



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

LAÍS DE MACÊDO FERREIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS FURTIVOS CONTENDO ÁCIDO
GÁLICO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Recife

2017

LAIS DE MACÊDO FERREIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS FURTIVOS CONTENDO ÁCIDO
GÁLICO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia (PPGBF), na área de concentração de nanotecnologia, na Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Paz Carvalho da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, Laís de Macêdo Ferreira dos

Desenvolvimento de lipossomas furtivos contendo ácido gálico e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência / Laís de Macêdo Ferreira dos Santos. – Recife: O Autor, 2017.

83 f.: il.

Orientadora: Maria da Paz Carvalho da Silva, Nereide Stela Santos Magalhães
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2017.

Inclui referências

1. Fenóis I. Silva, Maria da Paz Carvalho da (orient.) II. Magalhães, Nereide Stela Santos (coorient.) III. Título.

547.632

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-183

LAIS DE MACÊDO FERREIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS FURTIVOS CONTENDO ÁCIDO
GÁLICO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia (PPGBF), na área de concentração de nanotecnologia, na Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre.

Aprovada em: 27 / 02 / 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dr. Maria da Paz Carvalho da Silva/UFPE
Presidente

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia/UFPE

Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira/UFPE

Dedico este trabalho:
Aos meus pais, Renato e Suely, pela prioridade e dedicação
que sempre dispuseram aos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, por estar sempre em meus caminhos, mesmo atribulados, revelando seus belos planos em minha vida. Sem a paz interior e discernimento que minha fé me proporciona, não seria capaz de concluir essa jornada.

Aos meus pais, Renato e Suely, pelo amor e apoio incondicional em tudo que faço. E principalmente, por não medirem esforços em me proporcionar as melhores condições de estudo, na medida de suas limitações.

A minha irmã e minha sobrinha, pelo carinho e alegria de revê-las nos finais de semana.

A minha avó, Dona Carminha, exemplo de bondade, força e fé. Obrigada pelos abraços e sorrisos calorosos todas as vezes que pude revê-la nesses últimos meses.

A meu noivo, obrigada por não permitir que a tristeza nos momentos complicados dessa jornada me fizesse desistir. Com o seu apoio continuei acreditando e batalhando para que tudo desse certo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria da Paz, a qual tenho uma enorme afeição. Grata pelo seu apoio, preocupação e amizade.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Nereide Magalhães, por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos, correções contundentes, pela competência científica e acompanhamento do trabalho.

Aos professores que me auxiliaram com diversos níveis de comprometimento e em diferentes etapas do mestrado. Em especial, ao Prof. Dr. Nicácio e a Profa. Dra. Noemia Santos, grata pela amizade, preocupação e apoio.

A Dra. Milena Ferraz, obrigada por me “apadrinhar” nestas últimas etapas. Uma convivência repleta de aprendizagens, acompanhada por críticas contundentes sempre embasadas no meu crescimento como pesquisadora. Desejo muito sucesso profissional, tenho certeza que logo mais estará conquistando seu espaço e espalhando sua generosidade.

A Victor Passos, o meu IC favorito. MUITÍSSIMO obrigada pela amizade, conhecimentos compartilhados, paciência, cooperação e apoio. Um futuro farmacêutico e pesquisador que com certeza terá uma carreira brilhante. Sou sua fã.

A Camilla Vila Nova, pela paciência e tranquilidade em meio a minha agitação. Desculpe pelos apanchos, vamos seguir com futuras publicações.

A melhor e mais alegre turma do curso de extensão em Bioquímica da UFPE. Com eles, deu-se início a toda essa jornada, durante todo mestrado faziam de nossos encontros estímulos para continuarmos a luta. Em especial, a Carol, Bruna, Cleópatra, Amanda e o Tiago. Amigos para toda vida.

A Jéssica e mais uma vez Tiago, pelo apoio e elogios que paralelos aos meus sentimentos de incapacidade, por vezes me deram força para acreditar que seria capaz.

Aos componentes do grupo SLC, pelos ensinamentos, apoio e companheirismo. Desejo sucesso e muitas publicações.

Aos professores da banca examinadora por terem aceitado estar presente na defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Ao LIKA por disponibilizar sua infraestrutura.

Aos órgãos de fomento, CNPQ e FACEPE, pelo apoio financeiro.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

O ácido gálico, ácido 3,4,5-tridróxi-benzóico, é uma substância fenólica, que sofre oxidação na presença de luz, oxigênio, em meio alcalino e em altas temperaturas. Apresenta uma variedade de atividades terapêuticas, entre elas, antioxidante e antitumoral, que podem ser comprometidas devido a instabilidade da molécula. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar lipossomas furtivos como veículo carreador para o ácido gálico e validar um método analítico de cromatografia de alta eficiência (CLAE) para determinação de ácido gálico nos nanossistemas. Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e caracterizados através da determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta. O sistema cromatográfico teve como fase estacionária uma coluna de fase reversa C_{18} , a fase móvel foi composta por ácido acético a 1% e acetonitrila em diferentes proporções (60:40 a 90:10 v/v) e fluxo de 1 mL/min a 25 °C e detecção em 272 nm. Os parâmetros de validação do método CLAE, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação foram determinados segundo diretrizes internacionais de padronização. Lipossomas furtivos nanométricos com tamanho médio das vesículas de $84,5 \pm 1,9$ nm, PDI = 0,224, pH = 6,8 e potencial zeta = $-33,4 \pm 0,15$ mV foram obtidos. A encapsulação do ácido gálico nos lipossomas não alterou suas propriedades físico-químicas: tamanho médio das vesículas de $81,9 \pm 0,4$ nm, PDI=0,235, pH=6,6 e potencial zeta = $-30,0 \pm 1,40$ mV. O método analítico desenvolvido apresentou tempo de retenção de 2,65 min, fator de cauda de 1,33, altura equivalente do prato teórico (HEPT) de 0,12, além de pratos teóricos acima de 2000. A faixa de linearidade da curva analítica do ácido gálico foi de 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ajustada pela seguinte equação de regressão: Área do pico = $1,102 \times [\text{AG}]$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) - 0,203; $r = 0,9997$. A repetibilidade (coeficiente de variação) do método foi 2,83% e a precisão intermediária indicou que a diferença entre as médias foi estatisticamente insignificante ($p < 0,05$). O método foi robusto com a variação de temperatura e fluxo. Os limites de detecção e quantificação do ácido gálico foram de 1,49 e 4,53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A exatidão revelou uma recuperação média do analito de 100,9 %. O doseamento e a eficiência de encapsulação do ácido gálico nos lipossomas foi de $99,30 \pm 1,56\%$ e $92,72 \pm 0,16\%$, respectivamente. O método proposto é exato, preciso e reprodutível, sendo capaz de quantificar o ácido gálico em preparações lipossomais.

Palavras chaves: Ácido gálico. Lipossomas furtivos. Caracterização de lipossomas. CLAE.

Validação.

ABSTRACT

Gallic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, is a phenolic substance that undergoes oxidation in the presence of light, oxygen, alkali and high temperatures. Presents a variety of therapeutic activities, including antioxidant and anti-tumor, these activities may be compromised due to molecule's instability. The aim of this study was to develop and characterize stealth liposomes as carrier vehicles for gallic acid (GA) and validate an analytical method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the determination of gallic acid in nanosystems. Liposomes were prepared by hydration of lipid film method and characterized by determining the particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential. The chromatographic system had a C18 column in reverse phase as the stationary phase, mobile phase consisted of 1% acetic acid and acetonitrile in different ratios (60:40 to 90:10 v / v) and flow rate of 1 mL/min at 25°C and detection at 272 nm. Validation parameters of the HPLC method, linearity, precision, accuracy, robustness, limits of detection and quantification were determined according to international guidelines for standardization. Nanosized stealth liposomes vesicles with an average size of $84.5 \text{ nm} \pm 1.9$, PDI = 0.224, pH = 6.8 and zeta potential = $-33.4 \pm 0.15 \text{ mV}$ were obtained. Gallic acid encapsulation in liposomes did not alter their physico-chemical properties: average vesicle size of $81.9 \text{ nm} \pm 0.4$, PDI = 0.235, pH = 6.6 and zeta potential = $-30.0 \text{ mV} \pm 1.40$. The developed analytical method showed a retention time of 2.65 min, tailing factor of 1.33, height equivalent to a theoretical plate (HETP) of 0.12 and theoretical plates above 2000. The linearity range of gallic acid calibration curve was from 10 to $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, adjusted by the following regression equation: Peak area = $1.102 \times [\text{GA}] (\text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}) - 0.203$, $r = 0.9997$. The repeatability (coefficient of variation) of the method was 2.83% and intermediate precision indicated that the difference between the means was statistically insignificant ($p < 0.05$). The method was robust with the variation of temperature and flow. Limits of detection and quantification of gallic acid were 1.49 and $4.53 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. Accuracy showed an average recovery of 100.9% of the analyte. The dosing and encapsulation efficiency of gallic acid in the liposomes was $99.30 \pm 1.56\%$ and $92.72 \pm 0.16\%$, respectively. The proposed method is accurate, precise and reproducible, being able to quantify gallic acid in liposomal preparations.

Keywords: Gallic acid. Stealth liposomes. Liposome characterization. HPLC. Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Estrutura do ácido gálico, derivado do ácido benzóico (a) Estrutura do ácido cafeíco, derivado do ácido cinâmico (b).....	17
Figura 2 - Fenóis simples que constituem os taninos hidrolisáveis. (A) Estrutura química de tanino hidrolisável (B).....	18
Figura 3 - Estrutura química do (a) ácido gálico e do (b) ânion do ácido gálico.....	19
Figura 4 - Oxidação do ácido gálico a sua forma quinona durante a síntese de nanopartículas de ouro.....	27
Figura 5 - Lipossomas multilamelares e unilamelares, SUV e LUV.....	29
Figura 6 - Lipossoma convencional.....	31
Figura 7 - Lipossomas furtivos.....	31
Figura 8. Espectro de varredura do ácido gálico em acetonitrila.....	38
Figura 9. Análise cromatográfica do ácido gálico na concentração de 50 µg.mL ⁻¹ em diferentes proporções de acetonitrila:água acidificada: (A) 60:40; (B) 70:30; (C) 80:20 e (D) 90:10.....	39
Quadro 1 - Dados de IC ₅₀ e mecanismos de ação do ácido gálico frente a linhagens de células cancerígenas.....	22

LISTA DE TABELAS.

Tabela 1 - Caracterização físico-química dos lipossomas furtivos contendo ácido gálico após a preparação.....	37
Tabela 2 - Parâmetros dos cromatogramas de ácido gálico obtidos em diferentes proporções de solventes por CLAE.....	40
Tabela 3 - Curva analítica do ácido gálico em acetonitrila a 272 nm.....	40
Tabela 4 - Parâmetros do método CLAE para a quantificação do AG.....	41
Tabela 5 - Avaliação da precisão do método de CLAE para a quantificação do AG.....	41
Tabela 6 - Resultados da exatidão para três níveis de concentrações diferentes de AG.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1. GERAL.....	16
2.2. ESPECÍFICOS.....	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
3.1 POLIFENÓIS E TANINOS.....	17
3.2 ÁCIDO GÁLICO	18
3.2.1 Propriedades físico-químicas do ácido gálico.....	18
3.2.2 Propriedades farmacológicas do Ácido gálico.....	20
3.2.3 Tecnologia farmacêutica aplicada ao ácido gálico.....	24
3.3 NANOTECNOLOGIA.....	27
3.3.1 Nanotecnologia farmacêutica.....	27
3.3.2 Sistemas de liberação controlada.....	28
3.3.3 Lipossomas.....	28
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 REAGENTES.....	33
4.2 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS FURTIVOS CONTENDO ÁCIDO GÁLICO	33
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS FURTIVOS.....	33
4.4. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR CLAE.....	33
4.4.1 Condições cromatográficas.....	34
4.4.2 Preparação das amostras.....	34
4.4.3 Validação do método para quantificação do ácido gálico em lipossomas.....	34
4.4.3.1 Linearidade.....	35

4.4.3.2 Exatidão.....	35
4.4.3.3 Precisão.....	35
4.4.3.4 Robustez.....	35
4.4.3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	35
4.5 DOSEAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO GÁLICO.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS.....	37
5.2 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR CLAE.....	37
5.2.1 Linearidade.....	40
5.2.2 Precisão.....	41
5.2.3 Exatidão.....	42
5.2.4 Robustez.....	42
5.3 DOSEAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO GÁLICO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	45
7 PERSPECTIVAS.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO: NANOENCAPSULATION OF GALIC ACID IN STEALTHY LIPOSOMES AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD BY HIGH EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC).....	53
ANEXO A - NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B.....	71

1 INTRODUÇÃO

O ácido gálico (AG), 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 (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). Compostos fenólicos são quimicamente muito reativos e esta reatividade também pode ser inferida ao ácido gálico, possuindo, em geral, características ácidas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). São facilmente oxidáveis, 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).

