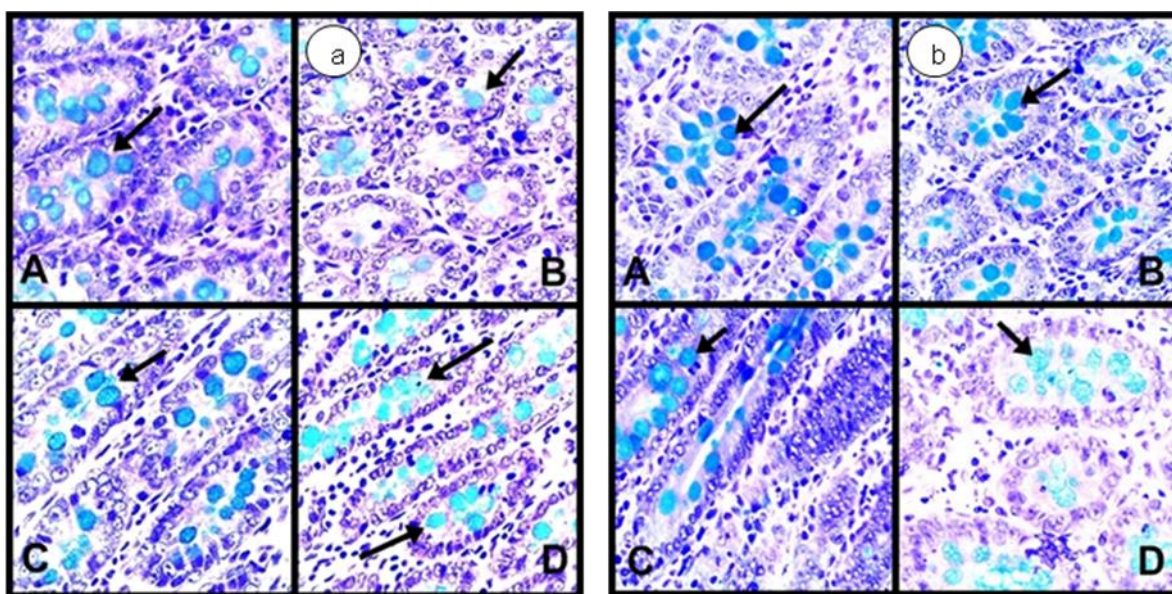


Fonte: A Autora (2016).

3.2 ESTUDO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE MICROESFERAS CONTENDO ÁCIDO GÁLICO EM ÚLCERAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATOS WISTAR

A análise do muco presente no estômago foi realizada através da coloração Alcian Blue em pH 1,0 para detecção de sulfomucinas e pH 2,5 para sulfomucinas e sialomucinas, conforme observado na Figura 2. Segundo Gaudier e colaboradores (2009), o pH 1,0 revela mucinas ácidas com a presença de grupos sulfatos, já as sialomucinas detectam, além dos grupamentos sulfato, a presença do ácido siálico.

Figura 2 - Análise histomorfométrica da área contendo muco em epitélio glandular do estômago de ratos Wistar, apresentando (setas) células com muco (mucinas). **A** – Controle positivo, **B** – Controle negativo, **C** – AG livre, **D** – Micro-AG. Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b)



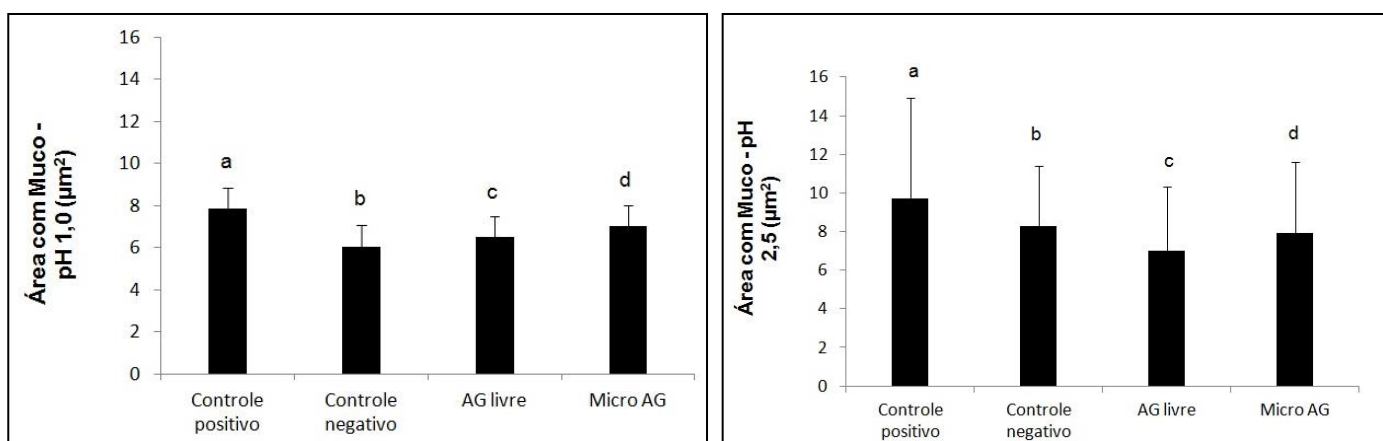
Fonte: A Autora (2016).

De acordo com os dados obtidos sobre a concentração de muco em pH 1,0, os animais do grupo controle negativo apresentaram área com muco de $6,05 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$, mostrando que houve modificação após indução da úlcera e consequentemente, a mucosa gástrica ficou mais sensível a danos epiteliais ou lesões agudas, ou ainda ao pH ácido do estômago (Figura 2). Em relação ao grupo pré-tratado com o ácido gálico livre, os animais permaneceram com uma média da

área de muco semelhante ao grupo no qual não houve indução da úlcera ($6,5 \pm 1,5 \mu\text{m}^2$ e $7,85 \pm 1,9 \mu\text{m}^2$, respectivamente) não apresentando diferença estatística entre eles ($p < 0,05$) (Fig. 2). Este resultado sugere que o ácido gálico promoveu uma preservação das células produtoras de muco, bem como, um aumento na sua produção, estando de acordo com o descrito por Pal e colaboradores (2010).

O grupo tratado com microesferas de ácido gálico exibiu uma área de $7,0 \pm 1,4 \mu\text{m}^2$, sendo estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle positivo, apresentando atividade antiulcerogênica moderada, mas sem potencialização do efeito do ácido gálico, sugerindo que possivelmente não houve tempo necessário para liberação eficaz do composto no estômago. Segundo Torchilin (2005), a administração oral de sistemas de liberação controlada requer que eles sejam estáveis e que os sistemas desloquem-se a partir do intestino para o sangue, e só então comecem a liberar o fármaco. No entanto, no presente estudo, as microesferas contendo o ácido gálico foram utilizadas visando ação local, a partir da erosão da matriz polimérica e liberação do composto, onde não seria necessária a sua absorção sistêmica.

Figura 3 - Análise histomorfométrica da área contendo muco em Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b) em epitélio glandular do estômago de ratos. **a** e **b** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$)



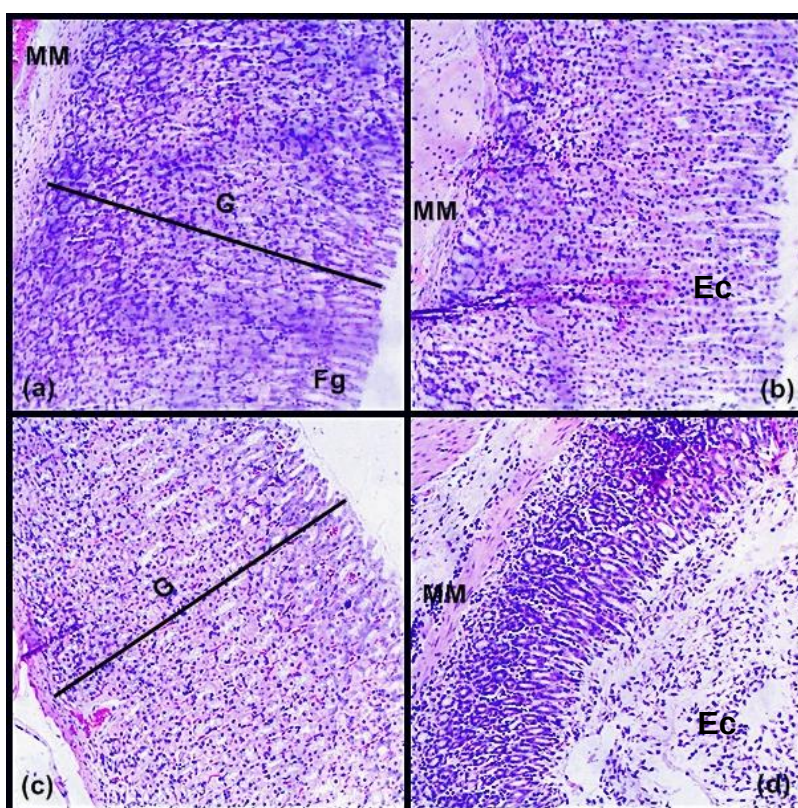
Fonte: A Autora (2016).

Os resultados correspondentes às áreas com presença de mucinas em pH 2,5, mostraram que os animais do grupo controle positivo apresentaram uma área de $9,7 \pm 5,2 \mu\text{m}^2$ (Fig. 3), enquanto que os grupos AG livre, Micro-AG e controle

negativo apresentaram uma área de $7,01 \pm 3,3 \mu\text{m}^2$, $7,9 \pm 3,7 \mu\text{m}^2$ e $8,3 \pm 3,1 \mu\text{m}^2$, respectivamente (Fig. 3). Pode-se verificar que comparado ao encontrado no pH 1,0, o grupo tratado com microesferas mostrou-se mais efetivo neste caso para a produção de muco. Este fato pode ser explicado porque o pH 2,5 seria mais sensível para a determinação destes componentes (PAL et al., 2010). No entanto, ele não é diferente estatisticamente quando comparado com os demais grupos.

Visando examinar possíveis danos epiteliais causados na mucosa gástrica, a espessura do epitélio glandular foi medida (em micrômetros), traçando-se uma linha desde a região muscular da mucosa até a superfície epitelial. A média dessa área epitelial preservada foi analisada através de histomorfometria computadorizada, e os resultados obtidos exibidos na Figura 4.

Figura 4 - Análise histopatológica e histomorfométrica da espessura do epitélio glandular do estômago de ratos Wistar. **(a)** Controle positivo, **(b)** Controle negativo, **(c)** AG livre, **(d)** Micro-AG. **G** - Epitélio glandular, **MM** – Muscular da mucosa, **Ec** - Esfoliação celular, **Fg** - Fosseta gástrica

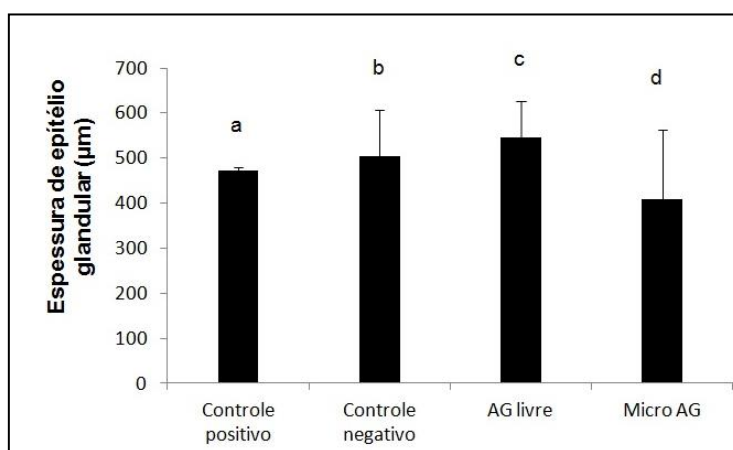


Fonte: A Autora (2016).

O epitélio normal apresentou uma média de espessura ou altura epitelial de $472,8 \pm 6,98 \mu\text{m}$, com manutenção das características normais de um epitélio que se renova periodicamente de 5 a 7 dias, com a presença de fossetas gástricas, e uma considerável área que protege as regiões mais internas da acidez estomacal, como a região muscular da mucosa e submucosa. Não foram visualizadas áreas de esfoliação epitelial, como resultado de lesões agudas.

No grupo Micro-AG foi observada uma espessura epitelial de $409,9 \pm 152,9 \mu\text{m}$, média esta inferior aos demais grupos (Figura 5).

Figura 5 - Análise histomorfométrica da espessura (μm) do epitélio glandular do estômago de ratos Wistar. **a**, **b**, **c** e **d** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$)



Fonte: A Autora (2016).

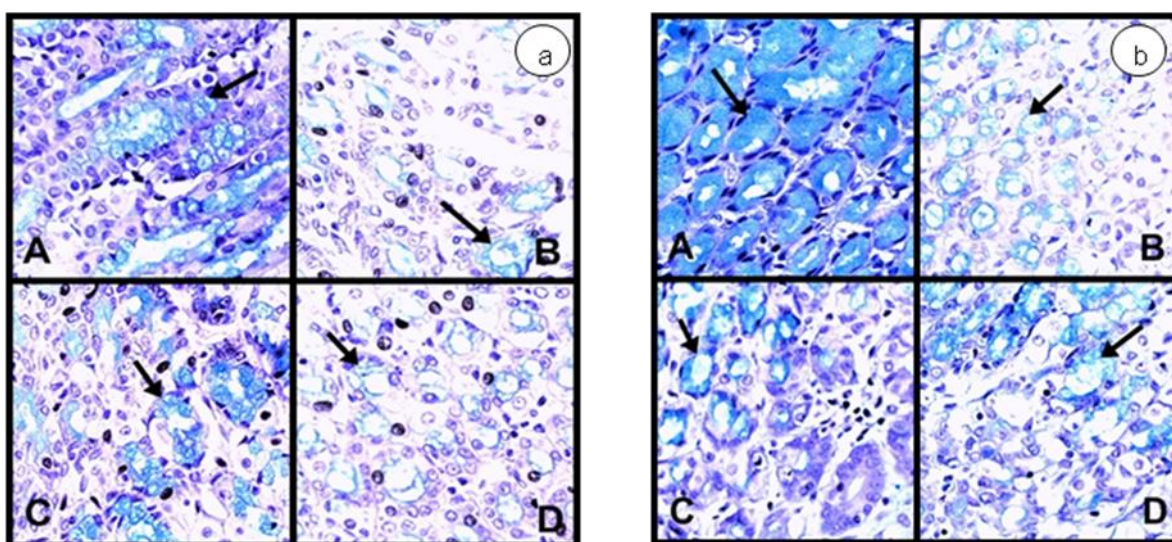
Foi verificada esfoliação intensa do epitélio glandular, que condiz com lesão aguda advinda do uso da indometacina, indicando danos epiteliais. A redução na altura do epitélio glandular observada nos animais deste grupo sugere que o composto não teve sua liberação no estômago a partir das microesferas, corroborando a hipótese inicial de que não houve tempo hábil para o início da liberação controlada.

Os animais do grupo controle negativo apresentaram uma média em espessura de $504,7 \pm 103,4 \mu\text{m}$. Mesmo com a presença de esfoliação epitelial, algumas áreas foram mantidas preservadas. Os animais tratados com o ácido gálico livre apresentaram uma espessura epitelial de $546,5 \pm 79 \mu\text{m}$, sendo esta uma média superior aos demais grupos tratados ($p < 0,05$) o que pode indicar uma ação gastroprotetora, ou seja, protegendo a mucosa estomacal das agressões

ocasionadas pela ação do pH ácido. O achado encontra-se de acordo com o apresentado por Pal e colaboradores (2010), onde foi estudada sua ação também em úlceras induzidas por indometacina.

A fim de analisar a influência do ácido gálico livre e encapsulado quando expostos à junção gastroduodenal, foram analisados, portanto, a presença de muco (área), danos epiteliais e preservação do epitélio. As análises histopatológicas que avaliam a presença de muco no duodeno podem ser observadas na figura 6.

Figura 6 - Análise histomorfométrica da área contendo muco em epitélio glandular do duodeno de ratos Wistar, apresentando (setas) células com muco (mucinas). **A** – Controle positivo, **B** – Controle negativo, **C** – AG livre, **D** – Micro-AG. Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b)



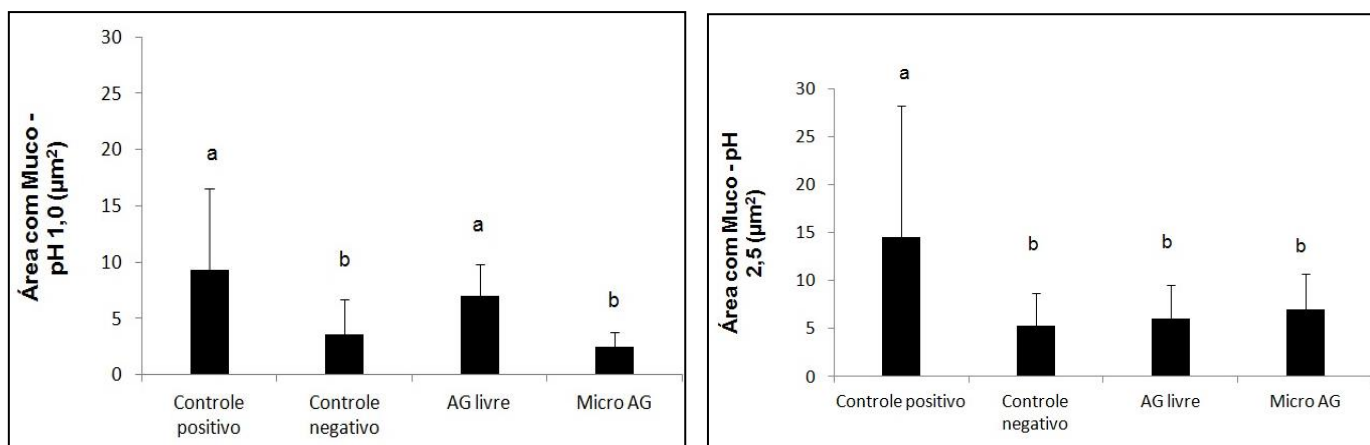
Fonte: A Autora (2016).

As análises quanto à presença de muco (pH 1,0) no duodeno revelaram uma área média de $9,32 \pm 7,2 \mu\text{m}^2$ para o epitélio do grupo controle positivo, revelando a maior média entre os grupos, conforme observado na figura 6 ($p < 0,05$). O grupo controle negativo exibiu uma área de $3,57 \pm 3,10 \mu\text{m}^2$, o que sugere maior vulnerabilidade a possíveis lesões e menor ação protetora para a mucosa (Fig. 6a - B). Os animais tratados com o ácido gálico livre apresentaram área com presença de muco menor que aquela encontrada nos animais sem úlcera, mas maiores que os que não foram tratados. Os resultados sugerem que os animais deste grupo apresentaram uma ação gastroprotetora com uma área de muco correspondente a $7,02 \pm 2,79 \mu\text{m}^2$ (Fig. 6a - C), enquanto o grupo referente às microesferas

apresentou uma área de $2,51 \pm 1,31 \mu\text{m}^2$ (Fig. 6a – D). De acordo com Tanaka e colaboradores (2008), isso estaria relacionado ao fato do pH do intestino ser mais alcalino, retardando a liberação do ácido gálico no duodeno.

Em relação à detecção de muco em pH 2,5, o grupo controle negativo apresentou uma área média de $5,3 \pm 3,42 \mu\text{m}^2$ (Fig. 6b - B) e o grupo controle positivo de $14,5 \pm 13,7 \mu\text{m}^2$ (Fig. 6b - A). O grupo tratado com o ácido gálico livre apresentou uma média equiparada ao do grupo controle negativo, sendo $6,00 \pm 3,52 \mu\text{m}^2$ e o ácido gálico encapsulado de $7,03 \pm 3,67 \mu\text{m}^2$ (Fig. 6b – C e D, respectivamente), o que nos leva a incorrer que o ácido gálico livre pode ter sofrido oxidação neste local. Provavelmente isto ocorreu devido a alcalinização do meio, onde o pH é mantido na faixa de 8,2 a 9,3, ideal para a ação das enzimas pancreáticas (POLEWSKI et al., 2002; KIERSZENBAUM, 2008). Os dados estatísticos revelam que todos os grupos foram diferentes entre si ($p < 0,05$). (Fig.7)

Figura 7 - Análise histomorfométrica da área contendo muco em Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b) em epitélio glandular do duodeno de ratos. **a** e **b** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$)

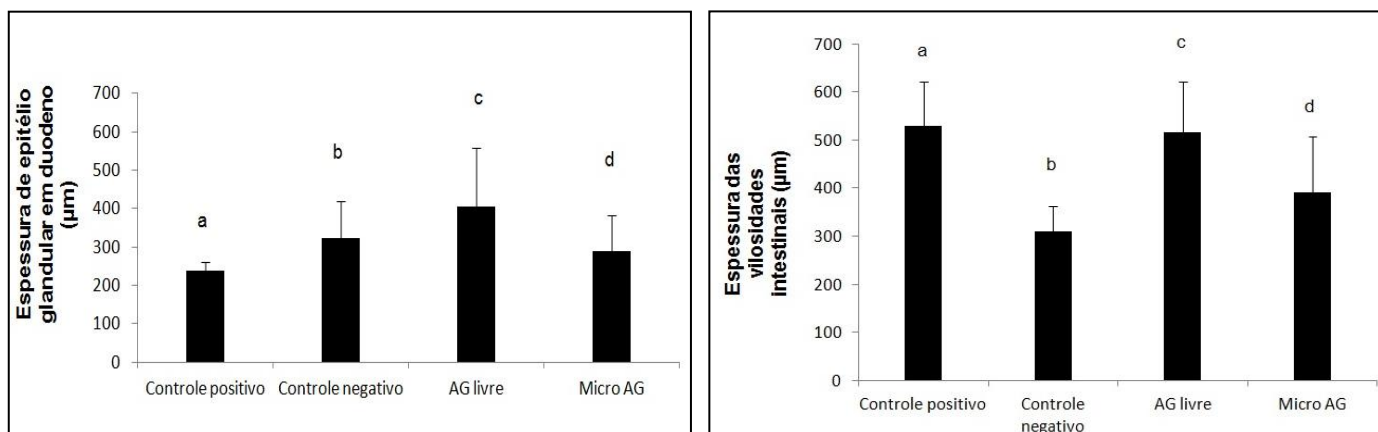


Fonte: A Autora (2016).