O AG é conhecido por apresentar uma grande variedade de funções biológicas, 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; NEO et al., 2013) e antitumoral (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013). Com relação à atividade antitumoral, o AG apresenta efeitos sobre vários tipos de tumores, destacando-se o apoptótico (YOU; PARK, 2010), antiproliferativo (MADLENER et al., 2007), antiangiogênico (LU et al., 2010) e antimetastático (HO et al., 2010). Estas ações fazem deste fármaco uma importante biomolécula para uso terapêutico. Além disso, apresenta citotoxicidade seletiva para células cancerígenas e baixa citotoxicidade para células normais (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

Apesar de suas promissoras atividades biológicas, o uso terapêutico do ácido gálico apresenta limitações como descrito anteriormente. Diante disso, para remediar estas propriedades limitantes, o uso da nanotecnologia surge como uma alternativa para viabilizar o futuro uso deste fármaco na terapia anticancerígena.

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 os 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). No progresso do uso desses sistemas, modificações surgiram em suas estruturas visando aumentar sua capacidade terapêutica. Sabe-se que lipossomas convencionais, constituídos basicamente de um fosfolípídeo, colesterol e um lipídio com carga, são facilmente identificados e capturados pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM). Para contornar esta limitação e aumentar o tempo desses sistemas na corrente sanguínea, e conseqüentemente as possibilidades de chegar às células alvo, desenvolveram-se lipossomas de longa duração, também conhecidos como lipossomas furtivos, nos quais, adiciona-se uma camada polimérica na superfície que inibe o processo de reconhecimento molecular e a captura pelo SFM (SAGRISTÁ et al., 2000). O método mais comum para a modificação de superfície é a utilização de um polímero hidrofílico e não-iônico, como o polietileno glicol (PEG), um processo chamado “PEGuilação” (MOSQUEIRA et al., 2001).

As propriedades dos lipossomas estão diretamente envolvidas com a sua função. Estas características incluem tamanho de partícula, forma, lamelaridade e carga de superfície, sendo indispensável à determinação precisa desses parâmetros (PATIL, JADHAV, 2014).

Atualmente, não existe disponível na literatura um método validado para doseamento do AG presente em sistemas de liberação controlada nanoparticulados utilizando Cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE).

A validação tem como objetivo demonstrar que o método analítico desenvolvido é eficaz para a finalidade pretendida, sendo assim, determinado qualitativamente, semi-quantitativamente e/ou quantitativamente o fármaco e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Para tanto, o método deve atender as exigências das aplicações analíticas, apresentando especificidade, linearidade, precisão, sensibilidade, robustez, limite de detecção e exatidão (ANVISA, 2003).

Diante do abordado, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar lipossomas furtivos contendo AG, visando conferir proteção e preservação a fim de aumentar o seu potencial biológico. Adiciona-se a isso, a necessidade de desenvolver e validar uma metodologia analítica por CLAE para doseamento do AG nos nanossistemas obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1. GERAL

Preparar e caracterizar lipossomas furtivos contendo ácido gálico (AG-Lipo), além de desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) para quantificação do fármaco livre e nos lipossomas.

2.2. ESPECÍFICOS

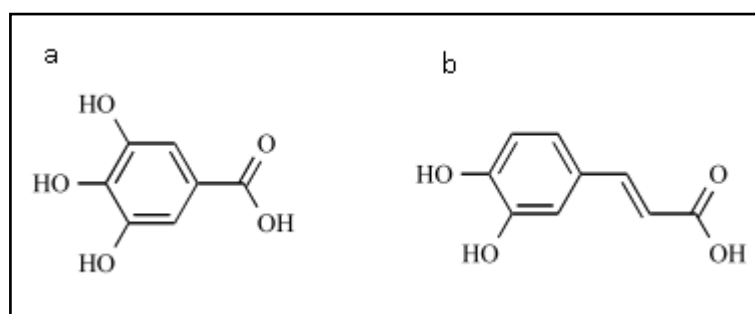
- Preparar lipossomas furtivos com ácido gálico (AG-Lipo) e sem ácido gálico (Lipo);
- Caracterizar os lipossomas furtivos através da determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), pH e potencial zeta;
- Desenvolver e realizar validação de método analítico por CLAE para quantificação do ácido gálico contido nas dispersões lipossomais;
- Realizar o doseamento e a eficiência de encapsulação (EE%) do ácido gálico contido nas dispersões lipossomais.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 POLIFENÓIS E TANINOS

Polifenóis são caracterizados estruturalmente pela presença de dois ou mais anéis aromáticos, cada um tendo, no mínimo, um grupo hidroxila aromático, além de serem ligados por pontes carbono-carbono. Dentre os polifenóis, detacam-se os ácidos fenólicos, os quais contêm um único anel aromático, e que consistem de derivados dos ácidos benzóico (figura 1a) e cinâmico (figura 1b) (GALLI, 2007).

Figura 1 - Estrutura do ácido gálico, derivado do ácido benzóico (a); Estrutura do ácido cafeíco, derivado do ácido cinâmico (b).

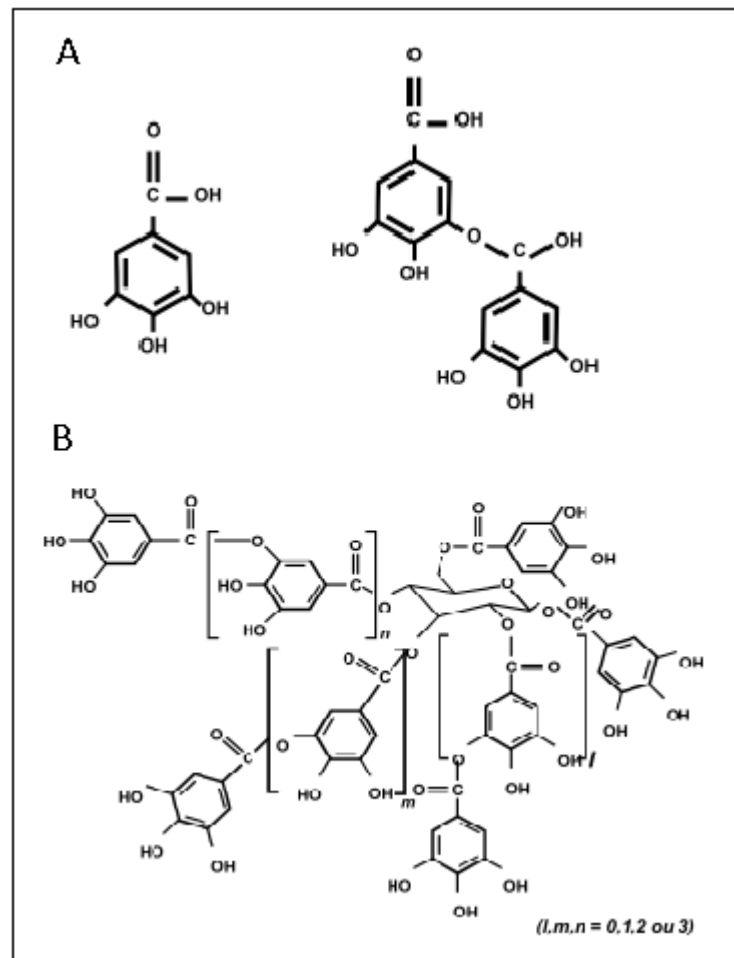


Fonte: GALLI (2007)

Os taninos são designados como ácidos fenólicos que advém do metabolismo secundário de plantas, podendo ser encontrados nas raízes, casca, folhas, frutos, sementes e seiva de uma extensão de vegetais. Estes compostos são solúveis em água, com exceção dos de elevado peso molecular, e se classificam em taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou proantocianidina (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Os taninos hidrolisáveis são assim designados por suas ligações éster-carboxila sofrerem hidrólise em condições ácidas e básicas. Sua estrutura é composta de uma mistura de açúcares com fenóis simples, tais como, ácido gálico ou digálico (figura 2A). Tendo como unidade básica um poliol, frequentemente uma D-glicose, com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotaninos, figura 2B) ou pelo hexadihidroxifênico (elagitaninos) (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004). Os taninos condensados ou protocianidinas, diferentemente dos taninos hidrolisáveis, apresentam resistência à hidrólise e possuem estruturas complexas (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Figura 2 - Fenóis simples que constituem os taninos hidrolisáveis (A); Estrutura química de tanino hidrolisável (B).



Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO (2004)

3.2 ÁCIDO GÁLICO

3.2.1 Propriedades físico-químicas do ácido gálico

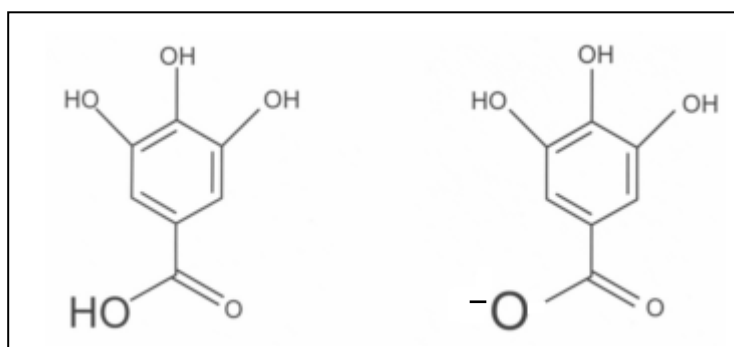
O AG, ácido 3,4,5-triidróxi-benzóico, é uma substância fenólica, intermediária do metabolismo secundário de plantas, originado pela rota biossintética via ácido chiquímico, sendo um derivado do ácido benzóico. É freqüentemente encontrado na natureza na forma de seu dímero de condensação, o ácido elágico. Tanto o AG como o ácido elágico são constituintes de taninos hidrolisáveis, dos quais são liberados por hidrólise ácida (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). 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, em frutas como a uva, morango, abacaxi, banana, limão, e na casca de maçãs, bem como, no vinho tinto e branco (YOU et al., 2010).

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 (MELO et al., 2009).

Polewski e colaboradores (2002), avaliaram as absorbâncias em UV-vis do AG solubilizado em soluções tamponadas com diferentes pH. Sendo evidenciado o deslocamento do λ (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 3.

Figura 3 - Estrutura química do (a) ácido gálico e do (b) ânion do ácido gálico.



Fonte: Modificada de POLEWSKI; KNIAT; SKA (2002)

O AG se apresenta instável em temperaturas extremas, 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. No entanto, pode formar ligações de hidrogênio, porque tem hidroxilas polarizadas de grupos fenólicos e carboxílicos, tanto intramoleculares como intermoleculares. Contudo, 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 considerá-lo uma substância relativamente solúvel em água (BENNETT et al., 2004).

O AG é conhecido principalmente por ser um antioxidante natural, atua 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 como em outros polifenóis, pela capacidade de atuar como doadores de hidrogênio ou elétrons para espécies reativas (GALLI, 2007).

Em adição, os compostos fenólicos são quimicamente muito reativos e esta reatividade também pode ser inferida ao AG (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; SLAWINSKA, 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).

3.2.2 Propriedades farmacológicas do ácido gálico

O AG é conhecido por apresentar uma grande variedade de funções biológicas, além de sua atividade antioxidante primária, a qual está principalmente relacionada com a

modulação da carcinogênese (FIUZA et al., 2004). Como antioxidante é capaz de capturar espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e ácido hipocloroso. 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.

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).

O AG 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 normais (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.

Quadro 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 (μM)	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)
U87	Células glioma	176 μM	Antiangiogênico	(LU et al., 2010)
U251n	Células glioma	235 μM	Antimetastático	(LU 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)
HL-60RG	Leucemia promielocítica humana	31,7 μM	Apoptótico	(SAKAGUCHI; INOUE; OGIHARA, 1998)
dRLh-84	Hepatoma de rato	36,4 μM	Apoptótico	(SAKAGUCHI; INOUE; OGIHARA, 1998)
PLC/PRF/5	Hepatoma humano	36,7 μM	Apoptótico	(SAKAGUCHI; INOUE; OGIHARA, 1998)
U-2 OS	Osteosarcoma humano	20 μM	Antimetastático	(LIAO et al., 2012)

Fonte: Adaptado de VERMA; SINGH; MISHRA (2013)

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 à leucemia por células WEHI-3 (HO et al., 2009).

Efeitos tóxicos decorrentes de um estudo de toxicidade subcrônica do AG contido na dieta de ratos F344, nas concentrações de 0, 0,2, 0,6, 1,7 e 5% de AG durante 13 semanas, foram evidenciados em concentrações acima de 119 e 128 mg/kg/dia (0,2 % de AG), em ratos machos e fêmeas, respectivamente. Doses superiores causaram entre outros efeitos adversos, perda de peso corporal (5% de AG) desde a primeira semana do tratamento e hipertrofia centrilobular das células hepáticas (1,7% de AG), foi observada em animais de ambos os sexos. Além de redução da concentração de hemoglobina, hematócrito e contagem de glóbulos vermelhos após a administração de 0,6 % de AG para as fêmeas e a 5% de AG para os machos (NIHO et al., 2001).

Desordens neuropsiquiátricas ganham muita força atualmente e as expectativas revelam um aumento gradual de casos novos em todo o mundo. O AG também apresenta ação farmacológica sobre um desses distúrbios, a depressão. Evidenciando resultados ainda melhores quando encapsulado em nanopartículas de quitosana e administrados na mesma dose que o AG livre em camundongos (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, sugeriu-se que o AG atuou como um neuroprotetor, via aumento da defesa antioxidante do cérebro (MANSOURI et al., 2013).

O potencial antidiabético através da inibição da ação de enzimas que participam da hidrólise de carboidratos é referido ao AG (LIU et al., 2013), sendo ainda apontado como capaz de promover a proteção dos rins no tratamento em longo prazo de doenças crônicas (PENG et al, 2012).

KIM e colaboradores (2006) constataram o efeito anti-alérgico *in vitro* e *in vivo* do AG, sugerindo que o mecanismo de ação estaria associado ao bloqueio da liberação de histamina e da expressão de citocinas pró-inflamatórias.

A atividade antimicrobiana do AG foi demonstrada frente a cepas de *Helicobacter pylori* (DÍAZ-GÓMEZ et al., 2013), *Escherichia coli* ATCC 2922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6838 (NEO et al., 2013).

3.2.3 Tecnologia farmacêutica aplicada ao ácido gálico

Os polifênóis 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. 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).

Devido a estes empecilhos, há relatos na literatura da encapsulação do AG em complexos de inclusão, micropartículas e nanopartículas, além de conjugados com este fármaco (BOZIC et al, 2012; ROSA et al., 2013; NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013;).

Diversas pesquisas também se concentram na síntese de conjugados de quitosana com o AG. A conjugação permite a formação de derivados funcionais por ligação covalente de uma molécula com a espinha dorsal da quitosana, a qual possui dois grupos reativos através dos quais essa ligação pode ocorrer: os grupos amina livres em unidades desacetiladas, e os grupos hidroxil nos carbonos C₃ e C₆ em unidades acetiladas ou desacetiladas (ALVES, 2008).

De acordo, com as necessidades de cada campo de aplicação, as partículas com 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 (BITAN-CHERBAKOVSKY; ASERIN; GARTI, 2012; BOZIC et al, 2012).
- Desenvolvidos de sensores para aplicação bioanalítica (HUANG; YU; TSENG, 2010; SU et al., 2012) ;
- Funcionalização do polímero, com o qual foi conjugado (BOZIC et al, 2012; PASANPHAN; CHIRACHANCHAI, 2008).
- Desenvolvimento de alimentos funcionais (ROBERT et al., 2012);

- Controle na liberação do AG encapsulado (HUANG; YU; TSENG, 2010; LI et al., 2011; YU et al., 2011);
- Aplicação na indústria alimentícia como material para embalagem (NEO et al., 2013).

LIU e colaboradores (2013), desenvolveram um novo método mediado por radicais livres para síntese de conjugados de quitosana com AG, 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. 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 a complexação em complexos de inclusão de β -ciclodextrina (AG- β -CDS) resultou na preservação da capacidade antioxidante do AG após a encapsulação em todas as matrizes, destacando-se as micropartículas GA/C que obtiveram a mais elevada porcentagem de eficiência de encapsulação (91,07%) (ROSA et al., 2013).

Robert e colaboradores (2012), promoveram a adição de um grupo acetil ao amido e a inulina, dois polissacarídeos, para encapsulação do AG. Os autores constataram que a inclusão de um grupo acetil na molécula de amido melhorou a eficiência de encapsulação do AG nas microesferas, contudo, o efeito oposto foi observado por acetilação da inulina. A liberação do AG foi rápida para todos os sistemas estudados (< 9 horas), o que sugeriu que os mesmos podem ser utilizados na fabricação de alimentos funcionais.

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, AG 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 AG foi realizado por meio de um planejamento fatorial, que variou as concentrações de quitosana e Tween 80[®], esse

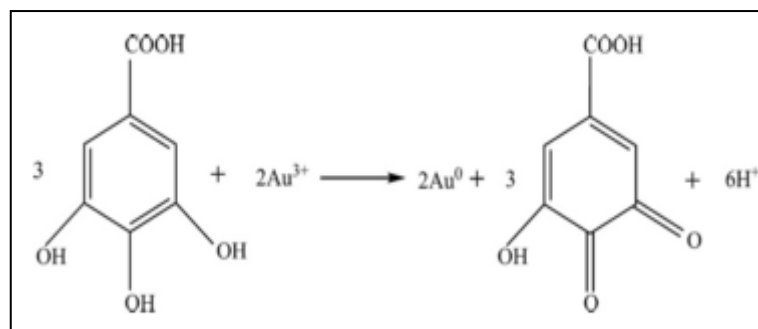
utilizado com o intuito de servir como agente de entrega a células cerebrais. A administração dos sistemas nanotecnológicos com a adição de Tween 80[®] propiciou um aumento na atividade ansiolítica quando comparado com as nanopartículas na ausência do tensoativo, refletida pelos modelos comportamentais e a redução nos níveis de nitrito no plasma (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013).

A produção de nanofibras de zeína contendo AG aliou a eletrofiação, uma técnica de encapsulação promissora para estabilização de antioxidantes, ao produto de encapsulação, uma proteína hidrofóbica extraída do milho, que é conhecida por sua alta resistência térmica e barreira ao oxigênio, à deficiência na instabilidade e à capacidade de auto-oxidação do AG. Desta forma, foi obtido um sistema nanotecnológico que preservou a capacidade de captura de radicais livres do polifenol, acompanhada de uma alta eficiência de encapsulação (> 99%). Esses sistemas apresentaram aplicabilidade para atuação como material de embalagem na indústria alimentícia (NEO et al., 2013, 2013).

Macromoléculas carreadoras, como os dendrímeros, tem se destacado como dispositivos de entrega em escala nanométrica. Caracterizam-se por serem moléculas tridimensionais, que consistem de um núcleo central, unidades de ramificação e grupos funcionais. Estes grupos desempenham um papel importante no controle das propriedades de porções terapêuticas que são encapsuladas ou complexadas com ele. 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 (BITAN-CHERBAKOVSKY; ASERIN; GARTI, 2013).

O desenvolvimento de sensores para aplicação bioanalítica ocorre como um objetivo adicional em sistemas nanoparticulados providos de AG. Em especial 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). Como também elucidando a importância dos grupos hidroxil do AG para eficácia da ação anti-tumoral, visto que, na síntese das nanopartículas de ouro revestidas com AG, a molécula do polifenol é reduzida a sua forma oxidada (Figura 4), uma quinona, resultando na inibição da ação anti-tumoral quando comparado ao AG livre. Diante disso, evidencia-se a importância desses grupos no efeito citotóxico do AG sobre as células (LI et al., 2011). A característica seletiva do AG para linhagens de células cancerígenas foi evidenciada nos testes realizados com AG encapsulado em nanofibras de zeína, não apresentando citotoxicidade frente a células de fibroblastos (L929) (NEO et al., 2013).

Figura 4 - Oxidação do ácido gálico a sua forma quinona durante a síntese de nanopartículas de ouro.



Fonte: LI et al. (2011)

3.3 NANOTECNOLOGIA

3.3.1 Nanotecnologia Farmacêutica

Nanotecnologia é a aplicação da ciência em sistemas na escala nanométrica, ou seja, estruturas com tamanho característico de 0,1 a 1000 nanômetros (nm) (FERRARI, 2005). A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que tem apresentado um grande avanço nos últimos anos, encontrando aplicações nas mais diversas áreas, desde setores de energia e eletrônica até a indústria farmacêutica. Essa ciência baseia-se no princípio de que os materiais na escala nanométrica podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores (ROSSI-BERGMANN, 2008).

A aplicação da nanotecnologia para o tratamento, diagnóstico, monitoramento e controle de sistemas biológicos foi recentemente denominada “Nanomedicina” pelo *National Institute of Health* nos Estados Unidos (MOGHIMI et al., 2005).

Atualmente a nanomedicina gira em torno de três principais áreas de aplicação: a engenharia de tecidos, com o desenvolvimento de órgãos, e implantes com maior afinidade pelo tecido original, através do crescimento de células em arcabouços artificiais de polímeros biodegradáveis ou hidroxiapatita em películas biossintéticas (THOMAS; DEAN; VOHRA., 2006); o desenvolvimento de nanosensores, que detectam de forma rápida e precisa concentrações muito pequenas de moléculas, através do uso de partículas como pontos quânticos, nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas ou fulerenos (JAIN, 2005); e os sistemas de carregamento e liberação de fármacos e vacinas para melhorar a sua eficácia terapêutica (SHAFTER, 2005).

3.3.2 Sistemas de liberação controlada

Quando um fármaco é administrado, a um ser humano ou animal, apenas uma parcela da dose atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é desperdiçada, em decorrência da distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o local de ação. Com o intuito de melhorar a farmacocinética e a biodistribuição de fármacos, na década de 80, surgiu a tecnologia da liberação controlada de fármacos, como um método comercialmente atrativo para administração do princípio ativo de forma controlada. Sendo assim, a liberação pôde ser manipulada para a produção de sistemas de liberação rápida, controlada ou prolongada da substância bioativa (SWARBRICK, 1996). Neste contexto, o termo “fármaco” engloba todos compostos bioativos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético (CABRAL, 2004).

A liberação controlada implica a associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados, tenham a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação/entrega do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou conduzir o fármaco até o tecido em que este deve atuar. Estes sistemas são designados assim por sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos (KHAN, 2001).

Os SLC's caracterizam-se por apresentar diversas vantagens em relação aos sistemas convencionais, tais como, melhor controle da liberação do princípio ativo, melhora da eficácia terapêutica com uso de doses menores que as usuais, resultando em menor probabilidade de atingir doses tóxicas ou sub-terapêuticas; maior intervalo de administração, com o consequente aumento da adesão do paciente ao tratamento, bem como, possibilidade de direcionamento do fármaco para seu alvo (ROSSI-BERGMANN, 2008).

A tecnologia dos SLC's oferece uma abordagem inteligente para a entrega de fármacos por acoplamento destes a um sistema transportador, tal como microesferas, nanopartículas, lipossomas, entre outros, que modulam as características de liberação e de absorção do fármaco (VASIR; TAMBWEKAR; GARG, 2003).

3.3.3 Lipossomas

Há mais de 4 décadas, Alec Bangham constatou que fosfolípidos em sistemas aquosos formam estruturas fechadas em bicamadas desde então muitos avanços foram conquistados nas pesquisas com lipossomas, tornando-os mais estáveis à medida que se compreendia suas características físico-químicas e interações com fluidos biológicos (TORCHILIN, 2005). Inicialmente, eles foram utilizados para estudar membranas biológicas;

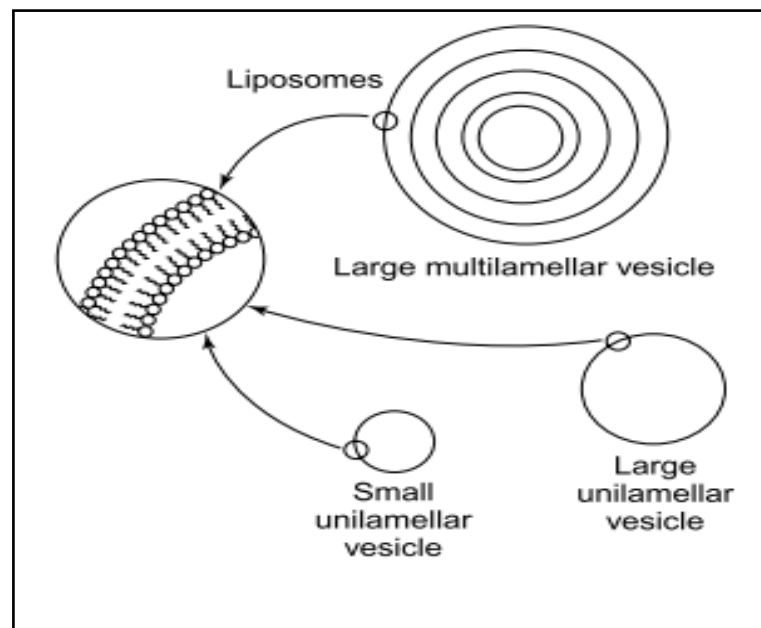
as aplicações práticas, principalmente na entrega de fármacos surgiram na década de 1970 (LASIC, 1998).

Lipossomas são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso (BATISTA et al., 2007). 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 (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

Os lipossomas são constituídos basicamente de fosfolipídeos e esteróis (VEMURI; RHODES, 1995). 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 (VEMURI; RHODES, 1995).