Para análise da mucosa intestinal além do epitélio glandular, as vilosidades intestinais foram medidas e analisadas para investigação de danos epiteliais e preservação do epitélio. As vilosidades intestinais são evaginações digitiformes da mucosa, com 0,5 a 1,5 mm de altura, dispostas lado a lado e regularmente ao longo de toda a superfície interna do intestino delgado com uma densidade de 15 a 40 por mm^2 , com função de aumentar a superfície de contato para uma maior absorção de água e nutrientes (KIERSZENBAUM, 2008). O resultado das análises

histopatológicas avaliando a espessura do epitélio glandular e das vilosidades intestinais no duodeno está apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Análise histomorfométrica da espessura (μm) do epitélio glandular (a) e vilosidades intestinais (b) de ratos Wistar. a, b, c e d são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$)



Fonte: A Autora (2016).

O ácido gálico livre promoveu nos animais uma extensão do epitélio glandular com uma média de $404,82 \pm 154,01 \mu\text{m}$, seguido do grupo controle negativo ($323,30 \pm 95,10 \mu\text{m}$) e das Micro-AG ($288,79 \pm 93,91 \mu\text{m}$). O ácido gálico livre apresentou uma ação mais evidente quando comparado com o ácido gálico encapsulado em microesferas, no entanto, ambos exerceram ação antiúlcera.

Os animais sem úlcera (controle positivo) apresentaram uma espessura glandular inferior aos demais grupos, com uma altura epitelial de $236,52 \pm 22,89 \mu\text{m}$, onde pode-se inferir através do resultado que nos grupos previamente tratados um crescimento epitelial foi promovido, com suposta atenuação do processo de renovação celular (PAL et al., 2010). Os dados estatísticos revelaram que as médias foram diferentes entre os grupos ($p < 0,05$) (Fig. 8).

Em relação à análise das vilosidades intestinais, os animais do grupo controle positivo apresentaram uma média de altura das vilosidades intestinais de $530 \pm 92,29 \mu\text{m}$, com características de preservação epitelial e grande densidade de vilosidades intestinais, pequena quantidade de células caliciformes, pequena quantidade de células de Paneth na base das criptas de Lieberkhün e glândulas de Brunner na submucosa.

O grupo tratado com o ácido gálico livre conferiu uma maior proteção das vilosidades intestinais, bem como, de seu epitélio de revestimento, com uma espessura média de $515,87 \pm 106,8 \mu\text{m}$ (Fig.8) com características bem semelhantes a um epitélio normal. As Micro-AG exerceram uma atividade citoprotetora, conferindo vilosidades com espessura média de $391,48 \pm 117,02 \mu\text{m}$, no entanto, inferior ao grupo com o AG livre, mas ainda superior ao controle negativo, o qual apresentou uma área de $310,10 \pm 52,0 \mu\text{m}$.

A partir dos resultados obtidos, os dados corroboram para uma hipótese do efeito protetor do ácido gálico livre, no trato gastrointestinal, pela maior produção de muco, preservação do tecido epitelial glandular e das vilosidades intestinais.

4 CONCLUSÃO

As microesferas de PLGA contendo ácido gálico preparadas através da técnica de emulsão múltipla a/o/a com evaporação de solvente, apresentaram diâmetro entre $12,23 \pm 1,39 \mu\text{m}$ e $15,89 \pm 1,33 \mu\text{m}$ e potencial zeta entre $-7,85 \pm 0,56$ e $-12,68 \pm 0,32 \text{ mV}$. O AG foi encapsulado com sucesso nas microesferas de PLGA, com a maior eficiência de encapsulação apresentada sendo de $58,33 \pm 0,08\%$.

Diante do exposto, pode-se comprovar que a encapsulação de ácido gálico em microesferas torna-se, portanto, uma possível alternativa para superar as limitações relacionadas à sua solubilidade bem como biodisponibilidade, podendo vir a potencializar a ação do composto em questão.

REFERÊNCIAS

- De Rosa, G.; Larobina, D.; La Rotonda, M.I.; Musto, P.; Quaglia, F.; Ungaro, F. How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres: the case of insulin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin system. *J. Control. Release*, 2005;102:71-83.
- Díaz-Gómez, R. et al. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. *LWT - Food Science and Technology*, v. 54, n. 2, p. 331–335, 2013.
- Eyles, A., Davies, N.W., Mitsunaga, T., Mihara, R., Mohammed, C. Role of *Eucalyptus globulus* wound wood extractives: evidence of superoxide dismutase-like activity. *Forest Pathol.* 34, 225–232. 2004.
- Gaudier E.; R. M.; B. M.P.; R. I.; H. C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol. Res.*, v. 58, n.1, p. 111-9, 2009.
- Gichner, T. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. *Folia Microbiol.* 32, 55–62. 1987.
- Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., Jiang, B., Chen, Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1526–1530. 1995.
- Ito, F.; Fujimori, H.; Honnami, H.; Kawakami, H.; Kanamura, K.; Makino, K. Study of types and mixture ratio of organic solvent used to dissolve polymers for preparation of drug-containing PLGA microspheres. *Eur. Polym. J.*, v.45, p.658-667, 2009.
- Kierszenbaum, A. L. *Histologia e Biologia celular: uma introdução à Patologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.433-488, 2008.
- Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3713–3717. 2002.
- Kim, S.-H. et al. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, v. 91, n. 1, p. 123–31, 2006.
- Kroes, B.H., van den Berg, A.J.J., Quarles van Ufford, H.C., van Dijk, H., Labadie, R.P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med.* 58, 499–504. 1992.
- Maestrelli, F.; Zerrouk, N.; Cirri, M.; Mennini, N.; Mura, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008;34:1-11.
- Mirvish, S.S., Cardesa, A., Wallcave, L., Shubik, P. Induction of mouse lung adenomas by amines or ureas plus nitrite and by N-nitroso compounds: effect of

ascorbate, gallic acid, thiocyanate and caffeine. J. Natl. Cancer Inst. 55, 633–666. 1975.

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

Munin, A.; Edwards-Lévy, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds: a Review. Pharmaceutics, v.3, n.4, p.793–829, 2011.

Murugananthan, M., Bhaskar Raju, G., Prabhakar, S. Removal of tannins and polyhydroxy phenols by electro-chemical techniques. J. Chem. Technol. Biotechnol. 80, 1188–1197. 2005.

Pal, C.; Bindu, S.; Dey, S.; Alam, A.; Goyal, M.; Iqbal, M.S.; Maity, P.; Adhikari, S.S.; Bandyopadhyay, U. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. Free Radical Biology & Medicine, v.49, p. 258–267, 2010.

Park, K.; Kwon, I.C.; Park, K. Oral protein delivery: current status and future prospect. React. Funct. Polym., v. 71, p. 280–287, 2011.

Polewski, K.; Kniat, S.; Slavinska, D. Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment : spectroscopic studies. Current Topics in Biophysics, v. 26, n. 2, p. 217–227, 2002.

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

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

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

Silva, C.V.N.S.; Barbosa, J.A.P.; Ferraz, M.S.; Silva, N.H.; Honda, N.K.; Rabello, M.M; Hernandez, M.Z.; Bezerra, B.P.; Cavalcanti, I.M.F; Ayala, A.P.; Santos, N.P.S.; Santos-Magalhães, N.S. Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP--CD inclusion complex encapsulated in microspheres. Int. J. Biol. Macromol., n. 92, p. 494-503, 2016.

Singh, J., Rai, G.K., Upadhyay, A.K., Kumar, R., Singh, K.P. Antioxidant phytochemicals in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Ind. J. Agric. Sci. 74, 3–5. 2004.

Torchilin, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nature reviews. Drug discovery, v. 4, n. 2, p. 145–60, 2005.

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

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

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

CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido ao *International Journal of Biological Macromolecules*

DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS CONTENDO COMPLEXO DE INCLUSÃO ÁCIDO GÁLICO:CICLODEXTRINAS

Camilla Vila Nova Soares Silva^{1,2,3}, Laís de Macêdo Ferreira Santos², Milena Sales Ferraz², Noemia Pereira da Silva Santos^{2,3}, Nereide Stela Santos Magalhães^{1,2*}.

¹*Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde/UFPE;*

²*Laboratório de Immunopatologia Keizo-Asami (LIKA)/UFPE;*

³*Laboratório de Nanotecnologia e Cultura de Células (NanoBioCel)/Centro Acadêmico de Vitória/UFPE,*

RESUMO

O ácido gálico (AG), um polifenol, é conhecido por apresentar variadas funções biológicas, tais como antioxidante, neuroprotetora, antimicrobiana, antitumoral e gastroprotetora. No entanto, sofre oxidação facilmente, perdendo suas propriedades. Em decorrência disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver complexos de inclusão contendo o ácido gálico e encapsulá-los em lipossomas, visando manter sua estabilidade e melhorar sua biodisponibilidade para investigação de atividades *in vivo*. Os complexos de inclusão ácido gálico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (AG:HP β CD) foram obtidos através da técnica de *freeze-drying*, tendo aparência macroscópica de um pó branco, com conteúdo de ácido gálico encontrado de $90,34 \pm 0,06$ %. Foram caracterizados através das técnicas de IV, RMN, DRX, DSC e MEV. O complexo de inclusão AG:HP β CD apresentou modificações em seu espectro quando em comparação com os espectros do AG e da HP β CD. Uma mudança no AG, passando de forma cristalina a amorfa foi observada na difração de raios-X. Os resultados sugerem a formação de um complexo de inclusão. Lipossomas convencionais contendo complexo de inclusão AG:HP β CD foram obtidos de acordo com o método de hidratação do filme lipídico e caracterizados por testes físico-químicos e de estabilidade. Apresentaram aspecto leitoso, homogêneo e com reflexo azulado (efeito tyndall) típico de vesículas unilamelares pequenas, com teor e uma eficiência de encapsulação de $97,20 \pm 1,54$ % e $91,66 \pm 0,16$ %, respectivamente. O tamanho médio de partícula foi de $95,9 \pm 0,4$ nm, com índice de polidispersão de $0,39 \pm 0,02$, pH $6,7 \pm 0,05$ e potencial zeta de $+41,5 \pm 1,0$. Na forma de líofilos, permaneceram estáveis por 60 dias. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que os sistemas contendo ácido gálico desenvolvidos caracterizam-se como promissores para utilização em testes futuros de atividade biológica.

Palavras-chave: Ácido gálico. Complexos de inclusão. Lipossomas.

ABSTRACT

Gallic acid (GA), a polyphenol, is known to have various biological functions, such as antioxidant, neuroprotective, antimicrobial, antitumor and gastroprotective. However, it undergoes oxidation easily losing their properties. As a result, the objective of this study was to develop inclusion complexes containing gallic acid and encapsulating them in liposomes to maintain its stability and improve its bioavailability for research in vivo activities. The inclusion complexes of gallic acid:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (GA:HP β CD) were obtained by freeze-drying technique, with macroscopic appearance of a white powder, gallic acid content found $90.34 \pm 0,06$ %. They were characterized by techniques of IR, NMR, XRD, DSC and ESEM. The inclusion complex GA:HP β CD introduced modifications in its spectrum when compared to the spectrum of GA and HP β CD. A change in the GA, from crystalline to amorphous was observed in X-ray diffraction. The results suggest the formation of an inclusion complex. Conventional liposomes containing GA:HP β CD inclusion complex were obtained by hydration of the lipid film method and characterized by physicochemical tests and stability. Showed milky, homogeneous and with a bluish reflection (Tyndall effect) typical of small unilamellar vesicles with a content and encapsulation efficiency of 97.20 ± 1.54 % and 91.66 ± 0.16 %, respectively. The average particle size was 95.9 ± 0.4 nm with polydispersity index of 0.39 ± 0.02 , pH 6.7 ± 0.05 and zeta potential of $+41.5 \pm 1.0$. Lyophilized liposomes remained stable for 60 days. Based on these results, we can conclude that the systems containing gallic acid developed can be characterized as promising for use in future tests of biological activity.

Keywords: Gallic acid. Inclusion complexes. Liposomes.

1 INTRODUÇÃO

O ácido gálico (AG), uma substância fenólica derivada de plantas, é conhecido por apresentar uma grande variedade de funções biológicas, dentre as quais: antioxidante (FIUZA et al., 2004), ansiolítica (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013), neuroprotetora (MANSOURI et al., 2013), antidiabética (LIU et al., 2013), antimicrobiana (DÍAZ-GÓMEZ et al., 2013) e antitumoral (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

Recentemente, descreveu-se que o AG foi capaz de inibir a liberação de histamina a partir de mastócitos e impediu a produção de citocinas pró-inflamatórias, que possuem importante papel no desenvolvimento da úlcera gastroduodenal. O composto foi capaz de restaurar lesões da mucosa gástrica induzidas por indometacina e etanol através da modulação da resposta inflamatória, atribuindo-se esta capacidade às suas propriedades antioxidantes, proteínas imunomoduladoras e inibição de apoptose mitocondrial (PAL et al., 2010; ABDELWAHAB, 2013).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que possuem uma superfície hidrofílica e uma cavidade central hidrofóbica, a qual favorece a formação de complexos de inclusão com fármacos de baixa polaridade (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; DUCHÊNE et al., 1999). A ciclodextrina com maior aplicação no campo farmacêutico é a β -ciclodextrina, por apresentar eficiência de complexação satisfatória e baixo custo (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007). No entanto, a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), um derivado quimicamente modificado, vem sendo bastante utilizada devido ao aumento da capacidade de complexação (DE ARAÚJO et al., 2008).

Os complexos de inclusão de fármacos com ciclodextrinas podem proporcionar o aumento da solubilidade em água, além de melhorar a estabilidade, aumentar a biodisponibilidade e diminuir a toxicidade dos compostos associados (SCHWINGEL et al., 2008; DEL VALLE, 2004). Com o intuito de melhorar a eficiência de encapsulação e modular a cinética de liberação dos dispositivos terapêuticos, a incorporação de complexos de inclusão de fármacos com ciclodextrinas em sistemas de liberação controlada pode ser realizada (DUCHÊNE et al., 1999).

Nas últimas décadas, a nanotecnologia farmacêutica contribuiu fortemente para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos para variadas aplicações terapêuticas (TORCHILIN, 2012). Esta área das ciências farmacêuticas está envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SAKATA et al., 2007). O emprego de várias técnicas de encapsulação, através de métodos físicos (secagem por pulverização, processo utilizando fluidos supercríticos), físico-químicos (lipossomas), métodos químicos (polimerização interfacial, policondensação interfacial), aplicados a extratos e/ou compostos polifenólicos de plantas confirmaram que a encapsulação é um meio atraente para potencializar suas atividades (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo investigar a possibilidade de formação de complexo de inclusão entre o AG e a HP β CD, caracterizar físico-quimicamente os complexos obtidos e incorporá-los em lipossomas convencionais, visando avaliar futuramente sua aplicação biológica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E AMOSTRAS

O ácido gálico (AG), colesterol (CH), estearilamina (SA), trealose e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). Fosfatidilcolina de soja (PC) foi obtida da Lipoid, GmbH (Ludwigshafen, Germany). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada.

2.2 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES DO ÁCIDO GÁLICO EM HPBCD

O estudo de solubilidade de fases do ácido gálico em soluções aquosas de HP β CD foi realizado de acordo com o descrito por Higuchi e Connors (1965). Uma quantidade em excesso de ácido gálico (3 mg) foi adicionada a tubos contendo 1 mL

de água ou soluções aquosas de HP β CD em diferentes concentrações (0 a 50 mM), os quais foram deixados sob agitação vigorosa a 25 °C, durante 48 horas. Após este período, uma alíquota da mistura foi retirada e centrifugada, e o sobrenadante analisado para determinação do conteúdo de ácido gálico. Assumindo a formação de um complexo de razão estequiométrica 1:1, a constante de solubilidade ($K_{1:1}$) foi calculada através da relação linear entre a concentração molar do ácido gálico na solução versus a concentração molar da HP β CD, de acordo com a equação $K_{1:1} = \text{slope}/[S_0(1-\text{slope})]$, onde S_0 é a solubilidade do ácido gálico na ausência da HP β CD.

2.3 PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO CICLODEXTRINA:ÁCIDO GÁLICO

Os complexos de inclusão ácido gálico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (AG:HP β CD) foram obtidos através da técnica de *freeze-drying*. Para a preparação de AG:HP β CD, 163 mg de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina foram solubilizados em 10 mL de água ultrapura, com posterior adição de 20 mg de ácido gálico (razão molar 1:1). Os complexos fármaco:ciclodextrina em solução permaneceram sob agitação magnética a temperatura ambiente até atingir condições de equilíbrio (48 h) e foram congelados a - 80 °C para o processo de liofilização. Os complexos liofilizados foram acondicionados em dessecador à temperatura ambiente até utilização.

2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Os complexos de inclusão obtidos foram caracterizados através das técnicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN), difração de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro IR-TF Galaxy 3000 Mattson, na faixa de 4000-400 cm^{-1} através do método do disco de KBr (brometo de potássio). Neste procedimento, os pellets foram preparados pela prensa de cada amostra (ácido gálico, ciclodextrina, complexo de inclusão e mistura física) em um disco de KBr. A ressonância magnética nuclear de prótons (RMN) foi realizada utilizando-se o aparelho Bruker DPX-300 Avance (300 MHz), com as amostras diluídas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) e água deuterada (H_2O -

d6). Os padrões de difração de raios-X foram realizados em um aparelho Rigaku Geiger-Flex 2073, utilizando-se tubo de cobre com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.50405 \text{ nm}$). As medições de DSC foram realizadas de 25°C a 500°C a $10^\circ\text{C min}^{-1}$, sob fluxo de nitrogênio utilizando um recipiente de alumínio aberto, no qual foram colocados cerca de 5 mg da amostra. A morfologia dos complexos de inclusão foi examinada através de um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5600LV). As amostras foram preparadas através da montagem de cerca de 0,5 mg de pó sobre a superfície do stub para microscopia. As condições de trabalho para análise de MEV foram uma tensão de aceleração de 15 kV e magnificação de $1000\times$.

O conteúdo de ácido gálico nos complexos de inclusão foi quantificado através da dissolução de quantidades conhecidas em uma solução de metanol e acetonitrila (1:1), a qual foi submetida à sonicação por 5 min, com o restante do volume completado para 5 mL de acetonitrila. A suspensão foi então centrifugada a 10.000 rpm durante 15 min, e o ácido gálico solubilizado no sobrenadante foi quantificado através de CLAE. Uma curva analítica do ácido gálico foi preparada em acetonitrila, nas concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$, conforme método desenvolvido e validado previamente.

2.5 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Lipossomas convencionais contendo complexo de inclusão AG:HP β CD foram obtidos de acordo com o método de hidratação do filme lipídico (LIRA et al, 2009). Os lipídios, fosfatidilcolina de soja, o colesterol e a estearilamina (7:2:1, 42mM) foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1, v/v) sob agitação magnética, e em seguida os solventes foram extraídos por rota-evaporação. O filme formado foi então hidratado com tampão fosfato pH 6,8 contendo complexo de inclusão previamente solubilizado para formação das vesículas lipídicas. Com o objetivo de obter lipossomas na escala nanométrica, foi utilizada uma sonda Vibra Cell (BRANSON, USA) em 200 W e 50 Hz por 300 s, para quebrar as vesículas até o tamanho desejado. Por fim, os lipossomas foram congelados a -80°C e liofilizados (EZ-DRY, FTS System, USA), com utilização da trealose como crioprotetor.