O número de bicamadas em torno do compartimento aquoso classifica os lipossomas em unilamelares (uma única bicamada) e multilamelares (de duas a múltiplas bicamadas). Também são categorizados quanto ao tamanho para as vesículas unilamelares, sendo identificados como lipossomas unilamelares pequenos - SUV (small unilamellar vesicles) e lipossomas unilamelares grandes - LUV (large unilamellar vesicles) (Figura 5) (LASIC, 1998).

Figura 5 - Lipossomas multilamelares e unilamelares, SUV e LUV.



Fonte: Adaptado de LASIC (1998)

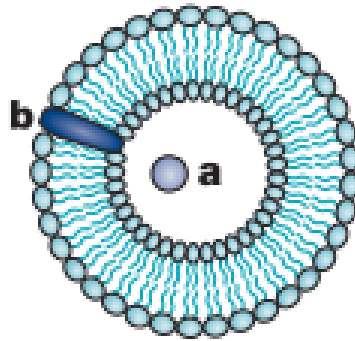
Vários métodos foram desenvolvidos para produção de lipossomas, sendo bastante relatado a hidratação de um filme lipídico. Neste método, os constituintes são dissolvidos em solvente orgânico, seguido da evaporação do solvente e formação do filme lipídico. Procedese a hidratação do filme com água ou tampão concomitantemente a 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 policarbonato 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, priorisa-se a determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersão (PDI), composição lipídica e o percentual da eficiência de encapsulação do fármaco (EE%) (VEMURI; RHODES, 1995).

Tamanho, carga e propriedades de superfície dos lipossomas podem ser facilmente alteradas pela simples adição de novos componentes lipídicos e / ou por variação dos métodos de preparação. Estas modificações possibilitam uma maior aplicação terapêutica, sendo assim classificados quanto às características de interação com sistemas biológicos (TORCHILIN, 2005).

Após a administração sistêmica, lipossomas são geralmente reconhecidos como partículas estranhas e, por conseguinte, sujeitos a endocitose pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), células de Kupffer encontradas principalmente no fígado e no baço (LASIC, 1998). As vesículas que apresentam esta característica são conhecidas como lipossomas convencionais (Figura 6).

Figura 6 - Lipossoma convencional.

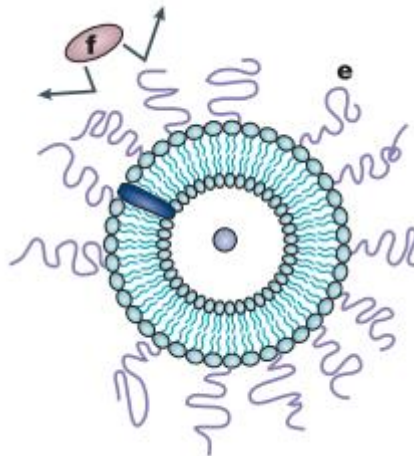


Fármaco hidrofílico (a); Fármaco lipofílico (b).

Fonte: Adaptado de TORCHILIN (2005)

Para suprir a precoce captura pelo SFM e aumentar as chances de chegar a células alvo, foram desenvolvidas vesículas que permanecem no sangue em um tempo de cerca de 100 vezes maior que os lipossomas convencionais. Devido esta característica estas vesículas estericamente estabilizadas com componentes hidrofílicos naturais como o monossialogangliosídeo GM1 e fosfatidilinositol, ou de polímeros hidrofílicos sintéticos, especificamente os polietilenoglicóis (PEG) foram referidas como lipossomas furtivos (stealth) (Figura 7) (LASIC; PAPAHAADJOPOULOS, 1995; SAGRISTÁ, 2000).

Figura 7 - Lipossomas furtivos



PEG (e); Opsoninas (f)

Fonte: Adaptado de TORCHILIN (2005)

A estabilidade biológica melhorada dos lipossomas furtivos é um resultado da inibição das interações com as proteínas do plasma (tais como opsoninas e lipoproteínas) e receptores de superfície celular pela barreira estérica acima da bicamada (LASIC; PAPAHAADJOPOULOS, 1995). Em decorrência disso, ocorre o aumento do tempo de disponibilidade do fármaco na corrente sanguínea, aliada a vetorização passiva de partículas manométricas, em decorrência do efeito do aumento da permeabilidade e retenção (EPR) vascular no câncer. Faz dos lipossomas furtivos importantes ferramentas no tratamento dessa patologia.

Em adição, em termos de aplicação terapêutica, lipossomas podem oferecer proteção contra degradação do fármaco no corpo, liberação controlada do agente encapsulado, e ainda a possibilidade de modificação da superfície dos lipossomas pela conjugação de moléculas de direcionamento que promovem um aumento na eficácia da entrega do fármaco ao alvo (BOWEY, TANGUAY, TABRIZIA, 2012).

4- METODOLOGIA

4.1 Reagentes

O ácido gálico e o colesterol foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA). A diestearoilfosfatidiletanolamina ligada ao polietilenoglicol (DSPE-PEG) e a fosfatidilcolina de soja foram adquiridas na Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Alemanha). Os solventes e outros produtos químicos foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.2 Preparação dos lipossomas furtivos contendo ácido gálico

Os lipossomas furtivos contendo ácido gálico (AG-Lipo) foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico (LIRA et al, 2009). Inicialmente, o ácido gálico (10 mg) e os lipídios (42 mM), fosfatidilcolina de soja (PC), colesterol (CH) e polietilenoglicol-diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG) (7,5:2,0:0,5) foram solubilizados separadamente em uma solução de clorofórmio:metanol (3:1). Posteriormente, a solução foi submetida à rotaevaporação sob pressão reduzida até a formação de um filme lipídico uniforme. O filme lipídico foi, então, hidratado utilizando 10 mL de tampão fosfato pH 6,8, com formação de lipossomas multilamelares (MLV). Para obtenção de lipossomas unilamelares pequenos, a dispersão de MLV foi submetida à agitação em sonda de ultrassom (Vibra Cell, BRANSON, USA) a 200 W e 40 Hz por 300 s. Os lipossomas furtivos sem fármaco (Lipo) foram preparados pelo mesmo método para estudo comparativo de estabilidade.

4.3 Caracterização físico-química dos lipossomas furtivos

O tamanho médio e o índice de polidispersão (PDI) dos lipossomas foram determinados por espectroscopia de autocorrelação de fótons (PCS), utilizando analisador de partículas a laser DelsaTMNano-S (Beckman Coulter, Califórnia, USA). O potencial zeta foi determinado no equipamento ZetasizerNano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK), utilizando a técnica de mobilidade eletroforética.

4.4. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do ácido gálico por CLAE

Atualmente, não há disponível na literatura um método validado para dosagem do AG presente em sistemas de liberação controlada nanoparticulados utilizando CLAE. Por isso, tornou-se necessário desenvolver um método para este fim. Primeiramente, o comprimento de onda de maior absorbância do AG foi determinado com varredura em espectrofotômetro UV-

Vis entre os comprimentos de onda de 200 e 400 nm em diluição adequada a partir da solução estoque padrão em acetonitrila.

4.4.1 Condições cromatográficas

A quantificação do AG foi realizada por CLAE utilizando um método isocrático. As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento Alliance 2695 (Waters, EUA) acoplado a um detector de arranjos de diodos (PDA) 2998 (Waters, EUA), operado a 272 nm. Uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 mm, XBridge™ Waters) protegida por uma pré-coluna da mesma composição (20 mm × 4,6 mm) foi utilizada com uma fase móvel composta por acetonitrila:água acidificada com ácido acético 1%, pH 3,5, a um fluxo de 1,0 mL/min a 25°C e um volume de injeção de 20 µL. Diferentes proporções de fase móvel foram utilizadas para avaliar o melhor cromatograma. O desempenho do sistema cromatográfico foi avaliado a partir dos seguintes parâmetros: número de pratos teóricos (N), fator de cauda (T) e altura equivalente do prato teórico (HEPT), observando-se os cromatogramas obtidos na concentração de 50 µg/mL.

4.4.2 Preparação das amostras

A curva analítica do AG foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque em acetonitrila (1 mg/mL), variando as concentrações de 10 a 100 µg.mL⁻¹. A solução estoque padrão foi preparada por transferência de 10 mg de AG para um balão volumétrico de 10 mL e solubilização em acetonitrila, e então, submetida à sonicação por 5 minutos. Em seguida, diluições apropriadas foram efetuadas com acetonitrila para obtenção de uma curva padrão em seis níveis de concentrações diferentes de AG: 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg.mL⁻¹.

4.4.3 Validação do método para quantificação do ácido gálico em lipossomas

Para a validação do método analítico para quantificação de AG em lipossomas furtivos, os parâmetros de validação foram avaliados segundo as exigências da Conferência Internacional de Padronização de Requerimentos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (International Conference on Harmonisation - ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) (ICH, 2005).

4.4.3.1 Linearidade

Para a determinação da linearidade, foram realizadas três curvas padrão autênticas em triplicata com seis concentrações diferentes de AG (10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e relação entre as áreas dos picos cromatográficos do fármaco e do padrão interno, considerada variável dependente (y). Os parâmetros da correlação foram estimados pelo método dos mínimos quadrados.

4.4.3.2 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do analito adicionado em quantidades conhecidas à formulação lipossomal placebo em três concentrações diferentes: 10, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, correspondendo, respectivamente, a 20, 100 e 200% da concentração teste. Todas as amostras foram preparadas em triplicata (n=9). O coeficiente de variação e a porcentagem de recuperação foram utilizados para avaliar a exatidão, definida como:

$$\text{Exatidão} = \left(\frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração teórica}} \right) \times 100$$

4.4.3.3 Precisão

Para o estudo de precisão foi utilizada a concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do AG (concentração teste) determinada em soluções diferentes (n=6). As análises foram realizadas em dois dias diferentes (inter-dia), por dois analistas diferentes (intra-dia). As médias dos resultados obtidos foram avaliadas pelo teste t de Student (teste bilateral, $p < 0,05$).

4.4.3.4 Robustez

A robustez do método proposto foi verificada pela variação de temperatura de análise (25 °C e 30 °C) e variação de fluxo (1,0 mL/min e 1,2 mL/min). A concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AG foi determinada em seis ensaios diferentes. A avaliação da robustez foi realizada pela análise dos coeficientes de variação entre as médias obtidas, utilizando o teste t de Student (teste bilateral, $p < 0,05$).

4.4.3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estimados matematicamente a partir da curva padrão resultante da média das três curvas de calibração autênticas. O cálculo para determinar os valores correspondentes baseia-se no desvio padrão do residual da linha de

regressão e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular) na curva padrão. Para determinar o limite de detecção e quantificação foram utilizadas as equações:

$$LD = \left(\frac{D.P.}{I} \right) \times 3,3$$

$$LQ = \left(\frac{D.P.}{I} \right) \times 10$$

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

4.5 Doseamento e eficiência de encapsulação dos lipossomas contendo ácido gálico

Para determinação do AG na forma lipossomal, transferiu-se uma alíquota da formulação (50 µL) para um eppendorf. Em seguida, adicionou-se à amostra 950 µL de acetonitrila. A solução foi submetida à agitação por 1 min para romper a estrutura lamelar dos lipossomas e liberar o conteúdo de AG encapsulado. Por fim, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi filtrado em filtros Millex[®] (0,22 µm, Millipore, USA). A concentração teórica de AG na amostra foi de 50 µg.mL⁻¹. Os ensaios de doseamento foram realizados em triplicata.

A eficiência de encapsulação foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, onde 400 µL dos lipossomas foram colocados em unidades filtrantes Amicon[®] Ultra (Millipore, USA) e centrifugados a 10.000 rpm por 1h. Uma alíquota do ultrafiltrado foi, então, diluída em acetonitrila e submetida à leitura em CLAE.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química dos lipossomas

Os lipossomas furtivos foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e os dados de caracterização físico-química para Lipo e AG-Lipo, tamanho de partícula, PDI, pH e potencial zeta estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização físico-química dos lipossomas furtivos contendo ácido gálico após a preparação.

Formulações	Tamanho de partícula (nm) $\pm$ DP*	Índice de polidispersão (PDI)	pH	Potencial zeta (mV) $\pm$ DP*
Lipo	84,5 $\pm$ 1,9	0,224	6,8	-33,4 $\pm$ 0,15
AG-Lipo	81,9 $\pm$ 0,4	0,235	6,6	-30,0 $\pm$ 1,40

* DP=desvio padrão, n=3; Lipo=lipossomas furtivos sem fármaco; AG-Lipo=lipossomas furtivos contendo ácido gálico.

As suspensões coloidais exibiram distribuição de tamanho das vesículas moderadamente polidisperso (Tabela 1), classificadas assim por se encontrarem com PDI entre 0,1 e 0,4 nm (BHATTACHARJEE, 2016). Além de apresentar tamanhos apropriados para dispersões coloidais em escala manométrica.