O diâmetro médio de partículas e o índice de polidispersão (PI), foram determinados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PSC)

utilizando analisador de partícula a laser Delsa™ Nano-S a 25 °C com ângulo de detecção de 90° (Beckman Coulter, UK). As amostras de lipossomas (100 µL) foram diluídas adequadamente em água ultrapura (300µL) e em seguida realizada a análise.

A carga superficial (potencial zeta) dos lipossomas foi determinada através da mobilidade eletroforética pelo equipamento Zetatrak Legacy (Nanotrak®, USA). As medidas foram realizadas a 25 °C com dispersões de 50 µL da formulação lipossomas em 950 µL de água ultrapurificada. O pH dos lipossomas foi aferido utilizando um medidor de pH digital (Bioblock Científico 99.622, Prolabo, Paris, França) a temperatura ambiente

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos apresentados pela média $\pm$ desvio padrão (DP).

As formulações lipossomais contendo complexo de inclusão AG:HP β CD foram submetidas a testes de estabilidade acelerada e após tempos pré-determinados (0, 7, 15, 30, 60 dias) (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000). Nestes testes, características físico-químicas dos lipossomas como aspecto macroscópico, tamanho de partícula, índice de polidispersão e variação de pH foram avaliadas. Para o teste de estabilidade acelerada, as formulações lipossomais foram submetidas à centrifugação a 6.000 rpm por 1 h a 4 °C (KN-70 Centrifuge, Kubota, Japão) e ao estresse mecânico a 180 vibrações por min a 37 °C por 48 h (Polytest® 20 Bioblock Scientific).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES DO ÁCIDO GÁLICO EM HPBCD

A adição de 50 mM de HP β CD resultou em uma solubilidade de 4,8 mM para o AG, o que corresponde a um aumento de 20 vezes na solubilidade do fármaco quando em água. Vlachou e Papaioannou (2003) em estudo de solubilidade de fases com a HP β CD obtiveram um aumento de 11 vezes na solubilidade aparente da furosemida. Este aumento de solubilidade pode também ser comparado com o encontrado por Kristmundsdóttir et al. (2005) quando utilizaram a HP β CD como agente solubilizante para a atranorina e o ácido fumarprotocetrárico.

A estequiometria do complexo de inclusão AG:HP β CD foi determinada em função do tipo de curva obtida no diagrama de solubilidade de fases do complexo. Uma curva do tipo A_L foi obtida, isto é, houve um aumento linear da solubilidade da substância ativa (AG) com o aumento crescente da concentração de HP β CD, indicando a formação de complexos solúveis (HIGUCHI; CONNORS, 1965). O fato de que a solubilidade do ácido gálico foi aumentada pela presença de HP β CD é um sinal de que interações moleculares podem ter ocorrido entre eles para a formação de espécies químicas distintas (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Foram obtidos complexos de inclusão AG:HP β CD liofilizados, com aparência macroscópica de um fino pó de coloração branca. O conteúdo de ácido gálico encontrado nos complexos de inclusão foi de $90,34 \pm 0,06$ % para o AG:HP β CD.

O espectro de IV do ácido gálico mostrou um estiramento OH em 3500-3300 cm^{-1} , estiramento CH em 3100-3052 cm^{-1} , vibrações do anel aromático em 1623, 1540, 1469 e 1447 cm^{-1} , vibrações de estiramento e flexão do grupo fenólico C-OH em 1400 a 1000 cm^{-1} , estiramento e encurtamento em COOH a 1100-1000 cm^{-1} e uma vibração de estiramento do grupo carbonila em 1701 cm^{-1} , estando de acordo com o verificado por Hirun e colaboradores (2012). Para a HP β CD, verificou-se bandas de absorção para o estiramento de OH em cerca de 3416 cm^{-1} , bem como para o estiramento de C-H em 2930 cm^{-1} , e ainda bandas correspondentes ao estiramento dos grupos C-H e C-O em 1152, 1085 e 1038 cm^{-1} , correspondendo ao descrito por Yuan e colaboradores (2008).

Com relação à mistura física do AG e da HP β CD, os picos referentes a cada um dos compostos permaneceram iguais, indicando que não houve a formação de complexo de inclusão através desta mistura. No entanto, no espectro de IV do complexo de inclusão AG:HP β CD observou-se um deslocamento na vibração do grupo carbonila, passando de 1703 para 1690 cm^{-1} , e o aparecimento de dois novos picos em 3239 e 1122 cm^{-1} , sucedidos pelo desaparecimento do pico característico do AG em 1540 cm^{-1} , sugerindo uma interação do ácido gálico com a ciclodextrina (OLGA et al., 2015).

A formação do complexo de inclusão implica a liberação de moléculas de água no interior da cavidade das ciclodextrinas. Isso significa que novas interações

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

Os experimentos de ressonância magnética nuclear de prótons foram realizados para avaliar as mudanças nos sinais químicos ($\Delta\delta$) dos compostos puros (AG e HP β CD) e nos complexos de inclusão obtidos (AG:HP β CD). Para o ácido gálico, foi observado um singlete em 7.022 ppm, estando de acordo com o previamente reportado por Eldahshan (2011). Quando da observação dos espectros dos complexos de inclusão, um deslocamento significativo para o sinal do AG foi verificado em ambos, seguido pelo deslocamento dos prótons das ciclodextrinas. Este comportamento pode sugerir a formação de um complexo 1:1 através da inclusão do fármaco dentro da cavidade da ciclodextrinas estudada (NASONGKLA et al., 2003).

Os padrões de difração de raios-X evidenciaram a formação de espécies supramoleculares entre o ácido gálico e a ciclodextrina estudada. O padrão de difração de raios-X do ácido gálico revelou picos pontiagudos, que são característicos de compostos com caráter cristalino, enquanto picos largos foram gerados para a HP β CD, comprovando o estado amorfo das mesmas. Já a mistura física exibiu picos característicos do ácido gálico e da ciclodextrina, sendo importante observar que estes picos resultaram da combinação destes componentes analisados separadamente, não havendo a formação de complexo através da mistura física. Por outro lado, os padrões de difração de raios-X dos complexos de inclusão AG:HP β CD foram caracterizados apenas por picos de difração largos, onde não foi possível distinguir os picos característicos do AG. Estes resultados sugerem que o ácido gálico não é mais presente como um material cristalino, e sim, que o complexo sólido existe no estado amorfo, tendo este fato já sido observado em outros compostos (FIGUEIRAS et al., 2007). Revela-se assim a

produção de um estado amorfo do fármaco no produto liofilizado, como uma consequência das interações do fármaco com a ciclodextrina no estado sólido e da perda de cristalinidade, sendo um indicativo de possível formação de um complexo de inclusão (PRALHAD; RAJENDRAKUMAR, 2004; SPAMER et al., 2002).

O termograma do ácido gálico revelou um pico endotérmico com início a temperatura de 258 °C, o que pode ser atribuído à fusão do ácido gálico (OLGA et al., 2015). O perfil de DSC da ciclodextrina pura exibiu picos endotérmicos largos variando de 60 a 140 °C, enquanto que o termograma da mistura física apresentou as endotermias individuais para o fármaco e a ciclodextrina. Na análise do perfil do complexo de inclusão AG:HP β CD, observou-se o desaparecimento do pico de endotermia do AG, o que pode ser um indicativo de formação do complexo.

A morfologia da superfície dos pós derivados do AG, HP β CD, mistura física e complexo de inclusão AG:HP β CD foi avaliada através de MEV. Tal como ilustrado na Figura 1, o AG existe em forma estrutural de cristal (Fig. 1a), ao passo que a HP β CD foi observada como esferas (Fig. 1b). A mistura física de AG e HP β CD mostra cristais característicos de AG, que estão misturados com as partículas de ciclodextrinas ou aderidas à sua superfície (Fig. 1c). Em contraste, o complexo de inclusão (Fig. 1d) apresentou-se sob a forma de partículas irregulares, em que a morfologia original de ambos os componentes desapareceu e agregados de peças amorfas de tamanho irregular estavam presentes.

Figura 1 - Micrografia eletrônica de varredura do ácido gálico (a), HP β CD (b), mistura física (c) e complexo de inclusão AG:HP β CD (d). Magnificação de 1000x



Fonte: A Autora (2016).

A comparação destas imagens revelou que o complexo de inclusão é estruturalmente distinto dos componentes isolados e da mistura física de AG e ciclodextrinas, o que poderia sugerir assim a formação deste sistema (SINGH et al., 2010).

3.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Lipossomas contendo complexo de inclusão AG:HP β CD foram obtidos através do método de hidratação do filme lipídico, seguido de sonicação. A concentração de 2mg/mL de ácido gálico foi utilizada uma vez que não apresentou precipitação do AG:HP β CD. Após preparadas, as formulações escolhidas apresentaram um aspecto leitoso, homogêneo e com reflexo azulado (efeito tyndall) típico de vesículas unilamelares pequenas, com teor e uma eficiência de encapsulação de $97,20 \pm 1,54 \%$ e $91,66 \pm 0,16 \%$, respectivamente.

O tamanho médio, o índice de polidispersão, pH e o potencial zeta podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão, pH e potencial zeta dos lipossomas obtidos

Formulações	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão	pH	Potencial Zeta (mV)
LB*	92,5 ± 1,6	0,28 ± 0,09	6,8 ± 0,24	+37,5 ± 1,62
Lipo-AG:HPβCD*	95,9 ± 0,4	0,39 ± 0,02	6,7 ± 0,05	+41,5 ± 1,0

* LB = Lipossomas sem fármaco. Lipo-AG:HPβCD = Lipossomas contendo complexo de inclusão AG:HPβCD.

Fonte: A Autora (2016).

O tamanho médio das vesículas contendo AG:HPβCD (Lipo-AG:HPβCD) e lipossomas brancos (LB) não sendo observada diferença significativa entre elas. O índice de polidispersão apresentado indica que as formulações são monodispersas, uma vez que valores abaixo de 1 indicam preparações homogêneas. O valor positivo de carga de superfície dos lipossomas era esperado e é explicado pela constituição lipídica das vesículas, as quais contêm o lipídeo estearilamina de carga positiva. Segundo Tedesco e colaboradores (2007) quanto mais distante de zero, o valor indica estabilidade física do sistema, uma vez que promove repulsão eletrostática das vesículas. Geralmente, é almejado que o potencial zeta em suspensão seja em torno ou maior que 30 mV (positivo ou negativo), possibilitando que o sistema permaneça estável.

As suspensões lipossomais Lipo-AG:HPβCD e LB foram submetidas aos testes de estabilidade acelerada, através de estresse mecânico e de centrifugação e em seguida o tamanho de partícula, o índice de polidispersão e o pH foram avaliados conforme pode ser verificado na Tabela 2.

Tabela 2 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH de lipossomas com AG:HP β CD, antes e após os testes de estresse mecânico e centrifugação

Parâmetros	Lipo-Branco	Lipo- AG:HP β CD
Características iniciais	Ø: 92,5 ± 1,6 nm	Ø: 95,9 ± 0,4 nm
	PDI: 0,28 ± 0,09	PDI: 0,39 ± 0,02
	pH: 6,8 ± 0,24	pH: 6,7 ± 0,05
	AM: Estável	AM: Estável
Centrifugação (6000 r.p.m., por 1h a 4°C)	Ø: 94,55 ± 9,83 nm	Ø: 99,1 ± 4,8 nm
	PDI: 0,278 ± 0,01	PDI: 0,31 ± 0,01
	pH: 6,83 ± 1,48	pH: 6,7 ± 0,03
	AM: Estável	AM: Estável
Estresse mecânico (180 vibrações/min - 48h - 37°C)	Ø: 93,73 ± 46,59 nm	Ø: 97,1 ± 1,5 nm
	PDI: 0,351 ± 0,01	PDI: 0,30 ± 0,02
	pH: 6,82 ± 0,47	pH: 6,68 ± 0,05
	AM: Estável	AM: Estável

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

Fonte: A Autora (2016).

Observou-se que as formulações Lipo-AG:HP β CD e LB mantiveram-se estáveis após o teste de simulação de transporte por agitação mecânica. Em relação ao teste de centrifugação, as formulações de Lipo-AG:HP β CD apresentaram um aumento no tamanho de partícula, com um valor de 99,1 ± 4,8 nm, aumento esperado devido à ação da força da gravidade, não significando instabilidade nas formulações, uma vez que não foi observado presença de precipitação do ácido gálico, presença de grumos ou separação de fases. Todas as formulações foram analisadas macroscopicamente observando-se características como homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, e separação de fases. Após análise, não foi observada nenhuma alteração na aparência visual permanecendo como uma suspensão branca leitosa com reflexo azulado.

Para os testes de estabilidade foram verificados o tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH das formulações liofilizadas após 0, 7, 15, 30 e 60 dias (Tabela 3).

Tabela 3 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH de lipossomas com AG:HP β CD em tempos pré-determinados

Intervalo (Dias)	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão	pH
0	95,9 $\pm$ 0,4	0,39 $\pm$ 0,02	6,7 $\pm$ 0,05
7	96,7 $\pm$ 2,1	0,27 $\pm$ 0,03	6,67 $\pm$ 0,08
15	98,9 $\pm$ 4,5	0,30 $\pm$ 0,01	6,64 $\pm$ 0,05
30	99,1 $\pm$ 2,6	0,26 $\pm$ 0,02	6,62 $\pm$ 0,05
60	100,8 $\pm$ 3,2	0,36 $\pm$ 0,15	6,59 $\pm$ 0,03

Fonte: A Autora (2016).

A avaliação foi realizada através da ressuspensão dos líofilos de Lipo-AG:HP β CD em quantidade suficiente de tampão fosfato pH 6,8, para atingir as condições iniciais. Em todo o período, não foi verificada nenhuma alteração visual nas formulações. O índice de polidispersão não exibiu alteração significativa, apresentando um valor médio de 0,30, indicando que as formulações se mantiveram monodispersas. Já em relação ao pH houve uma variação de 6,7 $\pm$ 0,05 a 6,59 $\pm$ 0,03, não significando instabilidade para as formulações, uma vez que a maior preocupação está relacionada ao aumento exacerbado da acidez que pode indicar degradação dos componentes dos lipídeos presentes na bicamada lipídica (TEDESCO, 2007). Em relação ao tamanho houve um aumento gradativo com o tempo, no entanto, permanecendo dentro da faixa nanométrica, mas não influencia em sua estabilidade.

4 CONCLUSÃO

No presente estudo, foram obtidos complexos de inclusão ácido gálico:2:hidroxipropil- β -ciclodextrina através da técnica de liofilização, o que pode ser comprovado através dos resultados das análises de difração de raios-X, IV, RMN

^1H , MEV e termogravimetria. Foram obtidos lipossomas contendo complexos de inclusão AG:HP β CD estáveis, com teor e uma eficiência de encapsulação de $97,20 \pm 1,54 \%$ e $91,66 \pm 0,16 \%$, respectivamente, sendo sistemas promissores para utilização em testes futuros de base terapêutica. Como perspectivas futuras, verifica-se a necessidade da realização de testes de cinética de liberação *in vitro*, com o intuito de compreender o mecanismo de liberação do ácido gálico a partir dos lipossomas desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

- Abdelwahab, S.I. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: Involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein International Immunopharmacology, v. 16, 296–305, 2013.
- De Araújo, M.V.G.; Vieira, E.K.B.; Lázaro, G.S.; Conegero, L.S.; Almeida, L.E.; Barreto, L.S.; Da Costa Jr., N.B.; Gimenez, I.F. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. Bioorgan. Med. Chem., 2008;16:5788-5794.
- Del Valle, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. Proceed. Biochem., 2004;39:1033-1046.
- Díaz-Gómez, R. et al. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. LWT - Food Science and Technology, v. 54, n. 2, p. 331–335, 2013.
- Duchêne, D.; Wouessidjewe, D.; Ponchel, G. Cyclodextrins and carrier systems. J. Control. Release, 1999;62:263-268.
- Eldahshan, O.A. 2011. Isolation and Structure Elucidation of Phenolic Compounds of Carob Leaves Grown in Egypt. *Current Research Journal of Biological Sciences* 3(1): 52-55.
- Figueiras, A.; Carvalho, R.A.; Ribeiro, L.; Torres-Labandeira, J.J.; Veiga, F.J.B. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin. Eur. J. Pharm. and Biopharm., 2007;67:531-539.
- Fiuza, S. M. et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. Bioorganic & medicinal chemistry, v. 12, n. 13, p. 3581–9, 2004.
- García-Zubiri, I.X.; González-Gaitano, G.; Sánchez, M.; Isasi, J.R. FTIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with β -cyclodextrin. Vibrat.Spectrosc., 33:205-213. 2003.
- Hirun, N., Dokmaisrijan, S., & Tantishaiyakul, V. Experimental FTIR and theoretical studies of gallic acid–acetonitrile clusters. *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 86: 93-100. 2012.
- Lira, M.C.B.; Ferraz, M.S.; Silva, D.G.V.C.; Cortes, M.E.; Teixeira, K.I.; Caetano, N.P.; Sinisterra, R.D.; Ponchel, G.; Santos-Magalhães, N.S. Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., v.64, p.215-224, 2009.
- Loftsson, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. Int. J. Pharm., 2007;329:1-11.

Mansouri, M. T. et al. Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 111, p. 90–6, 2013.

Munin, A.; Edwards-Lévy, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds: a Review. *Pharmaceutics*, v.3, n.4, p.793–829, 2011.

Nagpal, K.; Singh, S. K.; Mishra, D. N. Optimization of brain targeted gallic acid nanoparticles for improved antianxiety-like activity. *Int. J. Biol. Macromol*, v. 57, n. 0436, p. 83–91, 2013.

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

Olga, G., Styliani, C., Ioannis, R.G. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp- β -cyclodextrin. *Food Chemistry* 185: 33-40. 2015.

Pal, C.; Bindu, S.; Dey, S.; Alam, A; Goyal, M.; Iqbal, M.S.; Maity, P.; Adhikari, S.S.; Bandyopadhyay, U. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, v.49, p. 258–267, 2010.

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

Sakata, S.; Uchida, K.; Kaetsu, I.; Kita, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. *Radiat. Phys. Chem.* v.76, p.733-737, 2007.

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

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

Singh, R., Bharti, N., Madan, J., Hiremath, S. N. 2010. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2(3): 171-183.

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

Tedesco, A.C.; Simioni, A.R.; Primo, F.L. Introdução a tecnologia. In: MORALES, M.M. Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. Rio de Janeiro, Ed.Atheneu, p. 237-264, 2007.

Torchilin, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 302–315, 2012.

Verma, S.; Singh, A.; Mishra, A. Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 35, n. 3, p. 473–85, 2013.

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

Yuan, C., Jin, Z., Xu, X., Zhuang, H., & Shen, W. Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl-b-cyclodextrin. *Food Chemistry* 109: 264-268. 2008.

CAPÍTULO III

Artigo publicado no periódico *International Journal of Biological Macromolecules*

Fator de Impacto: 3,138

Qualis Capes: B1

International Journal of Biological Macromolecules 92 (2016) 494–503



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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



Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP-β-CD inclusion complex encapsulated in microspheres

Camilla V.N.S. Silva^{a,b}, Jéssica A.P. Barbosa^b, Milena S. Ferraz^b, Nicácio H. Silva^c,
Neli K. Honda^d, Marcelo M. Rabello^e, Marcelo Z. Hernandez^e, Beatriz P. Bezerra^f,
Isabella M.F. Cavalcanti^{a,b}, Alejandro P. Ayala^f, Noemia P.S. Santos^{a,b},
Nereide S. Santos-Magalhães^{b,*}

^a Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brazil
^b Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), UFPE, Recife, PE, Brazil
^c Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife, PE, Brazil
^d Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cuiabá, MS, Brazil
^e Laboratório de Química Teórica Medicinal, UFPE, Recife, PE, Brazil
^f Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 2 April 2016
 Received in revised form 3 June 2016
 Accepted 22 June 2016
 Available online 20 July 2016

Keywords:
 Diffractaic acid
 Cyclodextrin
 Microspheres

ABSTRACT

In this pioneer study, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) was used to improve the solubility of the diffractaic acid (DA) via inclusion complex (DA:HP-β-CD). Subsequently, DA:HP-β-CD was incorporated into poly-ε-caprolactone (PCL) microspheres (DA:HP-β-CD-MS). Microspheres containing DA (DA-MS) or DA:HP-β-CD (DA:HP-β-CD-MS) were prepared using the multiple W/O/W emulsion-solvent evaporation technique. The phase-solubility diagram of DA in HP-β-CD (10–50 mM) showed an A_L type curve with a stability constant K_{1:1} = 821 M⁻¹. ¹H NMR, FTIR, X-ray diffraction and thermal analysis showed changes in the molecular environment of DA in DA:HP-β-CD. The molecular modeling approach suggests a guest-host complex formation between the carboxylic moiety of both DA and the host (HP-β-CD). The mean particle size of the microspheres were $\bar{M}_{DA-MS}$ = 5.23 ± 1.65 μm and $\bar{M}_{DA:HP-β-CD-MS}$ = 4.11 ± 1.39 μm, respectively. The zeta potential values of the microspheres were ζ_{DA-MS} = -7.85 ± 0.32 mV and $\zeta_{DA:HP-β-CD-MS}$ = -6.93 ± 0.46 mV. Moreover, the encapsulation of DA:HP-β-CD into microspheres resulted in a more slower release (k_2 = 0.042 ± 0.001; r^2 = 0.996) when compared with DA-MS (k_2 = 0.183 ± 0.005; r^2 = 0.996). The encapsulation of DA or DA:HP-β-CD into microspheres reduced the cytotoxicity of DA (IC₅₀ = 43.29 μM) against Vero cells (IC₅₀ of DA-MS = 108.48 μM and IC₅₀ of DA:HP-β-CD-MS = 142.63 μM).