Após a encapsulação de AG nos lipossomas ocorreu uma pequena variação no pH da formulação lipossomal (Lipo = 6,8; AG-Lipo = 6,6), contudo essa alteração não compromete a estabilidade do AG, visto que o pH continua ácido. Cuidado tomado na escolha do pH do tampão para solubilização do AG e preparo dos lipossomas, pois o mesmo é facilmente oxidado em pH alcalino (POLEWSKI; KNIAT; SLAWINSKA; 2013).

Os resultados do potencial zeta estão apresentados na Tabela 1, onde ambas as formulações exibiram um potencial zeta negativo.

5.2 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR CLAE

O espectro de varredura do AG em acetonitrila revelou dois picos de absorbância máxima nos comprimentos de onda de 216 nm e 272 nm (Figura 2), corroborando os dados relatados na literatura (POLEWSKI; KNIAT; SLAWINSKA; 2013). Contudo, o comprimento de onda escolhido para a quantificação do AG foi o de 272 nm, devido a menor interferência dos excipientes lipídicos da formulação lipossomal.

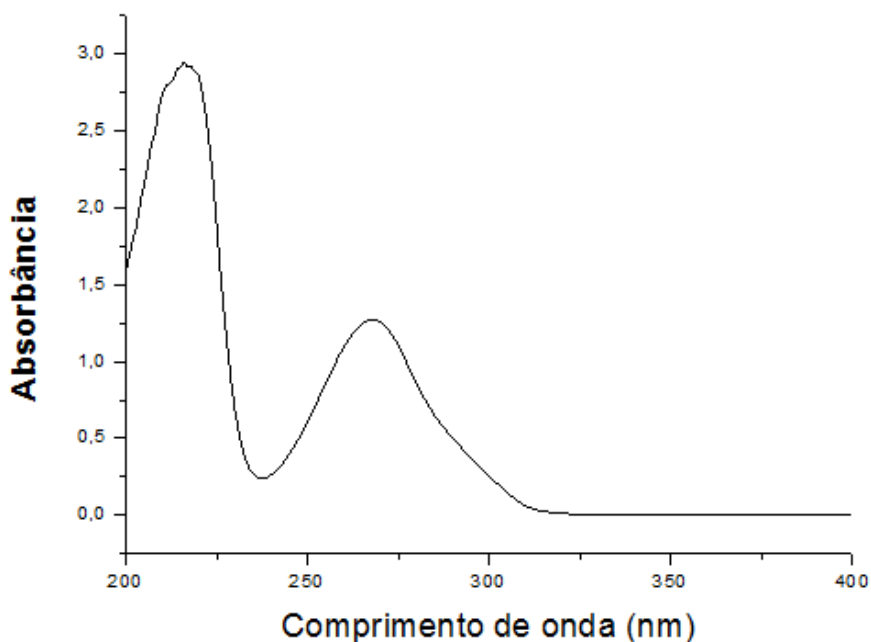


Figura 8. Espectro de varredura do ácido gálico em acetonitrila.

Para otimização da fase móvel a ser utilizada na quantificação do AG, a proporção entre acetonitrila e água acidificada foi variada de 60:40 para 90:10, com o intuito de melhorar a resolução do cromatograma (Figura 3). Os parâmetros cromatográficos, número de pratos teóricos (N), fator de cauda (T) e altura equivalente a um prato teórico (HETP), também foram calculados (Tabela 2). Com o aumento da proporção do solvente orgânico houve uma melhor resolução do cromatograma, visto que houve um aumento do número dos pratos teóricos e uma diminuição do HETP, ou seja, uma melhor eficiência da coluna cromatográfica (Figura 3A-C). Contudo, na proporção acetonitrila:água 90:10 (Figura 3D), observou-se uma redução no número de pratos teóricos e aumento do fator de cauda do pico. Diante destes resultados, a proporção escolhida para a preparação da curva analítica de AG foi de acetonitrila:água 80:20 (Figura 3C). O método desenvolvido foi específico para o ácido gálico com tempo de retenção de 2,65 minutos, permitindo que o tempo de análise total para cada amostra fosse de 5 minutos.

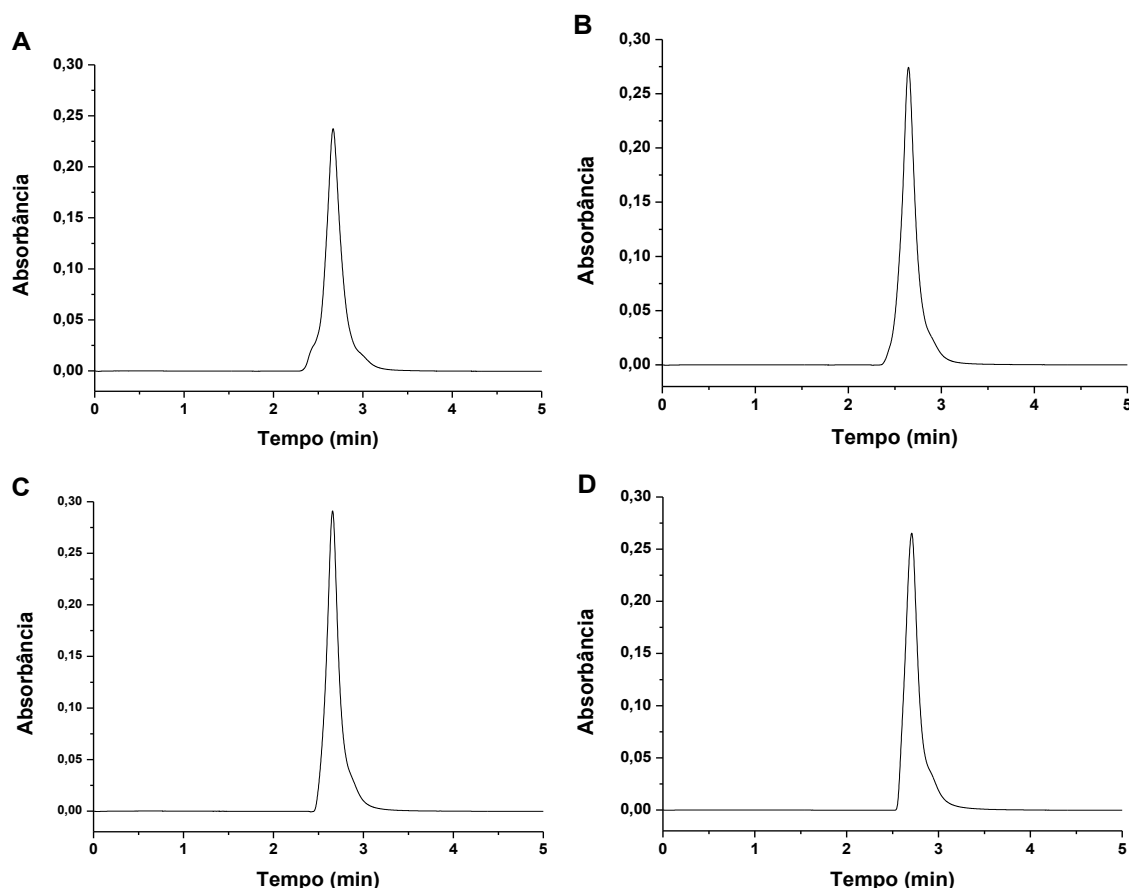


Figura 9. Análise cromatográfica do ácido gálico na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diferentes proporções de acetonitrila:água acidificada: (A) 60:40; (B) 70:30; (C) 80:20 e (D) 90:10.

O método proposto atendeu aos requisitos dentro dos limites preconizados (FDA, 2001) conforme dados apresentados na Tabela 2. A eficiência da coluna aumenta com o número dos pratos teóricos, que devem ser acima de 2000 para apresentar eficiência adequada, o que foi verificado também pela diminuição da altura dos pratos teóricos. Os valores de fator de cauda, próximos de um, são ideais, pois indicam a simetria dos picos. Além disso, o uso de ácido na fase móvel é imprescindível para prevenir a ionização dos grupos hidroxilas presentes nos compostos fenólicos, permitindo uma melhor simetria do pico (CARVALHO et al, 2009). Essa afirmação é condizente com o valor do pK_a de 4,4 do AG, e realça o uso do pH em torno de 3,5 da água acidificada, constituinte da fase móvel, onde o AG se encontrará na sua forma não-dissociada.

Tabela 2. Parâmetros dos cromatogramas de ácido gálico obtidos em diferentes proporções de solventes por CLAE.

Parâmetros	Limites recomendados	Proporção de solvente acetonitrila:água			
		60:40	70:30	80:20	90:10
N	N > 2000	1282	1680	2073	1758
T	T < 2	1,02	1,12	1,33	1,4
HETP	HEPT < 0,15	0,19	0,14	0,12	0,14

N=número de pratos teóricos; T=fator de cauda do pico; HETP=altura equivalente do prato teórico.

5.2.1 Linearidade

Os dados da curva analítica, resultantes da média de três replicatas, foram ajustados por análise de regressão linear (Tabela 3). O método mostrou-se linear entre as concentrações estudadas, de 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação da regressão linear obtida foi $y = -0,203x + 1,102$, em que y é a absorbância (área) e x a concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) em equivalentes de AG.

Tabela 3. Curva analítica do ácido gálico em acetonitrila a 272 nm.

Concentração teórica de AG ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Valor médio da área (mAU/min) $\pm$ D.P.*	Concentração obtida de AG ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) $\pm$ DP*
10	11,27 $\pm$ 0,31	10,04 $\pm$ 0,28
20	21,9 $\pm$ 0,43	19,69 $\pm$ 0,39
40	43,12 $\pm$ 0,16	38,95 $\pm$ 0,15
60	66,3 $\pm$ 1,02	59,98 $\pm$ 0,93
80	87,34 $\pm$ 1,28	79,07 $\pm$ 1,64
100	110,59 $\pm$ 1,07	100,17 $\pm$ 0,97

* DP=desvio padrão, n=9.

O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9997, significando que 99,97% da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado. Os dados da análise de regressão são resumidos na Tabela 4. Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados foram 1,49 e 4,53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 4). Com esses resultados, verifica-se que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar o AG.

Tabela 4. Parâmetros do método CLAE para a quantificação do AG.

Parâmetros	Valores
Comprimento de onda de medição (nm)	272
Faixa linear ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10-100
Intercepto $\pm$ (desvio padrão)	-0,203 ($\pm$ 0,499)
Inclinação $\pm$ (desvio padrão)	1,102 ($\pm$ 0,008)
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9997
Limite de detecção, LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,49
Limite de quantificação, LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	4,53

5.2.2 Precisão

A precisão foi avaliada pelos estudos de repetibilidade (inter-dia) e precisão intermediária (intra-dia). Neste estudo, através do teste t de Student foi avaliada a possível existência de diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas para os ensaios realizados em dias diferentes e com analistas diferentes. Como pode ser observado na Tabela 5, em todos os casos o t calculado foi sempre menor do que o t crítico, demonstrando não existir diferença estatisticamente significativa entre as médias, ou seja, os resultados obtidos expressam o mesmo valor ($p < 0,05$).

Tabela 5. Avaliação da precisão do método de CLAE para a quantificação do AG.

Intra-dia						
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Analista 1		Analista 2		$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}^*$
	CM $\pm$ DP	DPR (%)	CM $\pm$ DP	DPR (%)		
50	50,79 $\pm$ 0,76	1,51	51,16 $\pm$ 1,21	2,38	0,12	2,23
Inter-dia						
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Dia 1		Dia2		$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}^*$
	CM $\pm$ DP	DPR (%)	CM $\pm$ DP	DPR (%)		
50	50,79 $\pm$ 0,76	1,51	49,88 $\pm$ 1,43	2,86	0,19	2,23

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

5.2.3 Exatidão

A exatidão foi verificada para três níveis de concentração: baixa, média e alta. Os dados experimentais obtidos revelaram média de recuperação do analito de 100,9% (99,7-101,6%) e que o maior coeficiente de variação foi de cerca de 3,23% (Tabela 6). Os resultados do estudo de exatidão demonstram que pequenas variações da concentração de ácido gálico podem ser prontamente quantificadas pelo método, bem como não há interferência dos excipientes da forma lipossomal no doseamento do produto final, portanto, o método analítico desenvolvido é exato.

Tabela 6. Resultados da exatidão para três níveis de concentrações diferentes de AG.

Concentração de AG ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				Dados estatísticos		
Teórica	Experimental			Média	D.P.*	DPR (%)*
10	10,30	10,13	10,06	10,05	0,24	2,37
50	49,07	50,55	52,21	50,61	1,57	3,10
100	103,44	97,48	98,30	99,74	3,22	3,23

* D.P.=desvio padrão; DPR=desvio padrão relativo.

5.2.4 Robustez

A variação da temperatura e do fluxo de análise não afetou a absorbância do AG. As concentrações médias obtidas para as análises de soluções acondicionadas nas temperaturas de 25 °C e 30 °C foi de $49,06 \pm 0,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A mudança do fluxo resultou em concentrações médias de $50,68 \pm 1,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Entre todos os resultados experimentais, o valor máximo do coeficiente de variação encontrado foi 3,51%. De acordo com o teste t de Student (Tabela 7) não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos, quando da alteração na temperatura de análise (0,78) ou do fluxo (0,06) durante as análises realizadas, ou seja, no nível de 95% de confiança as variações dos parâmetros analisados não influenciam a quantificação do AG.