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides that have a hydrophilic surface and a hydrophobic central cavity, favoring the formation of inclusion complexes with low polarity drugs [1]. The cyclodextrin with the greatest application in the pharmaceutical field is the β-cyclodextrin, owing to an easy drug complexation at low costs. However, chemically modified derivatives such as 2-

hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) have been widely used on account of their better solubility and increased complexation when compared to the natural ones.

The formation of cyclodextrin inclusion complexes with drugs can increase water solubility and stability; enhance bioavailability and reduce the toxicity of related compounds [2]. In order to improve drug encapsulation efficiency and modulate its release kinetics, cyclodextrin inclusion complexes have been incorporated into drug delivery systems (DDS) [3–5]. Drug delivery systems have several advantages over conventional dosage forms, such as the maintenance of constant plasma concentrations of the drug within the therapeutic range over an extended period of time, reducing their toxic or subtherapeutic levels. In addition, DDS can increase bioavailability, reducing the number of doses and increasing patient compliance, which results in an increased therapeutic

* Corresponding author at: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil.
 E-mail addresses: nssm@ufpe.br, nereide.magalhaes@ufpe.com (N.S. Santos-Magalhães).

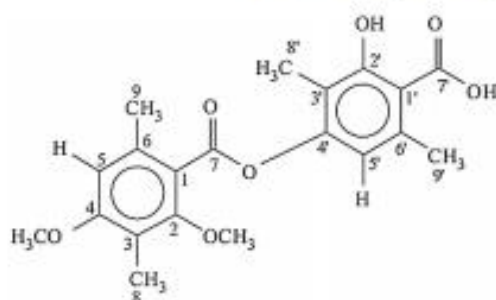


Fig. 1. Chemical structure of diffractaic acid ($C_{28}H_{22}O_7$, MW = 374 g/mol).

efficacy. Among DDS, microspheres shaped as solid polymeric particles deserve attention, given their physicochemical and biological stabilities, which are suitable for encapsulating peptides, proteins, DNA/RNA and drugs [6]. For the microspheres development, numerous biocompatible and biodegradable polymers are widely used, such as the polyesters poly- ϵ -caprolactone (PCL), polylactic acid (PLA), polyglycolic acid (PGA) [6–8].

The diffractaic acid (DA) is an orcinol depside isolated from *Usnea* sp. (Fig. 1). It presents needle-shaped crystals, with a melting point around 189–190°C and a molecular weight of 374 g/mol, being easily dissolved in ether, ethanol, acetone and chloroform.

Many biological properties of the diffractaic acid have been reported [9–15]. Honda and colleagues [13] reported that the diffractaic acid has activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv with a MIC of 15.6 μ g/ml (41.7 μ M). Despite presenting various biological activities, it has a limited therapeutic application due to its unfavorable low water solubility.

In this scenario, the aim of this study was to investigate the solubility increase of DA in HP- β -CD inclusion complexes, characterized by standard analyses and molecular modeling. Furthermore, it was performed the incorporation of DA:HP- β -CD inclusion complex into PCL-microspheres and their in vitro kinetics and cytotoxicity against Vero cells were evaluated.

2. Material and methods

2.1. Materials

The diffractaic acid (DA) was extracted from *Usnea* sp. It was purified and provided by Prof. Neli Kika Honda (UFMS, Brazil). Acetonitrile, methanol and dichloromethane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), all of them from analytical grade. PCL, PVA (MW 30000–70000), PEG (MW 3350), trehalose and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.2. Methodology

2.2.1. Phase-solubility study of diffractaic acid in HP- β -CD

The solubility of diffractaic acid in water and HP- β -CD solutions was evaluated as described by Higuchi and Connors [16]. Diffractaic acid (3 mg) was added to a purified water or to HP- β -CD solutions at different concentrations (10–50 mM). Samples were kept under mechanical stirring at 25°C for 72 h. After this period, an aliquot of 1 ml was withdrawn and centrifuged, and then, the supernatant was analyzed to determine the DA content at 213 nm (Ultraspex 3000 Pro spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech, USA).

Assuming the formation of a stoichiometric DA:HP- β -CD inclusion complex at 1:1 molar ratio, the solubility constant ($K_{1:1}$) was calculated according to the equation: $K_{1:1} = \text{slope}/[S_0(1 - \text{slope})]$, obtained from the linear relationship between the molar con-

centration of diffractaic acid versus the molar concentration of HP- β -CD, where S_0 is the solubility of diffractaic acid in the absence of HP- β -CD. In addition, the coefficient of efficiency (CE) was calculated as follows: $CE = S_0 K_{1:1} = \text{slope}/(1 - \text{slope})$ [17].

2.2.2. Preparation of the diffractaic acid:HP- β -CD inclusion complex

DA:HP- β -CD was obtained using the freeze-drying technique. In this procedure, HP- β -CD (73.2 mg) was firstly solubilized in water and DA (20 mg) was added later. The solution stayed under magnetic stirring at 25°C until it reached equilibrium conditions (72 h); thereafter, it was frozen at -80°C before lyophilization (EZ-DRY, FTSS System, New York, USA) at 200 bar for 48 h. The storage of the lyophilized inclusion complexes was carried out in a desiccator at room temperature before further analysis and use.

2.2.3. Characterization of DA:HP- β -CD inclusion complexes

DA:HP- β -CD inclusion complexes were characterized through ^1H NMR, infra-red, X-ray powder diffraction, thermal analysis and environmental scanning electron microscopy (ESEM). The proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) was carried out using the Unity Plus 300 MHz spectrometer (Varian, USA), with samples dissolved in deuterated dimethyl sulfoxide (d_6 -DMSO). The infrared spectra were recorded using the KBr method in the range of 4000–400 cm^{-1} (FT-IR spectrometer IF566, Bruker Optics, Germany). X-ray powder diffraction data were collected in a Geiger-Flex device 2073 (Rigaku, Japan), with $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.50405$ nm). Thermogravimetric analysis (TG) was performed in a Netzsch STA 449F3 apparatus. A Netzsch DSC 204 F1 apparatus was used to obtain differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of the studied samples. The measurements were performed from 25°C to 500°C at $10^\circ\text{C min}^{-1}$ under nitrogen flow using an open aluminum pan in which approximately 5 mg of the sample was placed. The morphologic aspect of the inclusion complexes was evaluated using ESEM (Quanta 200F microscope, FEI, Hillsboro, USA). Samples were prepared mounting approximately 0.5 mg of powder onto one side of the adhesive stub. ESEM analyses were carried out at 20 kV and magnification of 500 $\times$.

The diffractaic acid content in the inclusion complexes was assessed by dissolving an accurately weighed amount of DA:HP- β -CD in a mixture of methanol and acetonitrile (1:1) sonicated for 5 min, then, the volume was completed to 5 ml with acetonitrile. Furthermore, the dispersion was centrifuged at 8.776g for 15 min, the diffractaic acid was solubilized in the supernatant and quantified at 213 nm using a UV validated method [18].

2.2.4. Molecular modeling

The interaction energies of the inclusion complexes formed between DA and HP- β -CD were measured using the semi-empirical RM1 quantum chemical method, a classical molecular modeling technique. The total geometry optimizations of the isolated molecules (DA and HP- β -CD) and inclusion complexes (DA:HP- β -CD) were computed using the RM1 method, which is part of the Spartan08 software package [19].

In order to evaluate the relative stability of the inclusion complexes, the intermolecular interaction energies (ΔE) for the host-guest inclusion complexes were calculated using the supermolecule approach, in which the energies of the monomers (E_{DA} and $E_{\text{HP-}\beta\text{-CD}}$) are subtracted from the energy of the complexes ($E_{\text{DA:1}\times\text{HP-}\beta\text{-CD}}$), i.e.,

$$\Delta E_{\text{bimolecular}} = E_{\text{DA:1}\times\text{HP-}\beta\text{-CD}} - E_{\text{DA}} - E_{\text{HP-}\beta\text{-CD}} \quad (1)$$

2.2.5. Preparation of PCL microspheres containing diffractaic acid or DA:HP- β -CD

Microspheres were prepared by the multiple emulsion/solvent evaporation technique. A simple emulsion W/O was prepared by dissolving 225 mg of PCL and a known amount of diffractaic acid in dichloromethane (6 ml). The organic solution was then emulsified (Ultra-Turrax T25, IKA, Germany) in water for 1 min at 8000 rpm using an ice bath. Afterwards, the emulsion formed was added to an aqueous phase consisting of polyvinyl alcohol (PVA) 1.25% and emulsified for 30 s at 8000 rpm, resulting in a multiple emulsion W/O/W. The resulting emulsion was kept under mechanical stirring in a paddle stirrer at 400 rpm (2 h) in order to evaporate the solvent. Microspheres were recovered by centrifugation (Kubota KN-70 Centrifuge, Japan) at 3000 rpm for 10 min; washed three times with distilled water and dispersed in the cryoprotectant 1% trehalose solution (v/v). Then, the microspheres were frozen at -80°C before lyophilization (EZ-DRY, FTSS System, New York, USA) at 200 bar for 48 h. The storage of the microspheres was carried out in a desiccator at room temperature. For the preparation of microspheres containing the DA:HP- β -CD inclusion complex, the same conditions described above were followed, with the complex dissolved in the aqueous phase of the primary emulsion.

2.2.6. Characterization of microspheres

2.2.6.1. Particle size and polydispersity index. The particle size of the microspheres was measured through the laser diffraction technique (Microtrac[®] S3500, Montgomery Ville, USA). Samples of freeze-dried microspheres (10 mg) were dispersed in an aqueous solution of Tween[®]80 at 0.04% (w/v), sonicated for 10 min and analysed. The calculated parameters were: volume average diameter (d_v) and span index $= d(v,0.9) - d(v,0.1) / d(v,0.5)$, where $d(v,0.9)$, $d(v,0.1)$ and $d(v,0.5)$ represent the percentage of microspheres with average volumetric diameters above 90%, 10% and 50%, respectively.

2.2.6.2. Surface charge. The surface charge (zeta potential) was analyzed by electrophoretic mobility using Microtrac[®] S3500 (Montgomery Ville, USA). The zeta potential (ζ) of the microspheres was measured at 25°C after the dilution of the samples in 1 mM of NaCl aqueous solution (0.5% v/v). Results (mean $\pm$ standard deviation) are representative of three independent measurements.

2.2.6.3. Drug content and encapsulation efficiency of microspheres. The drug content and the encapsulation efficiency of the microspheres were determined using a UV-vis spectrophotometer (Ultrospec 3000 Pro, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Samples of the microspheres (5 mg) were dissolved in a mixture (25 ml) of dichloromethane:methanol (3:2) and sonicated for 10 min. An aliquot of this solution was then diluted to the theoretical concentration of $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ and the diffractaic acid was determined at 213 nm as previously reported [18]. Drug encapsulation efficiency was calculated according to $\text{EE\%} = ([\text{DA}_{\text{payload}}] - [\text{DA}_{\text{exp}}]) / [\text{DA}_{\text{payload}}] \times 100$, where DA_{exp} is the content of DA in microspheres and $\text{DA}_{\text{payload}}$ is the initial theoretical amount of DA used to prepare the microspheres. Assays were performed in triplicate.

2.2.6.4. Environmental scanning electron microscopy. The surface morphology of the microspheres was examined by environmental scanning electron microscopy (ESEM), using a JEOL JSM-5600LV microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). A sample of the lyophilized microspheres was placed in one side of the adhesive stub, sputtered with colloidal gold and then analyzed as mentioned above (magnification of 1000 or 1500 $\times$).

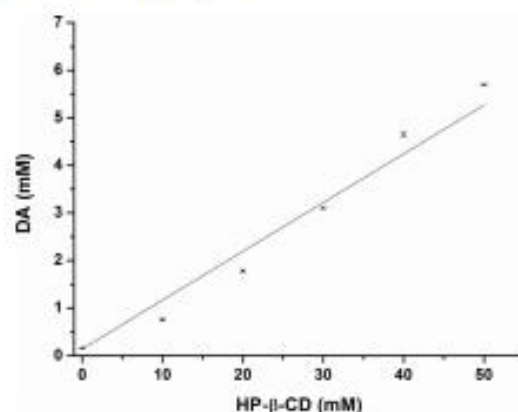


Fig. 2. Phase-solubility diagram of diffractaic acid (DA) in the presence of HP- β -CD in water at 25°C .

2.2.7. In vitro release kinetics

Samples of microspheres (10 mg) containing DA or the DA:HP- β -CD inclusion complex were added in 300 ml of phosphate buffer pH 7.4 and incubated at $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ under magnetic stirring. At pre-determined time intervals, 1 ml aliquots of the dissolution medium were removed, replacing the same volume with fresh medium, then, it was filtered using 0.22 μm Millex (Millipore, USA). The DA content in the dissolution medium was quantified as previously described. The in vitro release profiles of microspheres containing DA were expressed as the percentage of DA released (in relation to the amount of encapsulated DA) in a function of time (120 h). The assays were carried out in triplicate. Kinetics data were fitted using a non-linear Fickian model $[M_t/M_{\infty}] = (1 - k_1 e^{-k_2 t})$.

2.2.8. Cytotoxicity evaluation of diffractaic acid encapsulated into microspheres

The cytotoxicity evaluation of diffractaic acid was carried out in Vero cells (monkey kidney fibroblasts) upon their growth exponential phase. Cell viability was determined using the vital dye Trypan Blue at 0.4% v/v in PBS. Aliquots of Vero cells (1×10^4 cells/ml) were distributed into 96-well culture plates (220 μl /well) and the plates were incubated at 37°C (Silks, Milan, Italy) in a humid atmosphere enriched with 5% CO_2 . After 24 h of incubation, samples of diffractaic acid diluted in DMSO, DA:HP- β -CD inclusion complex, DA-MS and DA:HP- β -CD-MS diluted in 7.4 pH phosphate buffer were added to the culture plate, producing diffractaic acid final concentrations of 52, 26, 13 and 6.5 $\mu\text{g/ml}$. DMSO and DMEM were used as negative controls. After 72 h after treatment, the cytotoxic effects of the samples were evaluated by means of the colorimetric MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium-2.5] method using an ELISA reader with 450 nm filter [20].

2.2.9. Statistical analysis

The experimental results were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (mean $\pm$ SD). The statistical analysis of the data was performed using the Student *t* test, considering $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Phase-solubility study of diffractaic acid in HP- β -CD

Fig. 2 shows the solubility profile of the diffractaic acid in the presence of HP- β -CD at different concentrations. In the presence of 50 mM of HP- β -CD the solubility of DA was 5.6 mM, which corresponds to a 35-fold increase compared to its solubility in water (0.16 mM).

Table 1
¹H NMR signals of DA and DA:HP-β-CD inclusion complex (shifts observed in signals of DA).

DA	δ DA (ppm)	δ DA:HP-β-CD (ppm)	Δδ (ppm)
OH (C2')	12.540 (s)	12.573	0.033
H (C5')	6.761 (s)	6.777	0.016
H (C5)	6.605 (s)	6.595	0.010
OCH ₃ (C4)	3.832 (s)	3.840	0.008
OCH ₃ (C2)	3.749 (s)	3.753	0.004
H (C9')	2.500 (s)	2.500	0.000
H (C9)	2.389 (s)	2.393	0.004
H (C8)	2.074 (s)	2.079	0.005
H (C8')	2.055 (s)	2.050	0.005

Table 2
¹H NMR signals of HPβ-CD and DA:HP-β-CD inclusion complex (shifts observed in signals of HPβ-CD).

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

This increase in the solubility of DA in the presence of HP-β-CD can be compared to other lichenic compounds, such as atranorin (5.5 μg/ml; pH = 8.0), fumarprotocetraric acid (from 32.5 to 8980 μg/ml), and usnic acid (from 5 to 350 μg/ml) in 10% of HP-β-CD at pH = 7.4 [21]. More recently, Lira et al., in a phase solubility study, reported a 5-fold increase in usnic acid solubility in the presence of 16 mM of β-cyclodextrin when compared to the solubility of usnic acid in phosphate buffer solution at pH 7.4 (7.32 μg/ml) [22].

The DA:HP-β-CD inclusion complex with a 1:1 stoichiometry was determined by the A₁ type curve of the phase solubility diagram (Fig. 2). The constant of association calculated from the phase solubility diagram (Fig. 2) was 821 M⁻¹ (Slope = 0.11615, S₀ = 0.16 mM, r = 0.98064). A linear increase in DA solubility with the augmentation of HP-β-CD concentrations indicates the formation of a soluble complex, according to the literature [16].

3.2. Characterization of DA:HP-β-CD inclusion complexes

3.2.1. ¹H NMR analysis

Proton NMR was performed to evaluate changes in chemical signals (Δδ) of pure compounds (DA and HP-β-CD) and in the DA:HP-β-CD inclusion complex (Tables 1 and 2). For diffractaic acid singlets at 2.055, 2.074, 2.389, 2.500, 6.605 and 6.761 ppm, a broad singlet at 12.540 ppm for the hydroxyl group as well as singlets at 3.749 and 3.832 ppm for the ether group were observed. All chemical signals of DA were according with those previously reported by Bayir and colleagues [23]. Cyclodextrin signals agree with those found in the literature [5].

¹H NMR spectrum of the DA:HP-β-CD inclusion complex showed significant shifts (Table 1). It was observed that the most significant shift of DA was in the phenyl OH group (Δδ = 0.033 ppm) and at H5' (Δδ = 0.016 ppm). Moreover, H3 and H5 protons of HP-β-CD presented displacements of Δδ = 0.018 and 0.009 ppm, respectively (Table 2). Since these protons are located in the hydrophobic cavity of HP-β-CD, the shifts suggest that diffractaic acid would be expected to form an inclusion complex by entering the cyclodextrin cavity with a stronger interaction with H3. Therefore, signal displacements of OH groups of diffractaic acid suggested that its interaction with HP-β-CD occurred through the phenolic

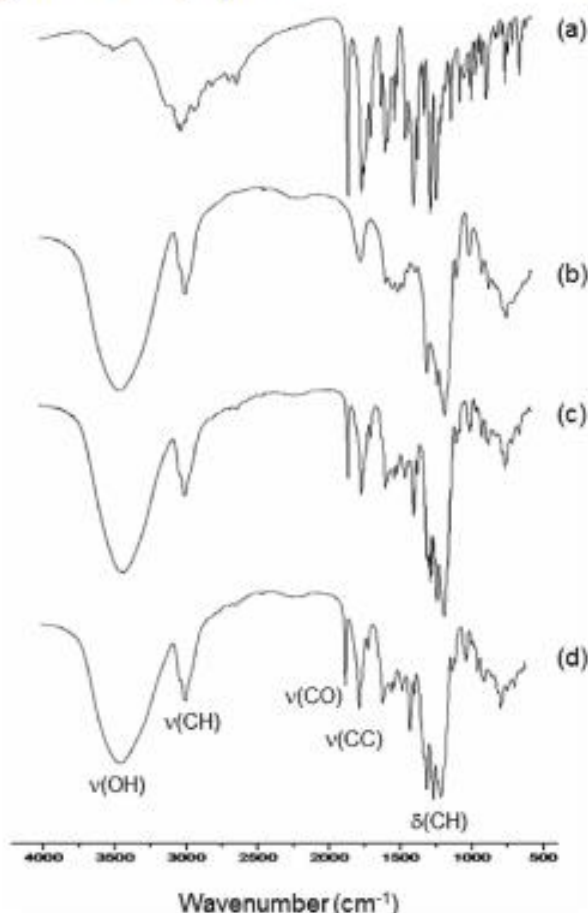


Fig. 3. Infrared spectra of diffractaic acid (a), 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) (b), DA:HP-β-CD inclusion complex (c) and physical mixture (d).

hydroxyl group in the ortho position in relation to the ether group, as a result of hydrogen bonds with H3.

3.2.2. Infrared spectroscopy

The infrared spectra of DA, HP-β-CD, DA:HP-β-CD inclusion complex and physical mixture are shown in Fig. 3. The infrared spectrum of diffractaic acid presents characteristic bands of carboxyl and ester groups at 1760 cm⁻¹ and 1735 cm⁻¹, respectively, consistent with the literature [23,24]. These findings are also observed in the physical mixture and inclusion complex, suggesting the formation of a DA:HP-β-CD inclusion complex.