Poucas metodologias de validação para quantificação do AG por CLAE são relatadas na literatura, e em todas, o fármaco encontra-se em misturas de componentes polifenólicos. Wang e colaboradores (2000) desenvolveram um método isocrático (fase móvel composta por metanol, água e ácido ostofosfórico, nas proporções de 20:79,9:0,1%) para detecção de AG em uma mistura com catequinas e cafeína no chá verde, tendo o comprimento de onda de

detecção de 210 nm (WANG; HELLIWELL; YOU, 2000). No ano de 2003, outro método analítico para detecção de AG, hamamelitana e catequinas na casca, nos ramos e nas folhas de hamamélis foi validado por Wang e colaboradores (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2003). Neste caso, fez-se necessário o uso de fase móvel por gradiente (ácido ortofosfórico a 0,1% em água, eluição A, e ácido ortofosfórico a 0,1% em metanol, eluição B) onde são requeridas relações variáveis de solventes durante a corrida analítica, e repetiu-se a detecção dos constituintes em 210 nm.

Este comprimento de onda não seria adequado para quantificação do AG em lipossomas, pois iria sofrer interferência dos constituintes lipídicos da dispersão lipossomal. Portanto, o método desenvolvido e validado neste trabalho é uma importante ferramenta para auxiliar pesquisas que necessitam de uma quantificação exata e precisa do ácido gálico em sua forma pura e em preparações farmacêuticas.

5.3 DOSEAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO GÁLICO

A concentração total de fármaco (teor), por sua vez, é geralmente determinada pelo rompimento das partículas em suspensão e solubilização do fármaco liberado em um solvente adequado. Por conseguinte, a concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre. Um sistema de liberação ideal deve ter uma alta capacidade de encapsulação do fármaco, reduzindo, assim, a quantidade de materiais matriciais administrado.

Após o desenvolvimento da metodologia analítica, o ácido gálico presente nas formulações lipossomais foi quantificado, onde se obteve um teor e uma eficiência de encapsulação de $99,30 \pm 1,56\%$ e $92,72 \pm 0,16\%$, indicando a eficácia do método desenvolvido.

Atualmente, não existe disponível na literatura um método validado para dosagem do AG presente em sistemas de liberação controlada nanoparticulados utilizando CLAE, nem o desenvolvimento de lipossomas contendo este fármaco. Contudo, alguns autores realizaram a determinação do teor de AG em outros sistemas (ROSA et al, 2013; ROBERT et al, 2012). Li e colaboradores (2011) desenvolveram nanopartículas de ouro contendo AG, onde obtiveram uma eficiência de encapsulação de cerca de 81%. Posteriormente, nanoesferas de quitosana e de xantana foram preparadas, onde apresentaram uma eficiência de encapsulação de 91,07% e 77,05%, respectivamente (ROSA et al, 2013). Nagpal e colaboradores (2013), através de um estudo de planejamento fatorial, obtiveram valores de eficiência de encapsulação do AG em

nanoesferas de quitosana de 97,24%. Portanto, a eficiência de encapsulação encontrada neste trabalho corrobora com os descritos na literatura. Além disso, os lipossomas furtivos desenvolvidos podem permitir ao fármaco um tempo maior de circulação na corrente sanguínea e maiores possibilidades de chegar à célula alvo. Nos tratamentos anticancerígenos, os sistemas furtivos proporcionam a redução da incidência de efeitos tóxicos em relação às células normais, redução da dose do agente quimioterápico para um dado grau de resposta terapêutica, melhorando assim a eficácia terapêutica (HALEY; FRENKEL, 2008).

6 CONCLUSÕES

Concluimos que lipossomas contendo AG foram obtidos e caracterizados através de parâmetros indispensáveis para a obrigatoriedade do controle de qualidade das vesículas. A encapsulação do AG no nanossistema lipossomal é inédita e foi bem sucedida, com uma alta eficiência de encapsulação, em consonância com a literatura quanto a outros sistemas de liberação controlada que encapsularam este fármaco. O método desenvolvido e validado por CLAE para quantificação do AG exibiu cromatogramas simétricos e com uma boa eficiência da coluna. Além de apresentar-se dentro das diretrizes internacionais de padronização caracterizando-se como exato, preciso e reprodutível, sendo capaz de quantificar o AG em lipossomas.

7 PERSPECTIVAS

Para contribuir com o refinamento da presente pesquisa faz-se necessário a aplicação de análises que garantam que o AG não sofreu degradação após a encapsulação em lipossomas, acompanhado de um estudo de estabilidade dos nanosistemas, além da aplicação do método de quantificação por CLAE em outras formas farmacêuticas desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa. Como perspectivas apontamos a avaliação da eficácia terapêutica dos nanossistemas contendo ácido gálico em um estudo antitumoral *in vivo* frente à linhagem tumoral de sarcoma 180, e a elucidação dos possíveis mecanismos de ação responsáveis por esta atividade biológica.

REFERÊNCIA

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); *Resolução RE nº 899* de 29/05/2003.
- BATISTA, C. M., CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas : Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, 2007.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. FONTES E APLICAÇÕES DE TANINOS E TANASES EM ALIMENTOS. **Aliment. Nutri**, v. 15, n 1, p. 63–72, 2004.
- 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, 1 maio 2004.
- 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.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, ago., 2016.
- 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, 1 dez. 2013.
- BOWEY, K.; TANGUAY, JF.; TABRIZIA, M. Liposome technology for cardiovascular disease treatment and diagnosis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 2, p. 249-265, jan. 2012.
- 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.
- 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 et al. LC Determination of Gallic Acid in Preparations Derived from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Chromatographia**, v. 69, p. 249-253, jun. 2009.
- 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, dez. 2013.
- EDWARDS, K. A; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, n. 5, p. 1421–31, 28 mar. 2006.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161–71, mar. 2005.

FDA. Guidance for industry - Bioanalytical Method Validation. US department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, 2001. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>

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, 1 jul. 2004.

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

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, abr. 2010.

HALEY B, FRENKEL E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urol Oncol**, v. 26, p. 57-64, 2008.

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.

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, 5 set. 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, 15 jan. 2010.

International Conference on the Harmonization (ICH). Validation of analytical procedures. Text and Methodology – Q2 (R1). Genova, 2005.

JAIN, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. **Clinica Chimica Acta**. v. 358, n 1-2, p. 37-54, 2005

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, set. 2009.

KHAN, N. M. Controlled release oral dosage forms: some recent advances in matrix type drug delivery systems. **The Sciences**, v. 1, n. 5, p. 350-354, 2001.

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, maio 2006.

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.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 307–21, jul. 1998.

LASIC, D. D.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Liposomes revisited. **Science (New York, N.Y.)**, v. 267, n. 5202, p. 1275–6, 3 mar. 1995.

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

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, maio 2012.

LIRA et al. Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, p. 215–224, ago. 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, nov. 2013.

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, fev. 2013.

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, 1 set. 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, 8 jan. 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, out. 2013.

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, abr. 2012.

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, 30 dez. 2009.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB J**, v.19, p.311-330, 2005.

MOSQUEIRA, V. C. F. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

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

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Optimization of brain targeted gallic acid nanoparticles for improved antianxiety-like activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 57, n. 0436, p. 83–91, jun. 2013.

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, 15 jan. 2013.

NEO, Y. P. et al. Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3192–200, 1 dez. 2013.

NIHO, N. et al. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 39, n. 11, p. 1063–70, nov. 2001.

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, abr. 2008.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposomes preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 177, p. 8-18, jan. 2014.

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.

POLEWSKI, K.; KNIAT, S.; SLAWINSKA, 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.

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, maio 2008.

ROBERT, P. et al. Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 1–8, set. 2012.

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

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Cienc. Cult.** v. 60, n. 2, 2008.

SAGRISTÁ, M. L.; MORA, M.; MADARIAGA, M. A. Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, Washington, v. 5, p. 19–33, 2000.

SAKAGUCHI, N.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Reactive oxygen species and intracellular Ca^{2+} , common signals for apoptosis induced by gallic acid. **Biochemical pharmacology**, v. 55, n. 12, p. 1973–81, 15 jun. 1998.

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.

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, jan. 2012.

SHAFFER, C. Nanomedicine transforms drug delivery. **Drug Discovery Today**. v. 10, p.1581-1582, 2005.

SU, H. et al. Fluorescence detection of cyromazine using gallic acid-reduced gold nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 174, p. 458–464, nov. 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 jan. 2014.

SWARBRICK, J. **Advances in controlled drug delivery**, v.6, n.1, p. 53-60, 1996.

THOMAS, V.; DEAN, D. R.; VOHRA, Y. K. Nanostructured biomaterials for regenerative medicine. **Current Nanoscience**. v. . 2, n 3, p. 155-77, 2006.

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

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

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, abr. 2003.

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

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

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, dez. 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, maio 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, ago. 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, 1 mar. 2011.

WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**. v. 68, p 115–121, jan. 2000.

WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Determination of hamamelitannin, catechins and gallic acid in witch hazel bark, twig and leaf by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 539-544, nov. 2003.

**APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO: NANOENCAPSULATION OF GALIC ACID
IN STEALTHY LIPOSOMES AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD BY
HIGH EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)**

Laís M. F. Santos ^{a,b}, Milena S. Ferraz ^a, Camilla V. N. S. Silva ^a, Rafaela S. Ferraz ^a, Victor P. Gibson ^a, Maria da Paz C. Silva ^{a,b}, Nereide S. Santos-Magalhães ^{a*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

**** Corresponding author**

Prof. Nereide Stela Santos-Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil.

Phone: + 55 81 21268587; Fax: +55 81 21268485

E-mail: nssm@ufpe.br

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Chromatography B (FI:2.487; QUALIS CB II: B1)

SUMMARY

The objective of this work was to develop and characterize stealth liposomes as carrier vehicle for gallic acid (GA) and validate a high efficiency liquid chromatography (HPLC) method for the determination of GA in nanosystems. Liposomes were prepared by lipid film hydration method and characterized by determination of particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential. The chromatographic system had as its stationary phase a C18 reverse phase column, mobile phase composed of 1% acetic acid and acetonitrile in a ratio of 20:80 (v / v), 1 mL/min flow at 25 ° C and detection at 272 nm . Stealth liposomes containing GA were obtained with mean vesicle size of 81.9 ± 0.4 nm, PDI = 0.235, pH = 6.6 and zeta potential = -30.0 ± 1.4 mV. The analytical method developed showed a retention time of 2.65 min, T = 1.33, and equivalent height of the theoretical plate (HEPT) of 0.12, N> 2000. The linearity range of the GA analytical curve was 10 to 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, adjusted by the following regression equation: peak area = $1,102 \times [\text{AG}] (\mu\text{g.mL}^{-1}) - 0.203$; R = 0.9999. The repeatability of the method was 2.83% and the intermediate precision indicated that the difference between the means was statistically insignificant (p <0.05). The method was robust despite the variation of temperature and flow. The limits of GA detection and quantification were 1.49 and 4.53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. Accuracy revealed an average recovery of the analyte of 100.9%. The assay and GA encapsulation efficiency in the liposomes was $99.30 \pm 1.56\%$ and $92.72 \pm 0.16\%$, respectively. The proposed method is accurate, precise and reproducible, being able to quantify gallic acid in liposomal preparations.

Keywords: Gallic acid; Furtive Liposomes; CLAE; Validation.

1. Introduction

Gallic acid (GA) (Figure 1), 3,4,5-trihydroxy-benzoic acid, is a phenolic substance, intermediary of the secondary metabolism of plants, originated by the biosynthetic route via shikimic acid, being a derivative of benzoic acid [1]. The GA is in the form of yellowish-white crystals having a molecular weight of 170.12 g / mol, a melting temperature of 250 ° C and a solubility in water of 1.1% at 20 ° C [2]. It presents a LogP of 0.89, much lower than most of its gallate derivatives, and can therefore be considered a relatively water soluble substance [3]. Linked to the benzene ring, the GA has a carboxylic group and three phenolic OH groups at the 3,4, and 5 positions. These groups have a dissociation constant (pKa) of 4.4; 8.2; 10.7 and 13.1, respectively [4]. The GA is in its ionized form above pKa 4.4 and in the neutral or non-dissociated form below that pKa [5].

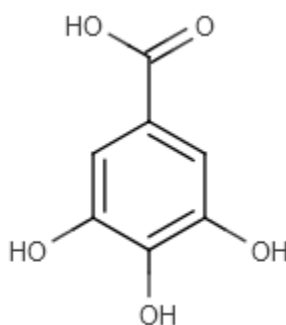


Figure 1. Structure of gallic acid (C₇H₆O₅).
Fonte: <http://www.chemicalize.org>

The GA molecule is unstable at extreme temperatures or in the presence of oxygen or still in the light [6]. Phenolic compounds are chemically very reactive and this reactivity can also be inferred to gallic acid, having, in general, acidic characteristics [1]. They are easily oxidized, either by specific plant enzymes or by the influence of metals (such as iron and manganese), light and heat, or in alkaline media, causing dimming of their solutions.