The DA:HP-β-CD spectrum showed a narrow band at 3400 cm⁻¹, which corresponds to ν(OH) stretching. The formation of an inclusion complex involves the release of water molecules inside the cavity of HP-β-CD, indicating that interactions between diffractaic acid and cyclodextrin have occurred. Moreover, a band at 1760 cm⁻¹, corresponding to the HP-β-CD methoxy groups was found, suggesting a possible interaction between the two molecules. The characteristic stretching (ν(OH), ν(CH), ν(CO) and ν(CC)) and deformations (δ(CH)) of the HP-β-CD and DA are presented in Fig. 3.

3.2.3. X-ray powder diffraction analysis

X-ray powder diffraction patterns are shown in Fig. 4 and reveal the formation of supramolecular species between diffractaic acid and HP-β-CD. The Miller index of the main features of the X-ray

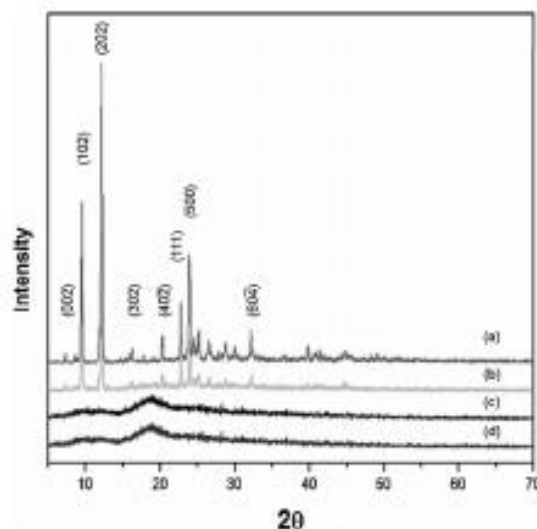


Fig. 4. X-ray powder diffraction patterns of diffractaic acid (a), physical mixture (b), DA:HP-β-CD inclusion complex (c) and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) (d).

powder pattern of DA are presented in Fig. 4 according to the crystalline structure reported by Fonseca et al. [25]. The X-RPD pattern of diffractaic acid exhibited sharp peaks characteristic of compounds of a crystalline nature, while a broad peak was generated for HP-β-CD, confirming its amorphous state. Since the physical mixture exhibited peaks characteristic of diffractaic acid and HP-β-CD, it is important to note that these peaks have resulted from the combination of both pure components analyzed; hence there is no complex formation by physical mixture. The pattern of physical mixture showed a decrease in intensity, probably due to the amorphous character of this cyclodextrin. On the other hand, XRPD pattern of the DA:HP-β-CD inclusion complex was characterized only by broad diffraction peaks, in which it is not possible to distinguish characteristic peaks of DA. These results may suggest that diffractaic acid is no longer present as a crystalline material, but that the complex still exists in the solid amorphous state. These results show the amorphous state of the drug in the lyophilized product as a result of drug interactions with cyclodextrin in the solid state and the loss of crystallinity, which is indicative of the possible formation of an inclusion complex.

3.2.4. Thermal analysis

Fig. 5 shows the thermogravimetric and DSC curves of the studied samples. The HP-β-CD curve is characterized by an event around 60°C, associated with the dehydration process followed by its decomposition at approximately 310°C. These events are confirmed in the DSC curves by, respectively, a wide peak and a complex sequence of events at the same onset temperatures. On the other hand, DA decomposes in two successive events starting at around 190°C and 300°C. It is important to notice that the former event is associated with a sharp endothermic peak ($T_{onset} = 189^\circ\text{C}$) in the DSC curve, demonstrating that DA simultaneously melts and decomposes.

The thermal analysis of the physical mixture and the inclusion complex are also presented in Fig. 5. Both curves show the main events associated with each compound. The first derivative of the TG curves (Fig. 6) clearly points the presence of DA in the physical mixture and the inclusion complex by a small peak at the temperature of the melt/decomposition process. DSC curves are very useful to study inclusion complexes because an absence of an endothermic peak corresponds to the melting of the guest molecule, indicat-

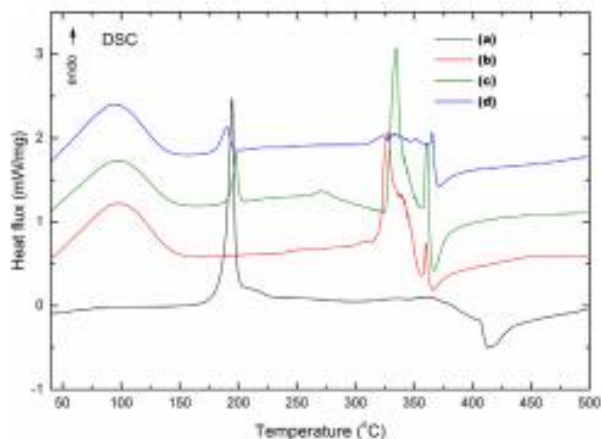


Fig. 5. Thermogravimetric analyses of diffractaic acid (a), 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) (b), physical mixture (c) and DA:HP-β-CD inclusion complex (d).

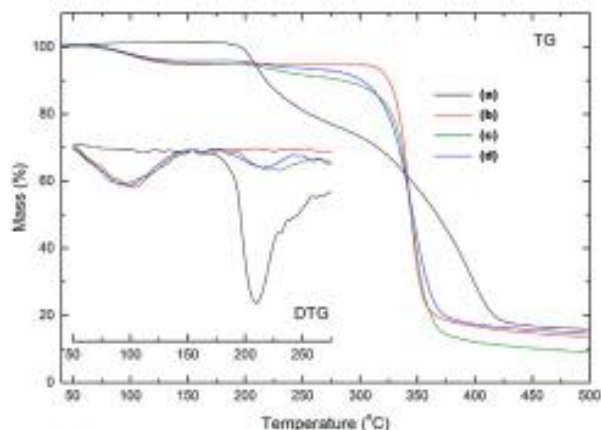


Fig. 6. Differential scanner calorimetry of diffractaic acid (a), 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) (b), physical mixture (c) and DA:HP-β-CD inclusion complex (d).

ing the formation of the complex. That is not the case with the DA:HP-β-CD system, since the physical mixture exhibits a peak at 193°C, whereas this event is observed in the inclusion complex at 182°C. These results seem to be inconsistent with the formation of a complex. However, it needs to be taken in consideration that DA decomposes when melting, these processes are strongly correlated. It should be noted that the peak in the inclusion complex is at a lower temperature than in the crude material. Thus, with the lack of a crystalline packing, as expected in the inclusion complex, the decomposition process could start at lower temperatures, as no energy is required to melt the DA prior to decomposition.

3.2.5. Environmental scanning electron microscopy

The surface morphology of the powders derived from DA, HP-β-CD, DA and HP-β-CD physical mixture and the DA:HP-β-CD inclusion complex were assessed by ESEM. As illustrated in Fig. 7, DA exists in a needle-like crystal structure (Fig. 7a), whereas HP-β-CD was observed as amorphous, cylindrical spheres (Fig. 7b). The physical mixture of DA and HP-β-CD shows characteristic crystals of DA mixed with excipient particles or adhered to their surface, clearly observed in Fig. 7c. On the other hand, the DA:HP-β-CD inclusion complex (Fig. 7d) appeared in the form of irregular particles in which the original morphology of both components dis-

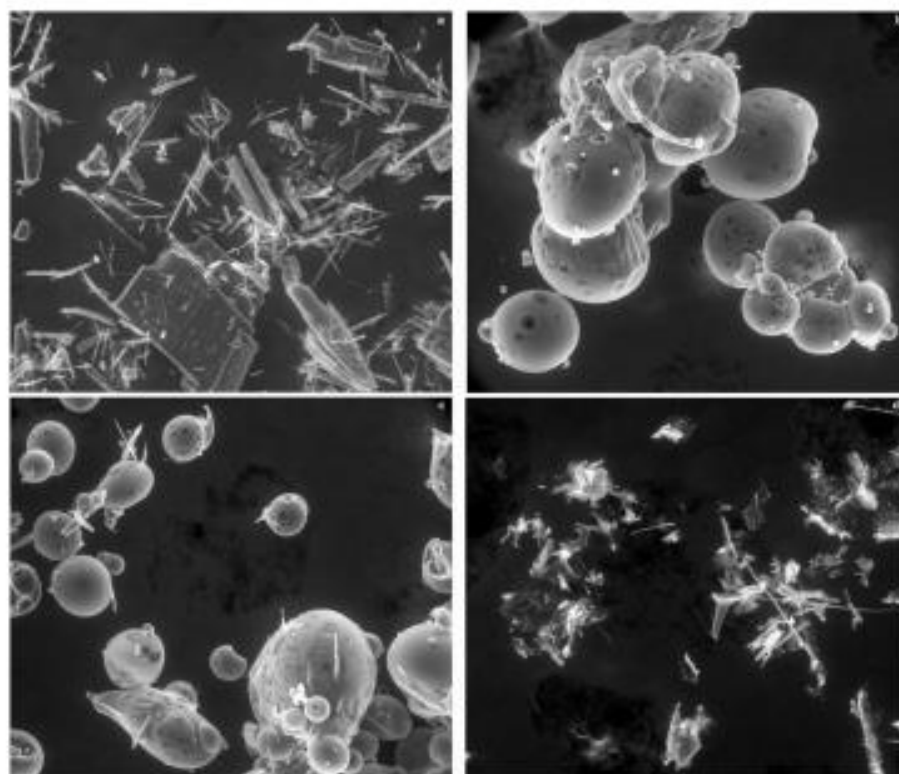


Fig. 7. Environmental scanning electron microscopy of DA (a), HP-β-CD (b), DA and HP-β-CD physical mixture (c) and DA:HP-β-CD inclusion complex (d) using magnification of 500 $\times$.

appeared and tiny aggregates of amorphous pieces of irregular sizes were present. A comparison of these images has revealed that the inclusion complex was structurally distinct from the isolated components and from the physical mixture of DA and HP-β-CD. The sizes and shapes of DA and HP-β-CD particles were different from those of the inclusion complex, thus confirming the formation of an inclusion complex between DA and HP-β-CD.

3.2.6. Molecular modeling calculations

There are several reports in the literature using molecular modeling of drugs in HP-β-CD inclusion complexes [3,4,26,27]. Our research group has already used the semi-empirical RM1 quantum chemical approach for β-lapachone:HP-β-CD inclusion complexes, addressing the degree of substitution of hydroxypropyl (HP) groups in the glucose units of βCD [5].

The inclusion complex between one DA guest molecule and one HP-β-CD host (DA:1 $\times$ HP-β-CD) was calculated in two different ways: (i) the inclusion in HP-β-CD was oriented by the methoxy (OCH₃) moiety of the left ring (see Fig. 8, position 4); (ii) the inclusion in HP-β-CD was oriented by the carboxylic (COOH) moiety of the right ring (see Fig. 8, position 1'). The most stable geometries found for the DA:1 $\times$ HP-β-CD (methoxy and carboxylic moieties) can be seen in Fig. 8. The interaction energy ($\Delta E_{\text{bimolecular}}$) of the DA:1 $\times$ HP-β-CD, determined by Eq. (1), is -2.4 kJ mol^{-1} for the inclusion complex oriented by the methoxy moiety (Fig. 8a), and $-41.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ for the inclusion oriented by the carboxylic moiety (Fig. 8b).

It should be emphasized that the stability of the complex formed between the carboxylic moiety of the DA (guest) and HP-β-CD (host) is about twenty times greater than the stability of the complex formed with the methoxy moiety of the DA. The main reason for this higher stability is the existence of two important hydro-

Table 3
Pre-formulation study of DA-loaded PCL microspheres at different drug:polymer ratios.

Drug/polymer ratio (DA:PCL)	Encapsulation efficiency $\pm$ S.D. (%)	d_v (μm)	Span
1:11.25 ^a	58.33 $\pm$ 0.08	5.23	1.00
1:15 ^b	39.13 $\pm$ 0.40	4.55	1.65
1:22.5 ^c	16.05 $\pm$ 0.19	4.41	1.28

d_v = mean diameter; S.D. = standard deviation.

^a DA = 20 mg.

^b DA = 15 mg.

^c DA = 10 mg.

gen bonds (see Fig. 8c) between DA and HP-β-CD. Therefore, the host-guest complex most likely to be formed, at least from the theoretical point of view, occurs with the carboxylic moiety, as shown in Fig. 8.

3.2.7. Characterization of microspheres

A preformulation study was initially carried out to obtain PCL microspheres containing DA at different drug:polymer ratios, in which the PCL polymer mass (225 mg) was constant and DA mass varied from 10 to 20 mg. The drug encapsulation efficiency, mean particle size (d_v) and span of microspheres were evaluated (Table 3).

DA was successfully encapsulated into PCL microspheres with an encapsulation efficiency ranging from 16.05 $\pm$ 0.19% (10 mg DA) to 58.33 $\pm$ 0.08% (20 mg DA) (Table 3). An increase in DA encapsulation efficiency was found as the drug payload increased.

Balmayor and colleagues [28] reported an increase in the encapsulation efficiency of dexamethasone from 74.99% to 93.65% in PCL microspheres (with 525.3 μm), when the drug concentration was

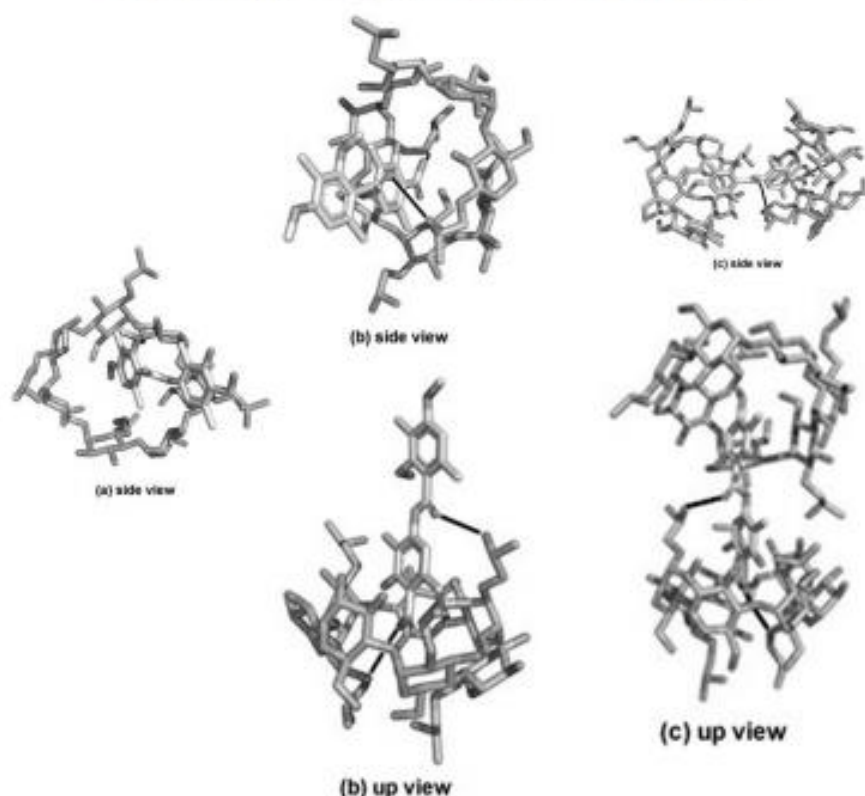


Fig. 8. Optimized geometries found for DA:1 × HP-β-CD inclusion complexes formed by: metoxy (a) and carboxylic (b) moieties; and DA:2 × HP-β-CD inclusion complex (c). The emphasized lines represent two hydrogen bonds between the carboxylic moiety of DA and HP-β-CD.

increased by changing the drug:polymer ratio from 1:5 to 1:20. An encapsulation efficiency of 57.28% for microspheres containing vancomycin was found [29], while Pérez and colleagues [30] reported an efficiency of 57% for PCL microspheres containing propranolol, equal to that obtained in the present study (58.33%) for the microspheres containing DA at a 1:11 drug:polymer ratio.

The span values obtained for microspheres at drug:polymer molar ratios of 1:15 and 1:22 suggest heterogeneous samples, since it was above 1.00 (1.65 and 1.28, respectively), while the ratio of PCL microspheres at a 1:11 DA:PCL molar ratio showed a span value of 1.00, suggesting homogeneous microspheres [8].

Table 4 presents drug content, encapsulation efficiency, mean particle size (*dv*), span and zeta potential (ζ) of PCL microspheres containing DA:HP-β-CD (DA:HP-β-CD-MS) compared to systems containing DA (DA-MS) and unloaded microspheres. Based on results obtained with different drug:polymer ratios, the 1:1 DA:HP-β-CD inclusion complex was encapsulated into PCL microspheres at 1:11 DA:PCL molar ratio.

DA:HP-β-CD-MS presented a decrease in the encapsulation efficiency when compared to DA-MS, which was probably caused by mass losses transferred to the external aqueous phase of transi-

tory emulsion due to its more soluble nature. This can be explained by the more hydrophilic nature of the inclusion complex compared to a free drug, which can spread more easily to the external aqueous phase during the preparation of microspheres. The encapsulation of inclusion complexes produced smaller microspheres ($4.11 \pm 1.39 \mu\text{m}$), which may be associated with a lower particle aggregation during the lyophilization process, owing to the contribution of the HP-β-CD cryoprotectant effect. However, there was an increase in the span value of DA:HP-β-CD-MS (1.89) when compared that of DA-MS (1.00), suggesting a heterogeneous population, since the value was above 1.00.

The zeta potential (ζ) of unloaded PCL microspheres, DA-MS and DA:HP-β-CD-MS (Table 4) revealed that the zeta potential values of DA-MS and DA:HP-β-CD-MS became less negative than those of unloaded-PCL microspheres ($\zeta = -12.68 \pm 0.56 \text{ mV}$), the lowest value being that of the DA:HP-β-CD-MS ($\zeta = -6.93 \pm 0.46 \text{ mV}$). This phenomenon can probably be associated with the presence of drug molecules adsorbed on the wall of polymeric microspheres, which can influence in the surface charge [6].

Micrographs showed microspheres with good sphericity and a smooth surface with no pores (Fig. 9a). The encapsulation of DA and

Table 4
Drug content, encapsulation efficiency, mean particle size (*dv*), span and zeta potential (ζ) of PCL microspheres.

DA:PCL (1:11)	Drug content $\pm$ S.D. (%)	Encapsulation efficiency $\pm$ S.D. (%)	<i>dv</i> $\pm$ S.D. (μm)	span	Zeta potential (ζ) $\pm$ S.D. (mV)
Unloaded MS	–	–	5.89 ± 1.33	0.97	-12.68 ± 0.56
DA-MS	3.32 ± 0.02	58.33 ± 0.08	5.23 ± 1.65	1.00	-7.85 ± 0.32
DA:HP-β-CD-MS	2.28 ± 0.09	41.87 ± 0.12	4.11 ± 1.39	1.89	-6.93 ± 0.46

PCL = 25 mg; S.D. = standard deviation.

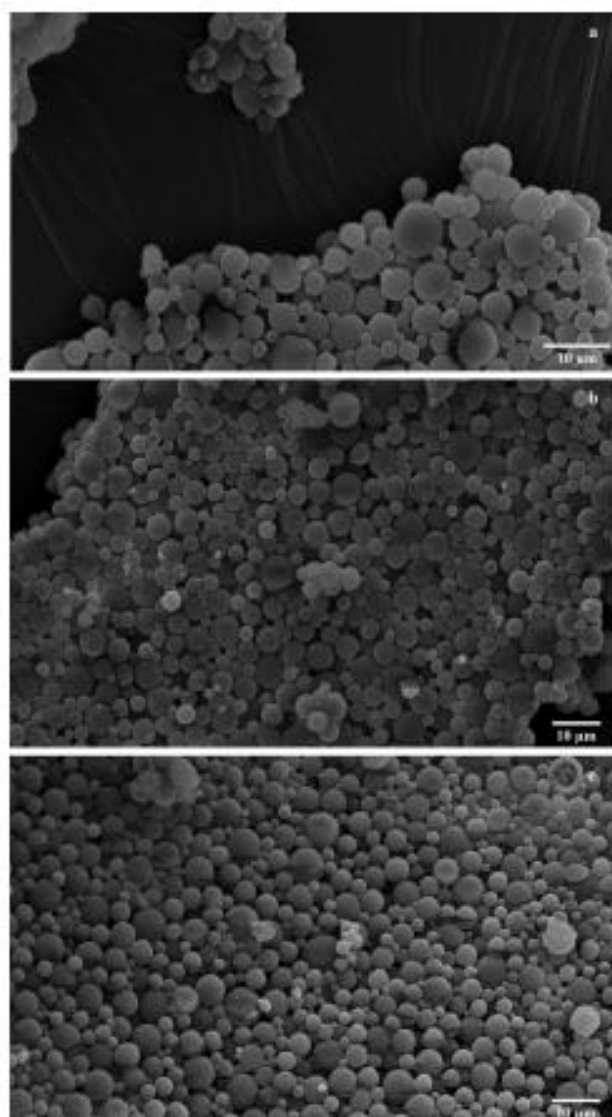


Fig. 9. Environmental scanning electron microscopy of PCL unloaded MS (a) (magnification of 1500 $\times$), DA-MS (b) (magnification of 1000 $\times$) and DA:HP- β -CD-MS (c) (magnification of 1000 $\times$).

DA:HP- β -CD inclusion complex into microspheres did not cause any significant change in their morphology (Fig. 9b and 9c, respectively).

3.2.8. In vitro release kinetics

The release profiles of DA and DA:HP- β -CD from PCL microspheres in phosphate buffer (pH 7.4) at 37 °C are shown in Fig. 10. Symbols represent experimental data and curves represent the fit of the mathematical model of Fick ($M_t/M_\infty = (1 - k_1 e^{-k_2 t})$). As it can be seen, a good fit between experimental and theoretical data was obtained ($r \geq 0.99$). This indicates that the mechanism of simple

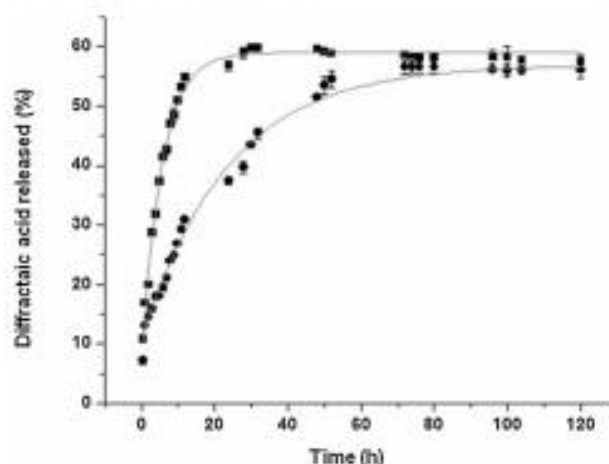


Fig. 10. Release kinetics of diffractaic acid from microspheres formulations in pH 7.4 buffer at 37 °C: DA-MS (■) and DA:HP- β -CD-MS (●). Each point represents the mean of three different experiments $\pm$ S.D. The lines represent the data fit using nonlinear Fickian diffusion model.

diffusion is involved in the mechanism of drug mass transport systems of microparticles. The calculated parameters of the kinetics are summarized in Table 5.

Both microsphere formulations showed a biphasic release pattern characterized by an initial burst effect with different k_2 release rate values. For microspheres containing DA, there was an increased burst effect ($16.84 \pm 0.40\%$) in the first hour of kinetics, in contrast with microspheres containing DA:HP- β -CD inclusion complex ($13.06 \pm 0.16\%$). This event was followed by a stage of controlled drug release for 12 h with a maximum DA release of 55%. On the other hand, DA:HP- β -CD-MS released approximately 45% in 32 h. These data, suggest that DA:HP- β -CD-MS achieved a greater efficiency in the stage of slower release than DA-MS. However, no statistical differences were found between the total percentages released by the two formulations ($p < 0.05$; $t^{\text{cal}} = 2.72$).

Based on mathematical modeling calculations, the constant k_2 (apparent diffusion constant) of DA:HP- β -CD-MS produced lower values ($k_2 = 0.042 \pm 0.001$; $r^2 = 0.99612$) than those of DA-MS ($k_2 = 0.183 \pm 0.005$; $r^2 = 0.99614$). This fact may be due to the interaction between the inclusion complex and polymer, which effectively reduces the apparent diffusibility of the drug as it was previously described in the literature for other compounds associated with cyclodextrins. In fact, it has been reported that the solubility and diffusibility of a drug can be modified by the incorporation of its inclusion complexes into a polymeric matrix, resulting in a change in the release profile of the drug [31]. As seen in this study, HP- β -CD was able to modify DA kinetics. Therefore, the complexation of DA with HP- β -CD has influenced the initial drug release as well as it has controlled the release stages and the total drug released from the PLC microspheres.

3.2.9. Cytotoxicity evaluation of diffractaic acid or DA:HP- β -CD-loaded microspheres

Cell viabilities of $84.68 \pm 3.7\%$, $69.44 \pm 4.72\%$, $56.99 \pm 3.5\%$ and $46.5 \pm 4.5\%$ were found after the treatment of Vero cells with

Table 5

Burst effect and release kinetic parameters (k_1 and k_2) to PCL microspheres containing DA or DA:HP- β -CD inclusion complex.

Formulations	Burst effect (%) (1 h)	Exponential model $M_t/M_\infty = (1 - k_1 e^{-k_2 t})$		DA released (%)
		k_1	k_2 (h^{-1})	
DA-MS	16.84 ± 0.40	0.902 ± 0.012	0.183 ± 0.005	58.93 ± 0.84
DA:HP- β -CD-MS	13.06 ± 0.16	0.814 ± 0.007	0.042 ± 0.001	56.54 ± 1.45

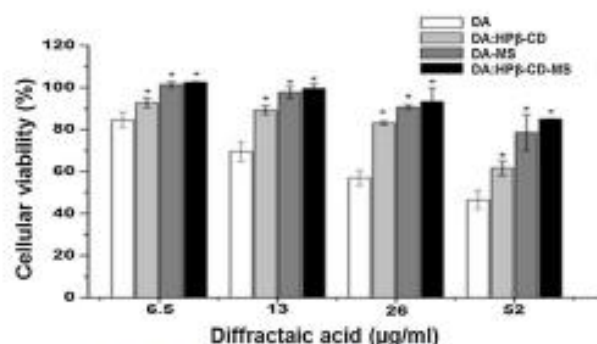


Fig. 11. Evaluation of the cytotoxicity of diffractaic acid (DA), inclusion complex (DA:HP-β-CD), microspheres containing diffractaic acid (DA-MS) and microspheres containing inclusion complex (DA:HP-β-CD-MS) in different concentrations (6.5, 13, 26 and 52 µg/ml) in front of Vero cells. *Statistically significant differences of formulations were compared with diffractaic acid ($p < 0.05$).

diffractaic acid at concentrations of 6.5, 13, 26 and 52 µg/ml, respectively (Fig. 11). According to these data, a significant cytotoxic effect was observed when cells were incubated with 52 µg/ml of diffractaic acid, showing a cell growth inhibition of $46.5 \pm 4.5\%$. However, no cytotoxic effect ($84.68 \pm 3.7\%$ of cell viability) was found in cells which were incubated at a DA concentration of 6.5 µg/ml. These results showed that the cytotoxicity of diffractaic acid occurred in a dose-dependent manner with an IC_{50} of 43.29 µg/ml.

The complexation of diffractaic acid with HP-β-CD reduced the cytotoxicity of the pure compound with a low cell viability of $61.66 \pm 3.4\%$ after treatment with DA:HP-β-CD at a dose of 52 µg/ml. At DA:HP-β-CD concentrations of 6.5, 13 and 26 µg/ml, cell viabilities of $92.81 \pm 2.29\%$, $89.29 \pm 2.14\%$ and $83.19 \pm 0.94\%$, respectively, were found, which are higher than that presented with the diffractaic acid. An IC_{50} of 70.50 µg/ml value was calculated for DA:HP-β-CD. From these results, DA complexation with HP-β-CD has decreased the toxic effect of diffractaic acid, which is one of the properties attributed to drug:cyclodextrin inclusion complexes.

Microspheres containing diffractaic acid (DA-MS) or DA:HP-β-CD inclusion complex (DA:HP-β-CD-MS) showed no cytotoxic effects when compared to pure diffractaic acid. At DA-MS concentrations of 6.5, 13, 26 and 52 µg/ml, cell viabilities of $101.49 \pm 1.39\%$, $97.65 \pm 2.77\%$, $90.75 \pm 1.19\%$ and $78.53 \pm 8.66\%$, respectively, were found. An IC_{50} of 142.63 µg/ml was then calculated. On the other hand, cell viabilities of $102.57 \pm 0.2\%$, $99.50 \pm 2.29\%$, $93.37 \pm 6.51\%$ and $85.07 \pm 0.19\%$ were found after treatment with DA:HP-β-CD-MS ($IC_{50} = 108.48$ µg/ml).

All these findings demonstrate that the encapsulation of DA and DA:HP-β-CD into PCL microspheres decrease the cytotoxic action of the diffractaic acid and that PCL is not toxic, being suitable for the use in controlled drug delivery systems. These tests showed, therefore, that besides the complexation, the use of controlled release systems such as microspheres was able to reduce the diffractaic acid cytotoxicity against Vero cells.

4. Conclusion

In this study, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin was able to increase more than 35-fold the solubility of diffractaic acid. Diffractaic acid:2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complexes were obtained as suggested by the results of 1H NMR, IR, X-ray powder diffraction and thermal analysis. The results of the molecular modeling suggest that the stability of the complex, which was formed between the carboxylic moiety of the DA (guest) and

HP-β-CD (host) is about twenty times greater than that of the complex formed with the methoxy moiety of the DA because of two important hydrogen bonds. This result indicates the most likely orientation of the inclusion process of DA in HP-β-CD. The DA was successfully encapsulated into PCL microspheres with its highest encapsulation efficiency at a 1:11 drug:polymer ratio. In vitro kinetics studies showed that the encapsulation of DA:HP-β-CD into microspheres resulted in a modulation of DA release. Thus, microspheres containing DA:HP-β-CD showed a more prolonged release profile of diffractaic acid than that of DA. Furthermore, the encapsulation of DA or DA:HP-β-CD inclusion complex into PCL-microspheres reduced drug cytotoxicity against Vero cells, thereby ensuring safety and therapeutic efficacy.

Disclosure

No conflicts of interest were declared in this paper.

Acknowledgements

We are grateful to the Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE) Brazil for a PhD scholarship. This study received financial support from the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (grant# 476741/2012-2). We also thank Northeast Center for Strategic Technologies (CETENE) and Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Pernambuco, Brazil (CPqAM/FIOCRUZ, Pernambuco, Brazil).

References

- [1] T. Loftsson, D. Duchêne, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.* 329 (2007) 1–11.
- [2] M.E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 645–666.
- [3] A.C. Ilapakurthy, Y.A. Sabnis, B.A. Avery, M.A. Avery, C.M. Wyandt, Interaction of artemisinin and its related compounds with hydroxypropyl-β-cyclodextrin in solution state: experimental and molecular-modeling studies, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 649–655.
- [4] M.V.G. Araújo, E.K.B. Vieira, G.S. Lázaro, L.S. Conegero, L.E. Almeida, L.S. Barreto, N.B. Costa, L.F. Gimenez, Sulfadiazine/hydroxypropyl-β-cyclodextrin host-guest system: characterization, phase-solubility and molecular modeling, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 5788–5794.
- [5] I.M.F. Cavalcanti, E.A.M. Mendonça, M.C.B. Lira, S.B. Honrato, C. Amorim, R.V.S. Amorim, J. Mendes Filho, M.M. Rabello, M.Z. Hernandez, A.P. Ayala, N.S. Santos-Magalhães, The encapsulation of β-lapachone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach, *Eur. J. Pharm. Sci.* 44 (2011) 332–340.
- [6] C. Wischke, S.P. Schwendeman, Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PGLA microparticles, *Int. J. Pharm.* 364 (2008) 298–327.
- [7] V.R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, A. Trehan, Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 1–23.
- [8] W.A. Moraes, M. Costa, A.D.O. Paixão, M.A.M. Maciel, N.S. Santos-Magalhães, Encapsulation and release characteristics of DCTN/PGLA microspheres, *J. Microencapsul.* 26 (2009) 529–534.
- [9] B. Emsen, Y. Bulak, E. Yildirim, A. Aslan, S. Ercisli, Activities of two major lichen compounds, diffractaic acid and usnic acid against *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae), *Egypt. J. Biol. Pest Control* 22 (2012) 5–10.
- [10] E. Yildirim, B. Emsen, A. Aslan, Y. Bulak, S. Ercisli, Insecticidal activity of lichens against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), *Egypt. J. Biol. Pest Control* 22 (2012) 151–156.
- [11] F. Odabasoglu, O.S. Yildirim, H. Aygun, Z. Halici, M.H.F. Erdogan, E. Cadirci, A. Cakir, Z. Okumus, B. Aksakal, A. Aslan, D. Unal, Y. Bayir, Diffractaic acid, a novel proapoptotic agent, induces with olive oil both apoptosis and antioxidative systems in Ti-implanted rabbits, *Eur. J. Pharm.* 674 (2012) 171–178.
- [12] F. Brisdeli, M. Perilli, D. Sellitti, M. Piovano, J.A. Garbarino, M. Nicoletti, A. Bozzi, G. Amicosante, G. Celenza, Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study, *Phytother. Res.* 27 (2013) 431–437.

- [13] N.K. Honda, F.R. Pavan, R.C. Coelho, S.R. Andrade-Leite, A.C. Michelletti, T.L.B. Lopes, M.Y. Misutsu, A. Bearriz, R.L. Brum, C.Q.F. Leite, Antimycobacterial activity of lichen substances, *Phytomedicine* 17 (2010) 328–332.
- [14] I.D. Karagoz, M. Ozaslan, I.H. Kilic, I. Guler, C. Uyar, D. Tuter, U. Kazanci, A. Aslan, A. Cakir, S. Gezici, Hepatoprotective effect of diffracta acid on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats, *Biotechnol. Biochem. Equip.* 29 (2015) 1011–1016.
- [15] L. Demir, B. Toğar, H. Türkçü, P. Sozio, A. Aslan, A. Di Stefano, The investigation of cytogenetic and oxidative effects of diffracta acid on human lymphocyte cultures, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 58 (2015) 75–81.
- [16] T. Higuchi, K.A. Connors, Phase-solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4 (1965) 212–217.
- [17] T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, Evaluation of cyclodextrin solubilization of drug, *Int. J. Pharm.* 302 (2005) 18–28.
- [18] C.V.N.S. Silva, M.S. Ferraz, N.K. Honda, M.C.B. Lira, N.S. Santos-Magalhães, N.P.S. Santos, Validation of an UV spectrophotometric method for determining diffracta acid from *Usnea* sp. in inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Lat. Am. J. Pharm.* 31 (2012) 120–124.
- [19] S.Y. Hao, L.F. Molnar, Y. Jung, J. Kussmann, C. Ochsenfeld, S.T. Brown, A.T.B. Gilbert, L.V. Slipchenko, S.V. Levchenko, D.P. O'Neill, R.A. DiSandro Jr., R.C. Lochan, T. Wang, G.J.O. Beran, N.A. Besley, J.M. Herbert, C.Y. Lin, T. van Voorhis, S.H. Chien, A. Sodt, R.P. Steele, V.A. Rassolov, P.E. Maslen, P.P. Korambath, R.D. Adamson, B. Austin, J. Baker, E.F.C. Byrd, H. Dachsel, R.J. Doerksen, A. Dreuw, B.D. Dunietz, A.D. Dutoi, T.R. Furlani, S.R. Gwaltney, A. Heyden, S. Hirata, C.P. Hsu, G. Kedziora, R.Z. Khaliullin, P. Klunzinger, A.M. Lee, M.S. Lee, W.Z. Liang, I. Lotan, N. Nair, B. Peters, E.I. Proynov, P.A. Pieniazek, Y.M. Rhee, J. Ritchie, E. Rosta, C.D. Sherrill, A.C. Simmons, J.E. Subotnik, H.L. Woodcock III, W. Zhang, A.T. Bell, A.K. Chakraborty, D.M. Chipman, F.J. Keil, A. Warshel, W.J. Hehre, H.F. Schaefer, J. Kong, A.I. Krylov, P.M.W. Gill, M. Head-Gordon, Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 3172–3191.
- [20] B.E. Loveland, T.G. Johns, L.R. Mackay, F. Vaillancourt, Z.X. Wang, P. Hertzog, Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays, *Biochem. Int.* 27 (1992) 501–510.
- [21] T. Kristmundsdóttir, E. Jónsdóttir, H.M. Ögmundsdóttir, K. Ingólfssdóttir, Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines, *Eur. J. Pharm. Sci.* 24 (2005) 539–543.
- [22] M.C.B. Lira, M.S. Ferraz, D.G.V.C. Silva, M.E. Cortes, K.J. Teixeira, N.P. Caetano, R.D. Sinisterra, G. Ponchel, N.S. Santos-Magalhães, Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 64 (2009) 215–224.
- [23] Y. Bayir, F. Odabasoglu, A. Cakir, A. Aslan, H. Suleyman, M. Halici, C. Kazzaz, The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffracta acid, *Phytomedicine* 13 (2006) 584–590.
- [24] K. Nakamishi, *Infrared Absorption Spectroscopy*, Practical, San Francisco, 1962.
- [25] J.C. Fonseca, Y.S. de Oliveira, B.P. Bezerra, J. Ellena, N.K. Honda, C.V.S. Silva, N.P.S. Santos, N.S. Santos-Magalhães, A.P. Ayala, Diffracta acid: crystalline structure and physicochemical characterization, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 165 (2016) 25–32.
- [26] E. Aicart, E. Junqueira, Complex formation between purine derivatives and cyclodextrins: a fluorescence spectroscopy study, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 47 (2003) 161–165.
- [27] P. Mura, G. Bertinetti, F. Melani, A. Manderoli, Interaction between naproxen and chemically modified β -cyclodextrins in the liquid and solid state, *Eur. J. Pharm. Sci.* 3 (1995) 347–355.
- [28] E.R. Balmayor, K. Tuzlakoglu, H.S. Azevedo, R.L. Reis, Preparation and characterization of starch-poly- ϵ -caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1035–1045.
- [29] A.M. Le Ray, S. Chiffolleau, P. Looss, G. Grimandi, A. Gouyette, G. Darulsi, C. Merle, Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility, *Biomaterials* 24 (2003) 443–449.
- [30] M.H. Pérez, C. Zinutti, A. Lamprecht, N. Ubrich, A. Astier, M. Hoffman, R. Bodmeier, P. Maincent, The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug, *J. Control. Release* 65 (2000) 429–438.
- [31] D.C. Bibby, N.M. Davies, L.G. Tucker, Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems, *Int. J. Pharm.* 197 (2000) 1–11.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento dos complexos de inclusão com o ácido gálico, bem como a formulação de lipossomas e microesferas contendo esse composto, demonstram que a nanotecnologia farmacêutica surge como uma alternativa para viabilizar a aplicação de fármacos que possuam baixa solubilidade e biodisponibilidade, além de outras limitações físico-químicas.

Diante dos resultados apresentados, verifica-se que foi possível comprovar que a encapsulação de ácido gálico em sistemas de liberação controlada é viável. Estes resultados demonstram ainda a importância de estudos futuros envolvendo o ácido gálico, uma vez que o composto apresenta diversas atividades biológicas comprovadas.

ANEXO A - ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 165 (2016) 26–32



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

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

Diffractaic acid: Crystalline structure and physicochemical characterization



Jéssica de Castro Fonseca ^a, Yara Santiago de Oliveira ^a, Beatriz P. Bezerra ^a, Javier Ellena ^b, Neli Kika Honda ^c, Camilla V.N.S. Silva ^d, Noemia Pereira da Silva Santos ^e, Nereide Stela Santos-Magalhães ^d, Alejandro Pedro Ayala ^{f,*}

^a Department of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^b São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

^c Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

^d Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asanai (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

^f Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2016

Received in revised form 6 April 2016

Accepted 8 April 2016

Available online 13 April 2016

ABSTRACT

Diffractaic acid (DA) is a secondary metabolite of lichens that belongs to the chemical class of depsides, and some relevant pharmacological properties are associated with this natural product, such as antioxidant, antitumorogenic and gastroprotective effects. Considering the relevant biological activities and taking into account that the activities are intrinsically related to the structure, the main goal of this study was to elucidate the structure of diffractaic acid by single crystal X-ray diffraction as well to characterize its physicochemical properties by powder X-ray diffraction, thermal analysis and vibrational spectroscopy. It was observed that DA belongs to the monoclinic crystal system, crystallizing in the space group $P2_1/c$ with the following cell parameters: $a = 18.535(7)$ Å, $b = 4.0439(18)$ Å, $c = 23.964(6)$ Å, $\beta = 91.55(3)^\circ$. The crystal packing is characterized by diffractaic acid dimers, which are reflected in the vibrational spectrum. These observations were supported by quantum mechanical calculations.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diffractaic acid (DA), 4-[(2,4-dimethoxy-3,6-dimethylbenzoyl)oxy]-2-hydroxy-3,6-dimethylbenzoic acid, belongs to the chemical class of depsides and can be found in some species of lichens, such as *Usnea* species, being one of the major metabolites [1]. Lichen metabolites exert a wide variety of biological actions, such as antibiotic and antimycobacterial [2]. However, their potential has not been fully explored [3,4]. The depsides are a class of lichen metabolites formed by condensation of two or more hydroxybenzoic acids whereby the carboxyl group of one molecule is esterified with a phenolic hydroxyl group of a second molecule. There are two different types of depsides, with either an orcinol moiety or a β -orcinol moiety, being DA a member of the last group [3,5]. DA was described in the literature [6] as a whitish pigment with needle-shaped crystals, melting at around 189–190 °C, molecular weight of 374 g/mol, easily dissolved in ether, ethanol, acetone and chloroform. The calculated LogP of DA is 5.48 ± 0.42 [2].