The GA is known to present a wide variety of biological activities, antioxidant [7], anxiolytic [8], neuroprotective [9], antidiabetic [10], antimicrobial [11,12] and antitumor [2]. Regarding the antitumor activity, the GA has many effects on several types of tumors, highlighting apoptotic [13], antiproliferative [14], antiangiogenic [15] and antimetastatic [16].

These actions make this drug an important biomolecule for therapeutic use. In addition, it presents selective cytotoxicity for cancer cells and low cytotoxicity for normal cells [2].

Despite the promising antitumor activity of GA, its instability to temperature, presence of oxygen and light restricts its therapeutic use. Therefore, to remedy these limiting properties, the use of nanotechnology may be an effective alternative for the future use of this drug.

Few studies have discussed the encapsulation of GA in nanometric-scale controlled release systems. In 2011, Li et al. [17] developed GA-coated gold nanoparticles to evaluate their antitumor activity against the HL-7702 (human hepatocyte) cell line. Nanosystems exhibited lower cytotoxicity when compared to free GA, justified by the oxidation of the GA molecule to its quinone form during the synthesis of the nanoparticles, as well as elucidating the importance of the hydroxyl groups of GA to the efficacy of the antitumor action. Recently, Nagpal and collaborators (2013) [8] prepared chitosan nanoparticles containing GA, optimized with Tween 80®. Nanosystems increased in vivo anxiolytic activity evidenced by the reduction in plasma nitrite levels in mice, a result not reflected in the groups treated with free GA and chitosan nanoparticles containing GA without Tween 80®. Also in 2013, Bitan-Cherbakovsky et al. [18], with the purpose of developing an efficient system to serve as a support for oral and transdermal application, chose GA as an anionic drug model and coencapsulated it with cationic dendrimers in lipid carriers through of electrostatic interactions.

Among the nanotechnology controlled drug release systems stands out liposomes, which are vesicles containing one or more concentric lipid bilayers, are separated by an aqueous medium. These systems have the ability to carry both hydrophilic and hydrophobic drugs, are biodegradable, biocompatible and non-immunogenic [19].

For long circulation of these systems into the bloodstream, and consequently the possibilities of reaching the target cells, long-lived liposomes, also known as stealth liposomes, have been developed in which a surface polymer layer is added which inhibits the molecular recognition process and capture by mononuclear phagocyte system (MPS) [20]. The most common method for surface modification is the use of a hydrophilic and non-ionic polymer, such as polyethylene glycol (PEG), a process called "PEGylation" [21].

In view of the above, it is suggested that the encapsulation of GA in stealth liposomes may protect the molecule from degradation, conferring protection and preservation in order to enable and increase its biological potential in future biological applications.

For this work, the objective was to develop and characterize stealth liposomes, as a carrier vehicle for gallic acid. It is also added to develop an analytical methodology by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the determination of GA in nanosystems.

2. Material and Methods

2.1 Reagents

Gallic acid and cholesterol were obtained from Sigma (St. Louis, USA). Poly(ethylene glycol)–distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE- PEG) and soy phosphatidylcholine were purchased from Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Germany). Solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 Preparation of Stealth Liposomes Containing Gallic Acid

Stealth liposomes containing gallic acid (GA-Lipo) were obtained by the lipid film hydration method [22]. GA (10 mg) and lipids (42 mM), soybean phosphatidylcholine (PC), cholesterol (CH) and Poly(ethylene glycol)–distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG) (7.5: 2.0: 0.5) were solubilized separately in a solution of chloroform: methanol (3: 1). Subsequently, the solution was rotated under reduced pressure to form a uniform lipid film. The lipid film was then hydrated using 10 mL of pH 6.8 phosphate buffer, with formation of multilamellar liposomes (MLV). To obtain small unilamellar liposomes (SUV), the MLV dispersion was subjected to ultrasonic probe shaking (Vibra Cell, BRANSON, USA) at 200 W and 40 Hz for 300 s. Non-drug stealthy liposomes (Lipo) were prepared by the same method for comparative stability study.

2.3 Physico-chemical Characterization of Stealth Liposomes

The mean size and the polydispersity index (PDI) of the liposomes were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) using DelsaTMNano-S laser particle analyzer (Beckman Coulter, California, USA). The zeta potential was determined on the

ZetasizerNano-ZS90 equipment (Malvern, Worcestershire, UK) using the electrophoretic mobility technique.

2.4. Development of Analytical Methodology for Quantification of Gallic Acid by HPLC

There is currently no validated method available for dosing the GA present in nanoparticulate controlled release systems using HPLC. Therefore, it has become necessary to develop a method for this purpose. First, the wavelength of higher GA absorbance was determined with UV-Vis spectrophotometer scanning between wavelengths of 200 and 400 nm at appropriate dilution from standard stock solution in acetonitrile.

2.4.1 Chromatographic Conditions

The quantification of GA was performed by HPLC using an isocratic method. Chromatographic analyzes were performed on Alliance 2695 (Waters, USA) equipment coupled to a 2998 diode arrangement detector (PDA) (Waters, USA), operated at 272 nm. A C18 reverse phase column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 mm, XBridge™ Waters) protected by a pre-column of the same composition (20 mm $\times$ 4.6 mm) was used with a mobile phase composed of acetonitrile: Water acidified with 1% acetic acid, pH 3.5, at a flow rate of 1.0 mL / min at 25 ° C and an injection volume of 20 μ L. Different proportions of mobile phase were used to evaluate the best chromatogram. The performance of the chromatographic system was evaluated from the following parameters: number of theoretical plates (N), tail factor (T) and equivalent height of the theoretical plate (HEPT), observing the chromatograms obtained in the concentration of 50 μ g / mL.

2.4.2 Preparation of Samples

The GA analytical curve was prepared from dilutions of a stock solution in acetonitrile (1 mg / mL), varying the concentrations from 10 to 100 μ g.mL⁻¹. The standard stock solution was prepared by transferring 10 mg of GA to a 10 mL volumetric flask and solubilizing in acetonitrile, and subjected to sonication for 5 minutes. Then, appropriate dilutions were performed with acetonitrile to obtain a standard curve at six different concentration levels of GA: 10, 20, 40, 60, 80 and 100 μ g.mL⁻¹.

2.4.3 Validation of Proposed Method for quantification of gallic acid in liposomes

For the validation of the analytical method for quantification of GA in stealth liposomes, the validation parameters were evaluated according to the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Human Pharmaceutical Products (ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) [23].

2.4.3.1 Linearity

For the determination of linearity, three authentic standard curves were performed in triplicate with six different concentrations of GA (10, 20, 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A linear correlation was established between concentration, considered independent variable (x), and relation between the areas of the chromatographic peaks of the drug and the internal standard, considered dependent variable (y). Correlation parameters were estimated using the least squares method.

2.4.3.2 Accuracy

Accuracy was assessed by the method of recovery of analyte added in known quantities to the placebo liposomal formulation at three different concentrations: 10, 50 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, corresponding respectively to 20, 100 and 200% of the test concentration. All samples were prepared in triplicate ($n = 9$). The coefficient of variation and percentage of recovery were used to evaluate the accuracy, defined as:

$$\text{Accuracy} = \left(\frac{\text{Concentration obtained}}{\text{Theoretical concentration}} \right) \times 100$$

2.4.3.3 Precision

For the precision study, the concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of GA (test concentration) determined in different solutions ($n = 6$) was used. The analyzes were performed on two

different days (inter-day), by two different analysts (intra-day). The means of the obtained results were evaluated by Student's t-test (bilateral test, $p < 0.05$).

2.4.3.4 Robustness

The robustness of the proposed method was verified by the analysis temperature variation (25 ° C and 30 ° C) and flow variation (1.0 mL / min and 1.2 mL / min). The 50 µg.mL⁻¹ concentration of GA was determined in six different assays. The robustness evaluation was performed by analyzing the coefficients of variation between the means obtained using Student's t-test (bilateral test, $p < 0.05$).

2.4.3.5 Limits of detection (LD) and quantification (LQ)

The limits of detection (LD) and quantification (LQ) were estimated mathematically from the standard curve resulting from the average of the three authentic calibration curves. The calculation to determine the corresponding values is based on the standard deviation of the regression line residual and its relation to the slope of the line (angular coefficient) in the standard curve. To determine the LD and LQ, the following equations were used:

$$LD = \left(\frac{SD}{I} \right) \times 3,3$$

$$LQ = \left(\frac{SD}{I} \right) \times 10$$

Where LD is the limit of detection; LQ is the limit of quantification; SD is the standard deviation of the intercept with respect to the Y axis and I is the slope of the calibration curve.

2.5 Determination and encapsulation efficiency of liposomes containing gallic acid

For determination of GA in liposomal form, an aliquot of the formulation (50 µL) was transferred to an eppendorf. Then, 950 µL of acetonitrile was added to the sample. The solution was shaken for 1 min to disrupt the lamellar structure of the liposomes and release

the encapsulated GA content. Finally, the solution was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatant was filtered on Millex® filters (0.22 µm, Millipore, USA). The theoretical GA concentration in the sample was 50 µg.mL⁻¹. Dosing assays were performed in triplicate.

The drug encapsulation efficiency was determined by the ultrafiltration / centrifugation method, where 400 µL of the liposomes were placed in Amicon® Ultra filter units (Millipore, USA) and centrifuged at 10,000 rpm for 1 h. An aliquot of the ultrafiltrate was then diluted in acetonitrile and subjected to HPLC readout.

3. Results and discussion

3.1 Physico-chemical characterization of liposomes

Furtive liposomes were prepared by the lipid film hydration method and the physico-chemical characterization data for Lipo and GA-Lipo, particle size, PDI, pH and zeta potential are presented in Table 1.

Table 1

Physico-chemical characterization of furtive liposomes containing gallic acid after preparation.

Formulations	Particle Size (nm) ±SD*	Polydispersity		Zeta potencial (mV) ±SD*
		index (PDI)	pH	
Lipo*	84.5 ± 1.9	0.224	6.8	-33.4 ± 0.15
GA-Lipo*	81.9 ± 0.4	0.235	6.6	-30.0 ± 1.40

* SD=standard deviation, n=3; Lipo= non-drug stealth liposomes; GA-Lipo=stealth liposomes containing gallic acid.

The colloidal suspensions exhibited a moderately polydispersed vesicle size distribution (Table 1), thus classified as having PDI between 0.1 and 0.4 nm [24]. In addition to presenting suitable sizes for colloidal dispersions in gauge scale.

After GA encapsulation in the liposomes, a small variation in the pH of the liposomal formulation occurred (Lipo = 6.8; GA-Lipo = 6.6), however this change does not compromise the GA stability, since the pH remains acidic. Care taken in the choice of buffer pH for GA solubilization and preparation of liposomes, as it is easily oxidized at alkaline pH [5].

The zeta potential results are shown in Table 1, where both formulations exhibited negative zeta potential.

3.2 Development of analytical methodology for quantification of gallic acid by HPLC

The scanning spectrum of the GA in acetonitrile revealed two peaks of maximum absorbance at wavelengths of 216 nm and 272 nm (Figure 2), corroborating data reported in the literature [5]. However, the wavelength chosen for GA quantification was 272 nm, due to the lower interference of the lipid excipients of the liposomal formulation.

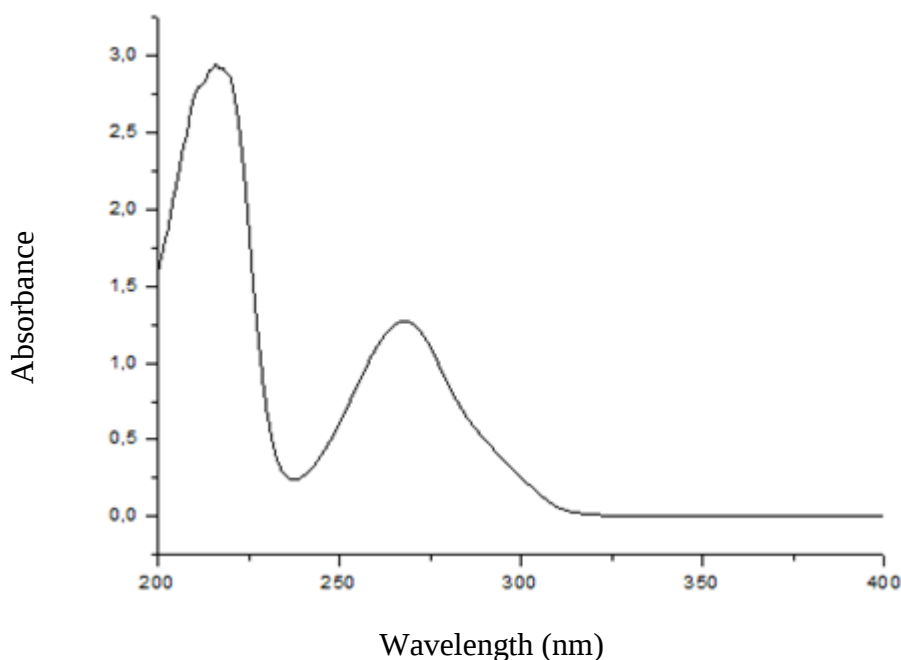


Figure 2. Scan spectrum of gallic acid in acetonitrile.