It has been documented that diffractaic acid has antimicrobial activity against *M. tuberculosis* H37Rv (MIC = 15.6 µg/mL, 41.7 µM), antioxidant [7], antitumorogenic and gastroprotective effects [1,8]. Recently, it

was showed that DA could be developed as an effective proapoptotic agent in various treatments of disorders [9]. An antiproliferative activity against UACC-62 (GI₅₀ = 25 µg/mL, 66 µM) and B16-F10 (GI₅₀ = 68 µg/mL, 198 µM) melanoma cell lines of DA was found [10]. Taking into account the relevant biological activities, especially the antiproliferative activity displayed by DA, it is imperative to solve its crystalline structure and analyze its physicochemical properties, once the structure is intrinsically related to the activity.

It is necessary to emphasize that in the best of our knowledge there are no reports of the crystalline structure of this molecule. Therefore, the present study was conducted in order to elucidate the crystalline structure by single crystal X-ray diffraction and to characterize its physicochemical properties by several experimental techniques, such as scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (IR) and Raman (RS) spectroscopies, powder X-ray diffraction (PXRD), thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC).

2. Materials and methods

2.1. Materials

DA was obtained from the talli of the lichen *Usnea subcavata* (Motyka), collected from the Cerrado biome in state of Mato Grosso do Sul, Midwest Brazil, as previously described [11]. Briefly, the talli of

* Corresponding author at: Department of Physics, Federal University of Ceará, P.O. Box 6030, 60440-970 Fortaleza, CE, Brazil.

E-mail address: ayala@fisica.ufc.br (A.P. Ayala).

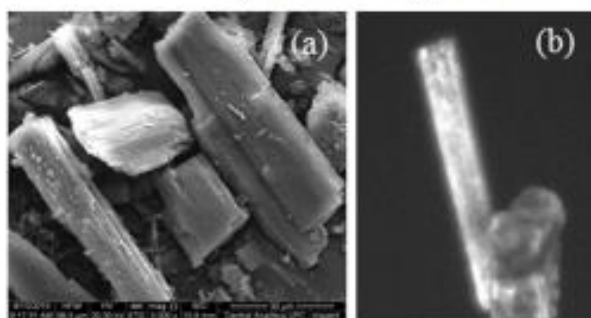


Fig. 1. (a) Scanning electron microscopy and (b) optical microscopy images of a DA samples showing its crystalline habit.

lichen was powdered and exhaustively extracted with chloroform and acetone at room temperature and concentrated in vacuum. Next, the extract was eluted with hexane-chloroform or hexane-acetone mixtures at crescent polarity using a silica gel chromatographic column, yielding DA. It was then purified with a small volume of acetone in an ice bath and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. This procedure was repeated until pure crystals of DA were obtained. The degree of purity of these crystals was >95% as determined by thin layer chromatography (TLC) and nuclear magnetic resonance (^1H NMR) analyses. Good quality single crystals obtained by this methodology were measured without further recrystallization.

2.2. Microscopy

To determine the morphology of DA, scanning electron microscopy images were acquired using an Inspect-550 FEI. The sample was previously metalized with 20 nm of gold (SEM Quanta-FEG450 FEI), and after that SEM Inspect-50 FEI equipment was used to record images with different magnifications (1500 $\times$ and 3000 $\times$).

2.3. Vibrational spectroscopy

Fourier transform infrared spectra were recorded in a Vertex 70 (Bruker Optics) spectrometer equipped with a DTGS detector, a Globar

Table 1
Crystal data, structure determination parameters and refinement statistics for DA.

Empirical formula	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_7$
Molecular weight/ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	374.37
Temperature/K	293(2)
Crystal system	Monoclinic
Space group	$P2_1/c$
a/ $\text{\AA}$	18.535(7)
b/ $\text{\AA}$	4.0439(18)
c/ $\text{\AA}$	23.964(6)
$\beta/^\circ$	91.55(3)
Volume/ $\text{\AA}^3$	1795.5(12)
Z/Z'	4/1
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^{-3}$	1.385
μ/mm^{-1}	0.105
F(000)	792.0
Crystal size/ mm^3	$0.5 \times 0.1 \times 0.1$
Radiation	$\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71073$)
2 θ range for data collection/ $^\circ$	5.486 to 52.762
Index ranges	$-22 \leq h \leq 22, -4 \leq k \leq 4, -29 \leq l \leq 29$
Reflections collected	5350
Independent reflections	3081 [$R_{\text{int}} = 0.0557, R_{\text{sigma}} = 0.0889$]
Data/restraints/parameters	3081/0/255
Goodness-of-fit on F^2	0.837
Final R indexes [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0508, wR_2 = 0.1199$
Final R indexes [all data]	$R_1 = 0.1196, wR_2 = 0.1399$
Largest diff. peak/hole/ $\text{e}\cdot\text{\AA}^{-3}$	0.18/−0.17

Table 2
Inter- and intra-molecular hydrogen-bonds interactions of DA.

Interaction	D...H ($\text{\AA}$)	D...A ($\text{\AA}$)	H...A ($\text{\AA}$)	H...A ($^\circ$)	Symmetry code
O10...O8	0.91 (3)	2.643 (3)	1.74 (3)	171 (3)	$1 = x, 1 = y, z = 2$
O10...O8	0.82	2.547 (3)	1.82	146	Intramolecular
O10...O4'	0.96	2.836 (3)	2.47	102	Intramolecular
O10...O2	0.96	2.875 (4)	2.47	105	Intramolecular
C1010...O4'	0.96	3.102 (4)	2.57	115	Intramolecular

source and a wide-range beam splitter. A single-reflection diamond attenuated total reflectance (ATR) accessory (Platinum, Bruker Optics). Fourier Transform Raman spectra were obtained using a RAM II accessory coupled to the FT-IR spectrometer. Samples were excited with a Nd:YAG laser (1064 nm) and the scattered radiation recorded with a Ge detector refrigerated with liquid nitrogen. Raman and IR spectra were obtained at a 2 cm^{-1} resolution.

2.4. Powder X-ray diffraction

Powder X-ray diffractograms were obtained using a D8 Advanced Bruker AXS, equipped with a theta/theta goniometer, operating in the Bragg-Brentano geometry with a fixed specimen holder, Cu K α (0.15419 nm) radiation source and a LynxEye detector. The voltage and electric current applied were 40 kV and 40 mA, respectively. The opening of the slit used for the beam incident on the sample was 0.6 mm. The sample was scanned within the scan range of $2\theta = 5^\circ$ to 45° continuous scan, with a scan rate of 2° min^{-1} .

2.5. Single crystal X-ray structure determination

Single-crystal X-ray diffraction data collection (φ scans and ω scans with κ offsets) were performed on an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer (95 mm CCD camera on κ -goniostat) using graphite-monochromated MoK α radiation (0.71073 $\text{\AA}$) at room temperature. The software COLLECT [12] and Denzo-Scalepack package of softwares [13] were applied for acquisition, indexing, integration and scaling of Bragg reflections. The final cell parameters were obtained using all reflections. No absorption correction was applied. The structure was solved using Olex2 [14], with the ShelXT [15] structure solution program using Direct Methods and refined with the ShelXL [16] refinement package using Least Squares minimization.

Hydrogen atoms were stereochemically positioned and refined with fixed individual displacement parameters [$\text{Uiso}(\text{H}) = 1.2\text{ Ueq}$ or 1.5 Ueq] according to the riding model (H bond lengths of 0.96 $\text{\AA}$ for methyl groups), except for the H hydrogen atoms were located on the difference Fourier maps. The one bonded to O2' was refined with fixed positions and isotropic thermal parameters ($\text{Uiso}(\text{H}) = 1.5\text{ Ueq}$ (O)). However, the one bonded to O9 was freely refined since it participated of a strong hydrogen bond. The programs MERCURY (version 3.6) [17] and ORTEP-3 [18] were used to calculate the theoretical powder diffraction pattern and to prepare the crystallographic information file (CIF) and artwork representations for publication. The CIF

Table 3
Angles between the planes defined by the carboxylate group CY and aromatic rings RI and RII of several depsides.

	RI - CY	RII - CY	RI - RII	CSD	Ref.
Diffractaic acid	66.55	51.88	20.77		This work
Attranorin	89.50	8.10	84.07	BOCMOV	[28]
Attranorin	65.69	6.61	60.38	BOCMOV01	[30]
Attranorin	76.30	7.62	82.73	BOCMOV02	[29]
	83.49	8.90	76.41		
Evernin	81.58	8.30	88.79	DIPCLIA10	[26]
Wrightinin	8.23	8.63	0.59	FAHDEX	[27]
Barbatin	59.26	14.95	74.04	KOHLEY	[26]
-	81.76	12.60	86.31	POVRUB	[32]

28

J. de Castro Fonseca et al. / Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 165 (2016) 26–32

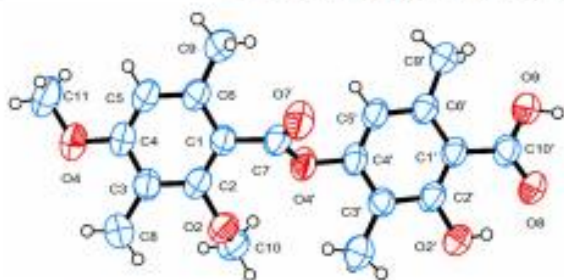


Fig. 2. ORTEP [31] type view of the asymmetric unit of pure DA. The hydrogen atoms are represented as arbitrary radius spheres and the ellipsoids are at 50% probability.

containing the diffractive acid crystalline structure was deposited at the Cambridge Structural Data Base under the code 1449856.

2.6. Thermal analysis

Thermogravimetric (TGA) and Differential scanning calorimetry (DSC) curves were obtained using a simultaneous thermal analysis equipment (Jupiter STA 449, Netzsch). An infrared spectrometer (Alpha, Bruker Optics) coupled to this system was used to analyze the gases released. The sample of around 2 mg was placed in sealed aluminum crucibles with pierced lids. Measurements were made from room temperature up to 350 °C using a heating rate of 10 °C/min. The sensors and the crucibles were under a constant flow of nitrogen (70 mL/min) during the experiment.

2.7. Quantum mechanical calculations

The electronic structure and optimized geometry were computed within density functional theory using Gaussian 09 [19], employing the hybrid of Becke's nonlocal three parameter exchange functional and Lee–Yang–Parr correlation functional (B3LYP) [20–22] and the 6–31++G(d,p) basis set. Raman scattering and infrared absorption cross sections were calculated after geometrical optimization using the same functional. Raman spectra were simulated by convolving the scattering cross section with a Lorentzian profile and considering the thermal distribution of vibrational modes [23,24]. The potential energy distribution was calculated using the code VEDA [25].

3. Results and discussion

DA crystals exhibit a columnar crystalline habit, as observed in SEM micrographs (Fig. 1). It crystallizes in the monoclinic centrosymmetric space group $P2_1/c$ with one molecule per unit cell and cell parameters: $a = 18.535$ Å; $b = 4.0439$ Å; $c = 23.964$ Å; $\beta = 91.55^\circ$ (Table 1). The molecular configuration of depsides is defined by three planes, one

containing the carboxylate group (CY: atoms C7, O7 and O4'), one through the aromatic rings I (RI: atoms C1' to C6') and the last one through the aromatic ring II (RII: atoms C1 to C6) [26]. In the case of DA, the aromatic rings are almost coplanar forming an angle of 20.81° (Fig. 2). These groups form an angle of 66.55° and 51.88° , respectively for RI and RII, with the carboxylic group. This conformation is stabilized by three intermolecular hydrogen bonds (Table 2). However, it shows some interesting features when compared with other members of the depside family. Considering the reported structures (Table 3), in most of the depsides, RII is almost coplanar with the CY moiety, as observed in everin [26], wrightiin [27] and the three polymorphs of atranorin [28–30]. In these compounds, this conformation is stabilized by an intramolecular hydrogen bond between the carbonyl (C7O7) and the hydroxyl (C2O2H) groups. In the case of DA, the oxygen atom placed at O2 is methylated and the hydrogen bond is not only shifted to the methyl group, but also involves the single bonded oxygen from the ester instead of the one of the carbonyl moiety (C10H10B–O4'). This bond favors a higher twist of CY group when compared to the RII. In most of the cases, RI is nearly perpendicular to CY, and consequently to RII. An interesting exception is wrightiin [27], where the main groups of the depside molecule are approximately coplanar. Compared with other members of this family, DA shows the smaller angle between the two rings. In summary, depside molecules are characterized by common features determining similar conformations. DA, on the other hand, exhibit an uneven geometry since the O2 methylation suppress one of the main intramolecular hydrogen bonds.

The crystal packing of DA is determined by a dimer based on the COOH moiety. The $R_2^2(8)$ motifs (Fig. 3) assembled via complementary O9H9–O8 hydrogen bonds between the DA molecules around an inversion center. These dimers lay aligned along the [101] and stacked along the b axis by a single C10H10B–O2 (2.692 Å) interaction and a bifurcated one: C5'H5'–O7 (2.987 Å) and C9H9B–O7 (2.958 Å). This is the only member of the para-depsides family with such a hydrogen bond pattern, because in most of these compounds a methylated C10'O9 group inhibits the formation of the $R_2^2(8)$ motif. Furthermore, when O2 is forming a hydroxyl group, it plays an important role in the intermolecular hydrogen bonds, being usually one of the dominant interactions, as in the case of the three polymorphs of atranorin [28–30].

The interatomic distances, bond and torsion angles of DA were analyzed by using the program Mogul [33]. The analysis shows that the experimental values are consistent with those expected for a good refinement of the structures with good quality. However, some geometric characteristics showed interesting deviations. The main results of this analysis are shown in Table 4 (see Fig. S1). The first two bond length deviation involve the charge density depletion on the CCE' bond length and the consequently increase in the electron density on the C1'–C10' bond which in turn seems to be the consequence of a charge transfer due to the strong intermolecular interaction that form the homodimer. The third one is related to the electron charge density redistribution that reduces the C7O7 double bond involved in a bifurcated intermolecular

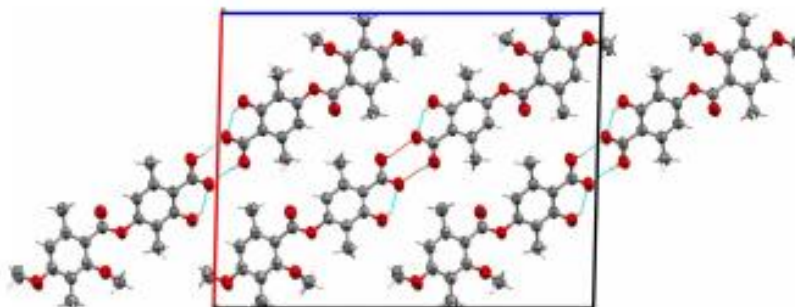


Fig. 3. a–c projection of the DA crystalline packing.

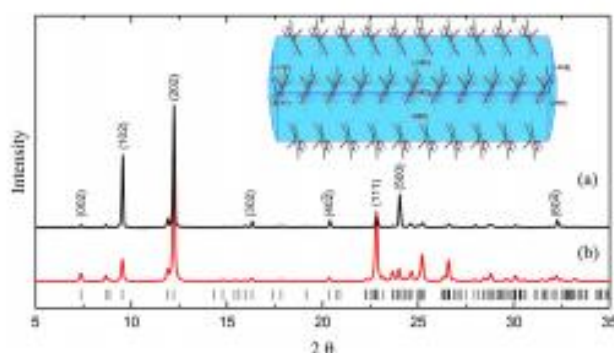


Fig. 4. X-ray diffraction of DA: (a) Experimental (b) calculated. The predicted crystal habit is shown in the inset.

interaction that connect the dimers. Three of the bond angles destinations are also related to the already mentioned intramolecular electron density redistribution of the substituted RI. The first torsion angle deviation shows a big spread, being an indication of the preferences of RI1 and CY to be coplanar. The second torsion angle deviations show that the preferred conformation for the COOH moiety would be almost perpendicular to the RI plane. Not just the complementary O9H9–O8 hydrogen bond through the inversion center but also the strong O'2H2'–O8 intramolecular hydrogen bond fix the current molecular conformation.

Fig. 4 shows the powder diffraction pattern of DA compared with the calculated one obtained from the crystalline structure determined by single crystal X-ray diffraction, using the software MERCURY [17] to calculate the theoretical powder pattern. There is a good agreement between these patterns, evidencing a small preferred orientation perpendicular to the (010) direction. Thus, (h0l) reflections exhibit a slightly higher intensity when compared with the calculated pattern. The crystalline habit was predicted using the Bravais, Friedel, Donnay and Harker (BFDH) method [34–36] using Mercury [17] (Fig. 4)

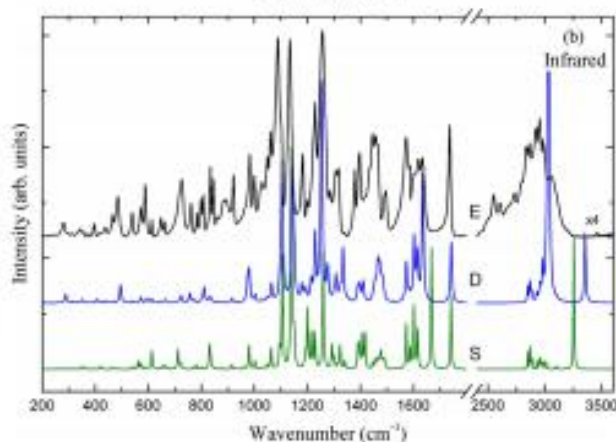
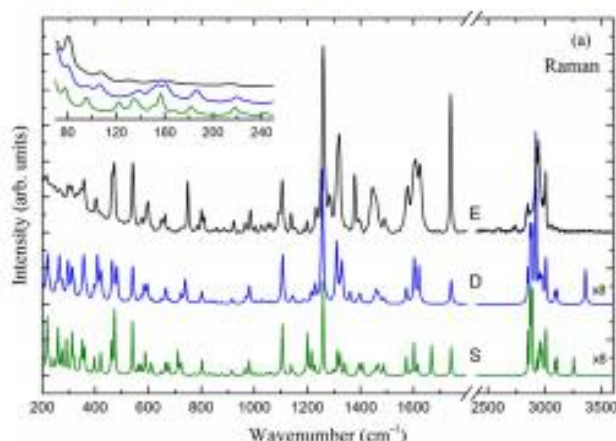


Fig. 6. Raman and infrared spectra of DA: (E) experimental, calculated from the (D) dimer and (S) single molecule.

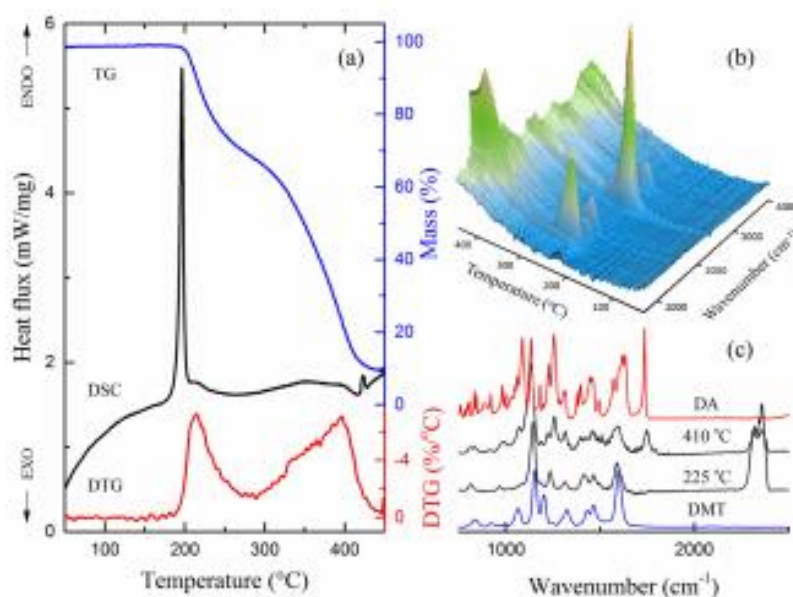


Fig. 5. (a) Thermogravimetry (TG), its first derivative (DTG) and differential scanning calorimetry (DSC) curves of DA. (b) Infrared spectra of the evolved gases, (c) Selected infrared spectra from evolved gases and reference compounds.

showing that DA crystals growth along the (010), which is compatible with the observed crystalline habit (Fig. 1) and the apparent preferential orientation of the powder pattern. Thus, this result confirms that the determined crystalline structure is representative from the raw material.

The thermal behavior of DA can be observed in the TG/DTG and DSC curves given in Fig. 5a. The DSC curve shows one well-defined endothermic event at 191.8 °C which can be associated to the melting point of diffracta acid. It is interesting to notice that DA exhibits a quite high melting point which is consistent with the strong hydrogen bonds stabilizing the crystalline structure and its low solubility.

The first mass loss event ($T_{\text{onset}} = 201$ °C) is observed just above the DSC peak and ascribed to the fusion. In fact, a detailed analysis of the DSC curve allows us to identify a small shoulder after the melting event with onset around 200 °C, which correlates very well with the TG result as it is corroborated by the first derivative of the TG curve. Thus, it is possible to conclude that DA decomposes just after melting with a mass loss of approximately 31.5% between 200 and 280 °C. A second event corresponds to another decomposition process between 280 and 450 °C ($\Delta m \sim 58.2\%$). The evolved gases were analyzed by transmission infrared spectroscopy as shown in Fig. 5b. From these results, it was possible to have an insight into the degradation process. The IR of the released gases (Fig. 5c) at the first mass loss event are characterized by strong band at 2359 cm^{-1} undoubtedly associated with carbon dioxide, but another component with characteristic bands at 1140, 1594 and 2942 cm^{-1} seems to be closely related to 2,6-dimethoxytoluene

(DMT). This result suggests that the first decomposition process is related to the loss of the RII moiety. The IR spectra also shows that, at the second decomposition event, there is a small release of carbon dioxide, combined with an unknown compound. In this spectrum, it is possible to identify a carbonyl stretching (1746 cm^{-1}), CC stretchings ($\sim 1590\text{ cm}^{-1}$) and CH stretching from methine ($>3000\text{ cm}^{-1}$) and methyl ($<3000\text{ cm}^{-1}$), suggesting that the released gas is related to a derivative of the RI group (2-hydroxy-3,6-dimethylbenzoic acid). In fact, most of the bands observed in this spectrum are closely related to those of the DA (Fig. 5c), providing additional support to the proposed decomposition mechanism.

Vibrational spectroscopy has been successfully applied to the study of active pharmaceutical ingredients [37,38] providing valuable information about the molecular conformation and intermolecular interactions. Considering the potential of these methods, Raman and IR spectra of DA are presented in Fig. 6. Quantum mechanical calculations were also performed in order to provide a more precise classification of the vibrational bands. A single molecule of DA was geometrically optimized and its vibrational spectrum calculated. The final geometry overlaps exhibit some torsional differences with the experimental one (Fig. S2) mostly based on the relative orientation of the RI and RII rings. The crystalline structure shows almost coplanar rings forming and 20.77° angle. On the other hand, in the calculated conformation the aromatic rings are twisted by 59.6° . This difference is originated in the bifurcated interaction involving O7 (C5'H5'-O7 and C9'H9B-O7) stabilizing the DA dimers along the *b* axis, linking

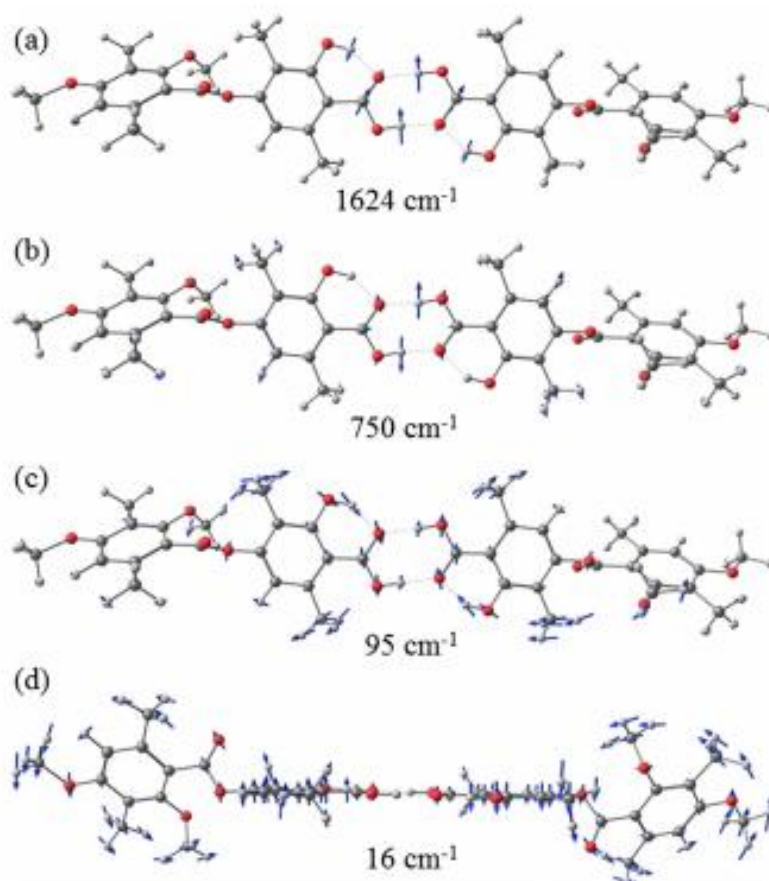


Fig. 7. Displacement vectors of selected vibrational modes obtained from the calculations of the DA dimer.

Table 4
Major differences in bond lengths (Å) and valence angles (°) DA obtained using the MOGUL [33].

Bond	Statistics total	Mean	Median	Standard deviation	z-Score	Value in query
C1' C6'	4508	1.402	1.402	0.014	2.199	1.433
C1' C10'	783	1.502	1.505	0.026	1.485	1.464
O7 C7	14,230	1.224	1.224	0.027	1.230	1.190
Angle	Statistics total	Mean	Median	Standard deviation	z-Score	Value in query
C9' C6' C1'	3954	121.755	121.583	1.261	2.479	124.882
O9 C10' O8	11,400	123.349	123.455	2.295	1.574	119.737
C8 C3 C2	1523	121.195	121.289	1.700	1.474	123.701
O2' C2' C3'	577	118.128	117.529	2.707	1.455	114.188
Torsion angle	Statistics total	Minimum	Maximum		d (min)	Value in query
O4' C7 C1 C2	637	0.098	180.000		0.682	50.219
O8 C10' C1' C6'	813	1.408	179.906		0.304	177.586

both rings with a single oxygen and rotating them towards to a nearly coplanar conformation.

The scaled Raman and infrared spectra calculated based on this conformation are also shown in Fig. 6, whereas vibrational mode assignment and the potential energy distribution are listed in the Supplementary material (Table S1). There is a good agreement between these spectra. Some of the key bands for this comparison are the carbonyl stretching modes, which are expected around 1700 cm^{-1} . Two of these modes should be observed, related to the carbonyl moieties of the CY and RI groups. According to the calculations, the higher wavenumber CO stretching is related to the carbonyl group from the CY chain. The corresponding wavenumber (1739 cm^{-1}) is well described by the scaled spectra. These results could be expected since the CY oxygen is not involved in hydrogen bonds. Vibrational modes of atoms participating in hydrogen bonds are strongly affected by this interaction. Usually, stretching modes are shifted towards lower wavenumbers, whereas deformation modes exhibit higher energies. On the other hand, the second carbonyl band of DA placed in the same spectral region in the free molecule calculations (1668 cm^{-1}) is not observed in the same region in the solid state. This is because C10'O8 participates in the strongest hydrogen bond of the DA structure and a redshift of the stretching bands should be observed. In order to take into account part of the intermolecular interactions a second calculation was performed on the DA dimer. The corresponding scaled Raman and infrared spectra of the calculated dimer are also presented in Fig. 6. When the dimer is considered in the calculations, there is a remarkable improvement in the agreement between the calculated and experimental spectra. According to the calculations, the C10'O8 is shifted 50 cm^{-1} towards lower wavenumbers to 1624 cm^{-1} and it is coupled to the CC stretching modes of the aromatic rings (Fig. 7a). The redshift effect is stronger in the case of the O9H stretching, which is shifted down to 3055 cm^{-1} . Even though, this mode appears as a very intense mode in the calculated IR spectrum, it is observed as a wide shoulder in the experimental result. A detailed comparison of the experimental and calculated spectra shows subtle differences which emphasize the effect of the hydrogen bonds. The modes lying between 1330 and 1400 cm^{-1} , which are mainly related to bending modes of the OH groups associated to the hydrogen bonds. At 750 cm^{-1} , the bending of the CO group is shifted towards higher wavenumber due to the hydrogen bond (Fig. 7b). A well-defined doublet mainly associated to the in-phase and out-of-phase rocking of the carbonyl moiety is observed at 470 cm^{-1} in the calculated spectra, but those bands are highly overlapped in the experimental one.

The low wavenumber region (below 200 cm^{-1}) is usually ascribed to the lattice modes [39,40]. However, it is interesting to compare the experimental and calculated spectra of the single molecule and the dimer presented in the inset of Fig. 6a. First, notice that there is a good agreement between experimental and calculated results. As expected, the dimer reproduces better the experimental data, but most of the

bands of the single molecule are also observed. For example, the bands at 70 and 80 cm^{-1} can be described as torsion of the molecular skeleton. On the other hand, the most intense bands between 100 and 200 cm^{-1} are characterized by the rocking of the methyl groups. The bands at 95 (Fig. 7c) and 106 cm^{-1} are distinctive of the dimer and are related to the rocking of the RI ring and the out of plane bending of the carboxylic group. As atoms involved in the main intermolecular interaction participate of these vibrational modes, they are better described in the dimer than in the single molecule, where they are observed at 61 and 94 cm^{-1} , respectively. Despite the fact these modes are reflecting the crystal packing, they cannot be strictly classified as lattice vibrations because they are local conformational deformations. Further analysis of the theoretical spectra shows that lattice-like modes should be observed at lower wavenumbers. For example, three translational-like modes associated to a stretching of the hydrogen bond with all the atoms of each molecule moving on the same direction are observed at 42 , 54 and 55 cm^{-1} , whereas three librational-like modes are identified at 16 , 18 and 22 cm^{-1} (Fig. 7d). Thus, lattice modes should not be generically described by a spectral region because other vibrations involving a large number of atoms (large amount of mass) will also be observed at low wavenumbers. Skeleton torsions are a good example of this kind of molecular modes. The whole molecule will participate in lattice modes, which combined with relatively weak intermolecular interactions (force constant) will shift these modes to even lower wavenumbers, which are not usually observed with conventional spectrometers.

4. Conclusion

The crystalline structure of diffractaic acid was successfully determined. It consists of diffractaic acid homomeric dimers linked by complementary O9H9–O8 hydrogen bonds. It was also observed a quite high melting point (197 °C) followed by its decomposition (203 °C). The vibrational spectra was assigned based on quantum mechanical calculations evidencing the intermolecular interactions observed in the crystalline structure.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the financial support of CNPq, FUNCAP, CAPES and FAPESP, and the collaboration agreement of Central Analítica – UFC/CT-INFRA/Pro-Equipamentos CAPES.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2016.04.030>.

References

- [1] Y. Bayir, F. Odabasoglu, A. Cakir, A. Aslan, H. Suleyman, M. Halici, C. Kanaz, The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffracta acid, *Phytomedicine* 13 (2006) 584–590.
- [2] N.K. Honda, F.R. Pavan, R.G. Coelho, S.R. de Andrade Leite, A.C. Micheletti, T.L.B. Lopes, M.Y. Misusu, A. Beatriz, R.L. Brum, C.Q.F. Leite, Antimicrobial activity of lichen substances, *Phytomedicine* 17 (2010) 328–332.
- [3] K. Müller, Pharmacologically relevant metabolites from lichens, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 9–16.
- [4] B.S. Prateeksha, R. Paliya, V. Bajpai, J. Jadaun, S. Kumar, D.K. Kumar, B.R. Upreti, S. Singh, Y. Nayaka, B.N. Joshi, Singh, The genus *Usnea*: a potent phytomedicine with multifarious ethnobotany, phytochemistry and pharmacology, *RSC Adv.* 6 (2016) 21672–21696.
- [5] Y. Asahina, S. Shibata, Chemistry of Lichens Japan Society from the Promotion of Science 1954.
- [6] S. Huneck, I. Yoshimura, Identification of Lichen Substances, Springer, New York, 1996.
- [7] N.K. Honda, T.L.B. Lopes, R.C.S. Costa, R.G. Coelho, N.C. Yoshida, C.R. Rivarola, M.P. Marcelli, A.A. Spielmann, Radical-Scavenging Potential of Phenolic Compounds From Brazilian Lichens, *Orbital – The Electronic Journal of Chemistry*, 72015.
- [8] L.D. Karagoz, M. Ozaslan, I. Güler, C. Uyar, T. Yalim, U. Kazanci, A. Aslan, A. Cakir, In vivo antitumoral effect of diffracta acid from lichen metabolites on Swiss albino mice with Ehrlich ascites carcinoma: an experimental study, *Int. J. Pharmacol.* 10 (2014) 307–314.
- [9] F. Odabasoglu, O.S. Yildirim, H. Aygun, Z. Halici, M. Halici, F. Erdogan, E. Cadirci, A. Cakir, Z. Okumus, B. Akasakal, A. Aslan, D. Unal, V. Bayir, Diffracta acid, a novel proapoptotic agent, induces with olive oil both apoptosis and antioxidative systems in Ti-implanted rabbits, *Eur. J. Pharmacol.* 674 (2012) 171–178.
- [10] L.F.G. Brandão, G.B. Alcantara, M.d.F.C. Maros, D. Bogo, D.d.S. Freitas, N.M. Oyama, N.K. Honda, Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells, *Chem. Pharm. Bull.* 61 (2013) 176–183.
- [11] N.K. Honda, F.R. Pavan, R.G. Coelho, S.R. de Andrade Leite, A.C. Micheletti, T.L. Lopes, M.Y. Misusu, A. Beatriz, R.L. Brum, C.Q. Leite, Antimicrobial activity of lichen substances, *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine* 17 (2010) 328–332.
- [12] R.W.W. Hooft, in: B.V. Nonius (Ed.), COLLECT, 1998 (Delft, The Netherlands).
- [13] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, 1997 307–326.
- [14] O.V. Dolomanov, L.J. Bourhis, R.J. Gildea, J.A.K. Howard, H. Puschmann, OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program, *J. Appl. Crystallogr.* 42 (2009) 339–341.
- [15] G.M. Sheldrick, Crystal structure refinement with SHELXL, *Acta Crystallogr. C Struct. Chem.* 71 (2015) 3–8.
- [16] G.M. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Crystallogr. Sect. A* 64 (2008) 112–122.
- [17] C.F. Macrae, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G.P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. van de Streek, Mercury: visualization and analysis of crystal structures, *J. Appl. Crystallogr.* 39 (2006) 453–457.
- [18] L. Farrugia, ORTEP-3 for Windows – A Version of ORTEP-III With a Graphical User Interface (GUI), 1997 565–565.
- [19] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.R. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N.J. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Comperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, 2009.
- [20] A.D. Becke, Density-Functional Thermochemistry. 3. The Role of Exact Exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [21] C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785–789.
- [22] R.G. Parr, W. Yang, Density Functional Theory of Atoms and Molecules, Oxford University Press, New York, 1989.
- [23] S. Mishra, D. Chaturvedi, P. Tandon, V.P. Gupta, A.P. Ayala, S.B.B. Honorato, H.W. Siesler, Molecular structure and vibrational spectroscopic investigation of secnidazole using density functional theory, *J. Phys. Chem. A* 113 (2009) 273–281.
- [24] P.J. Polavarapu, Abinitio vibrational Raman and Raman optical-activity spectra, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 8106–8112.
- [25] M.H. Jarráz, Vibrational energy distribution analysis (VEDA): scopes and limitations, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 114 (2013) 220–230.
- [26] H. Soedki-Evans, D. Blaser, Structure of the methyl esters of barbaric and evenic acids: natural para-depsides, *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* 47 (1991) 2620–2624.
- [27] W.S.G. Maass, A.W. Hanson, Wrightlin, a new chlorinated depside from *Eriodermis wrightii* Tuck (Ascolichenes), *Z. Naturforsch.* B 41 (1986) 1589–1592.
- [28] C. Brassy, B. Bachet, B. Bodo, D. Molho, Structure de l'atranorine, *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* 38 (1982) 3126–3128.
- [29] J.C.G. Galindo, R. Petersheim, F.A. Macias, F.R. Fronczek, in, 2009.
- [30] Y.-H. Liu, S.L. Robbs, F.R. Fronczek, S.F. Watkins, N.H. Fischer, A new polymorph of atranorin, a lichen paradeside, *Acta Crystallogr. Sect. E: Struct. Rep. Online* 58 (2002) 0877–0878.
- [31] L. Farrugia, ORTEP-3 for Windows – a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI), *J. Appl. Crystallogr.* (1997) 565.
- [32] K. Chantapromma, R. Sortinuk, S. Chantapromma, C. Ponglimanont, H.K. Fun, K. Chinnakali, Methyl 2,6-dihydroxy-4-(2-hydroxy-4,6-dimethoxy-3-methylbenzoyloxy)-3-methylbenzoate, *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* 54 (1998) 1494–1496.
- [33] L.J. Bruno, J.C. Cole, M. Kessler, J. Luo, W.D.S. Motherwell, L.H. Purkis, B.R. Smith, R. Taylor, Retrieval of crystallographically-derived molecular geometry information, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44 (2004) 2133–2144.
- [34] A. Bravais, Éléments de Cristallographie, Gauthier-Villars, 1866.
- [35] J.D.H. Donnay, D. Harker, A new law of crystal morphology extending the law of Bravais, *Am. Mineral.* 22 (1937) 446–446.
- [36] M.G. Freidel, Etudes sur la loi de Bravais, *Bull. Soc. Franc. Miner.* 9 (1907) 326–326.
- [37] A.P. Ayala, H.W. Siesler, R. Boese, G.G. Hoffmann, G.J. Polla, D.R. Vega, Solid state characterization of olanzapine polymorphs using vibrational spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 326 (2006) 69–79.
- [38] G.J. Polla, D.R. Vega, H. Lanza, D.G. Tombari, R. Baggio, A.P. Ayala, J.M. Filho, D. Fernández, G. Leyva, G. Dartay, A.G. Leyva, Thermal behaviour and stability in olanzapine, *Int. J. Pharm.* 301 (2005) 33–40.
- [39] A.P. Ayala, Polymorphism in drugs investigated by low wavenumber Raman scattering, *Vib. Spectrosc.* 45 (2007) 112–116.
- [40] A.P. Ayala, M.W.C. Caetano, S.B.B. Honorato, J. Mendes-Filho, H.W. Siesler, S.N. Faudone, S.L. Cuffini, F.T. Martins, C.C.P. da Silva, J. Elena, J.M. Filho, C.C.P. Silva, Conformational polymorphism of the antidiabetic drug chlorpropamide, *J. Raman Spectrosc.* 43 (2012) 263–272.



Validation of an UV Spectrophotometric Method for Determining Diffractaic Acid from *Usnea sp.* in Inclusion Complexes with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin

Camilla V.N.S. SILVA ^{1,2}, Milena S. FERRAZ ³, Neli K. HONDA ², Mariane C.B. LIRA ^{1,2},
Nereide S. SANTOS-MAGALHÃES ^{3*} & Noemia P.S. SANTOS ^{1,3}

¹ Laboratório de Biotecnologia e Fármacos • Centro Acadêmico de Vitória/UFPE,
Vitória de Santo Antão, CEP 55.608-680, PE, Brazil

² Laboratório de Química de Produtos Naturais • Departamento de Química/UFMS,
Campo Grande, CEP 79074-460, MS, Brazil

³ Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)/UFPE, Recife, CEP 50670-901, PE, Brazil

SUMMARY. Diffractaic acid (DA) presents several biological activities. The goal of this study was to develop and validate a UV spectrophotometric method for determining diffractaic acid in inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Validation parameters were determined according to international guidelines for standardization. The linearity range of analytical curve was from 1 to 5 $\mu\text{g/mL}$ and the regression equation: $C_{DA} = (\text{Area} - 0.0053)/0.1541$ ($r^2 = 0.99998$; $n = 3$). The intermediate precision indicated that the difference between the means was statistically insignificant ($p < 0.05$). Accuracy revealed a mean recovery percentage of diffractaic acid in inclusion complexes of 100.1 %. The method was robust and the formulation excipients did not interfere on diffractaic acid quantification. Limits of detection and quantification of diffractaic acid were 0.03 and 0.08 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The proposed method proved to be accurate, precise and reproducible, thus being able to quantify diffractaic acid in raw material and inclusion complexes.

KEY WORDS: Diffractaic acid, Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Inclusion complex, Validation method.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: nsm@ufpe.br

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55-81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55-81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 02 de junho de 2016.

Ofício nº 49/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Noemia Pereira da Silva Santos**

Núcleo de Biologia

Centro Acadêmico de Vitória

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.034718/2015-14

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Desenvolvimento e caracterização de lipossomas e microesferas contendo ácido gálico complexado a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e avaliação da atividade antitumoral e antiulcerogênica**".

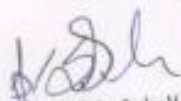
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição e Biotério do LIKA/UFPE; Animais: Ratos Wistar; 50-60 dias; Peso: 200-300g; Sexo: machos; Camundongos Swiss; 35-60 dias; Peso: 200-300g; Sexo: machos; Nº total de animais: 120 (80 ratos e 40 camundongos).

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SUAPE 1801584