For optimization of the mobile phase to be used in the quantification of GA, the ratio of acetonitrile to acidified water was varied from 60:40 to 90:10, in order to improve the resolution of the chromatogram (Figure 3). Chromatographic parameters, number of theoretical plates (N), tail factor (T) and height equivalent to a theoretical plate (HETP) were also calculated (Table 2). As the proportion of the organic solvent increased, there was a better resolution of the chromatogram, since there was an increase in the number of theoretical plates and a decrease in HETP, that is, a better efficiency of the chromatographic column (Figure 3A-C). However, in the ratio of acetonitrile: water 90:10 (Figure 3D), a reduction in the number of theoretical plates and increase in the tail factor of the peak was observed. Considering these results, the ratio chosen for the GA analytical curve preparation was 80:20 acetonitrile: water (Figure 3C). The method developed was specific for GA with

retention time of 2.65 minutes, allowing the total analysis time for each sample to be 5 minutes.

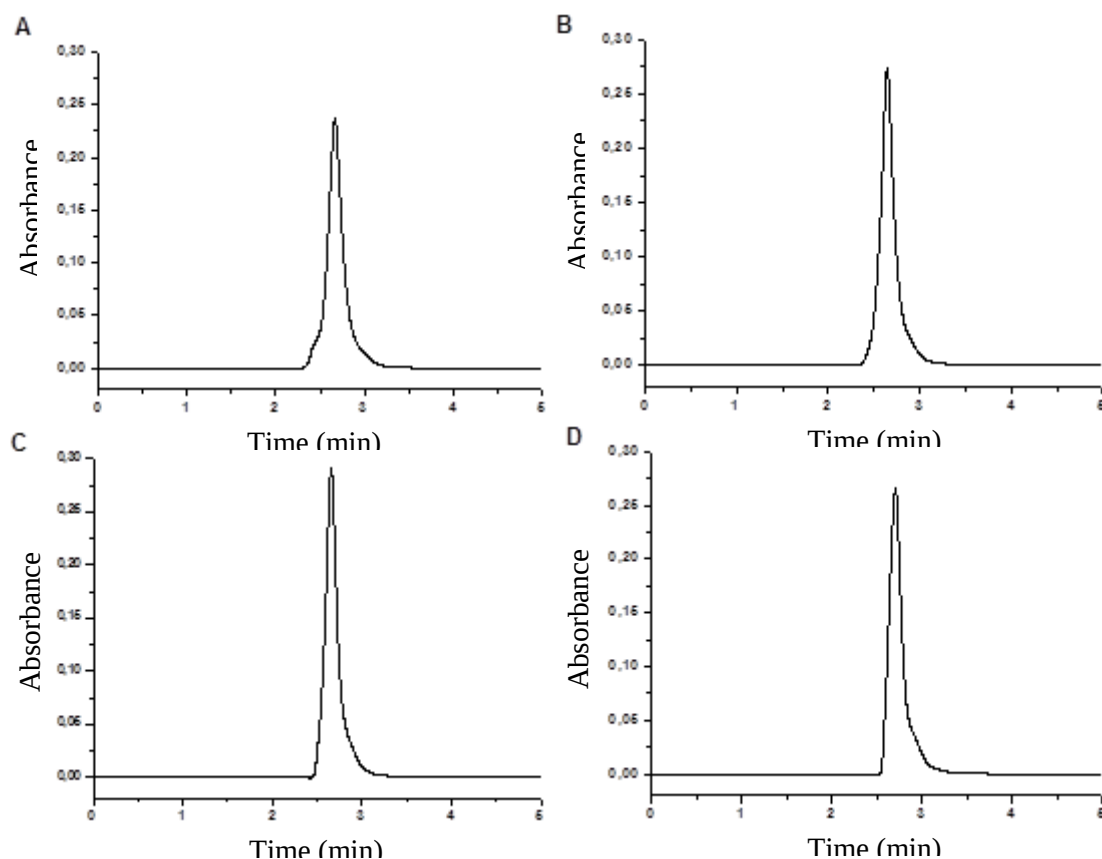


Figure 3. Chromatographic analysis of gallic acid at the concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in different proportions of acetonitrile: acidified water: (A) 60:40; (B) 70:30; (C) 80:20 and (D) 90:10.

The proposed method met the requirements within the recommended limits [25] according to data presented in Table 2. The efficiency of the column increases with the number of theoretical plates, which should be above 2000 to present adequate efficiency, which was also verified by the decrease the height of the theoretical plates. The tail factor values, close to one, are ideal because they indicate the symmetry of the peaks. In addition, the use of acid in the mobile phase is essential to prevent the ionization of the hydroxyl groups present in the phenolic compounds, allowing a better symmetry of the peak [26]. This assertion is consistent with the pK_a value of 4.4 of the GA, and emphasizes the use of the pH around 3.5 of the acidified water, constituent of the mobile phase, where the GA is in its undissociated form.

Table 2

Parameters of gallic acid chromatograms obtained in different proportions of solvents by HPLC.

Parameters	Recommended limits	Solvent content acetonitrile: water			
		60:40	70:30	80:20	90:10
N*	N > 2000	1282	1680	2073	1758
T*	T < 2	1.02	1.12	1.33	1.4
HETP*	HEPT < 0.15	0.19	0.14	0.12	0.14

* N= Number of theoretical plates; T= Peak tail factor; HETP= Equivalent height of the theoretical plate.

3.2.1 Linearity

The analytical curve data, resulting from the mean of three replicates, were adjusted by linear regression analysis (Table 3). The method was linear between the concentrations studied, from 10 to 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The linear regression equation obtained was $y = -0.203x + 1.102$, where y is the absorbance (area) and x the concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) in GA equivalents.

Table 3

Analytical curve of gallic acid in acetonitrile at 272 nm.

Theoretical concentration of GA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Mean area value (mAU/min) $\pm$ SD*	Concentration obtained from GA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) $\pm$ SD*
10	11.27 $\pm$ 0.31	10.04 $\pm$ 0.28
20	21.9 $\pm$ 0.43	19.69 $\pm$ 0.39
40	43.12 $\pm$ 0.16	38.95 $\pm$ 0.15
60	66.3 $\pm$ 1.02	59.98 $\pm$ 0.93
80	87.34 $\pm$ 1.28	79.07 $\pm$ 1.64
100	110.59 $\pm$ 1.07	100.17 $\pm$ 0.97

* SD= standard deviation, n=9.

The correlation coefficient obtained was 0.9999, meaning that 99.97% of the total variation around the mean is explained by the linear regression, proving the adequacy of the method to the evaluated interval. Data from the regression analysis are summarized in Table 4. The estimated detection (LD) and quantification (LQ) values were 1.49 and 4.53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively (Table 4). With these results, it is verified that the method has high sensitivity to detect and quantify the GA.

Table 4

Parameters of the CLAE method for GA quantification.

Parameters	Values
Measuring wavelength (nm)	272
Linear band ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10-100
Intercept $\pm$ (desvio padrão)	-0.203 ($\pm$ 0.499)
Inclination $\pm$ (desvio padrão)	1.102 ($\pm$ 0.008)
Coefficient of correlation (r^2)	0.9997
Detection limit, LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1.49
Limit of quantification, LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	4.53

3.2.2 Precision

Precision was assessed by repeatability (inter-day) and intermediate precision (intra-day) studies. In this study, the Student's t-test evaluated the possible existence of a statistically significant difference between the means obtained for the tests performed on different days and with different analysts. As can be seen in Table 5, in all cases the calculated t was always lower than the critical t, demonstrating that there was no statistically significant difference between the means, that is, the results obtained expressed the same value ($p < 0.05$).

Table 5

Evaluation of the accuracy of the HPLC method for GA quantification.

Intra-day						
Theoretical concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Analyst 1</i>		<i>Analyst 2</i>		$t_{\text{calculated}}$	t_{critical}^*
	CM $\pm$ SD	RSD (%)	CM $\pm$ SD	RSD (%)		
50	50.79 $\pm$ 0.76	1.51	51.16 $\pm$ 1.21	2.38	0.12	2.23
Inter-day						
Theoretical concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Day 1</i>		<i>Day 2</i>		$t_{\text{calculated}}$	t_{critical}^*
	CM $\pm$ SD	RSD (%)	CM $\pm$ SD	RSD (%)		
50	50.79 $\pm$ 0.76	1.51	49.88 $\pm$ 1.43	2.86	0.19	2.23

CM= Mean Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of six determinations; SD= Standard Deviation; RSD (%)=Relative Standard Deviation. * Tabulated value of t (bilateral test, $p < 0.05$).

3.2.3 Accuracy

Accuracy was verified for three levels of concentration: low, medium and high. The experimental data obtained revealed an average recovery of the analyte of 100.9% (99.7-101.6%) and that the highest coefficient of variation was about 3.23% (Table 6). The results of the accuracy study demonstrate that small variations in the concentration of GA can be readily quantified by the method, as well as there is no interference of the excipients of the liposomal form in the assay of the final product, so the analytical method developed is accurate.

Table 6

Accuracy results for three levels of different concentrations of GA.

Concentration of GA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				Statistic data		
Theoretical	Experimental			Average	SD*	RSD (%)*
10	10.30	10.13	10.06	10.05	0.24	2.37
50	49.07	50.55	52.21	50.61	1.57	3.10
100	103.44	97.48	98.30	99.74	3.22	3.23

* SD= Standard Deviation; RSD (%)=Relative Standard Deviation.

3.2.4 Robustness

The temperature and flow analysis did not affect the GA absorbance. The mean concentrations obtained for the analyzes of solutions conditioned at 25 ° C and 30 ° C were $49.06 \pm 0.33 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The flow change resulted in mean concentrations of $50.68 \pm 1.78 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Among all the experimental results, the maximum coefficient of variation found was 3.51%. According to Student's t-test there was no statistically significant difference between the results obtained when the analysis temperature (0.78) or the flow (0.06) was changed during the analysis. Thus, in the 95% confidence level the variations of the analyzed parameters do not influence the GA quantification.

Few validation methodologies for quantification of GA by HPLC are reported in the literature, and in all, the drug is in mixtures of polyphenolic components. Wang et al. (2000) developed an isocratic method (mobile phase composed of methanol, water and orthophosphoric acid, in proportions of 20: 79.9: 0.1%) for the detection of GA in a mixture

with catechins and caffeine in green tea, Having the detection wavelength of 210 nm [27]. In 2003, another analytical method for the detection of GA, hamamelitanin and catechins in bark, branches and leaves of witch hazel was validated by Wang et al. [28]. In this case, the use of gradient mobile phase (0.1% orthophosphoric acid in water, Elution A, and 0.1% orthophosphoric acid in methanol, elution B) was required where variable solvent ratios are required during the analytical run, and the detection of the constituents was repeated at 210 nm.

This wavelength would not be adequate for quantification of the GA in liposomes because it would suffer interference from the lipid constituents of the liposomal dispersion. Therefore, the method developed and validated in this work is an important tool to support research that requires an exact and precise quantification of gallic acid in its pure form and in pharmaceutical preparations.

3.3 Determination and encapsulation efficiency of liposomes containing gallic acid

The total drug concentration (content), in turn, is generally determined by disruption of the suspended particles and solubilization of the released drug in a suitable solvent. Therefore, the drug concentration associated with the nanostructures is calculated by the difference between the total and free drug concentrations. An ideal delivery system should have a high capacity for drug encapsulation, thus reducing the amount of matrix materials administered.

After the development of the analytical methodology, the GA present in the liposomal formulations was quantified, where a content and an drug encapsulation efficiency of $99.30 \pm 1.56\%$ and $92.72 \pm 0.16\%$ were obtained, indicating the efficacy of the developed method.

Currently, there is no available in the literature a validated method for dosing the GA present in nanoparticulate controlled release systems using HPLC, nor the development of liposomes containing this drug. However, some authors have performed the determination of GA content in other systems [6,29]. Li et al. (2011) [17] developed gold nanoparticles containing GA, where they obtained an encapsulation efficiency of about 81%. Subsequently, chitosan and xanthan nanospheres were prepared, where they presented an encapsulation efficiency of 91.07% and 77.05%, respectively [6]. Nagpal and collaborators (2013) [8], through a factorial planning study, obtained values of GA encapsulation in chitosan

nanospheres of 97.24%. Therefore, the encapsulation efficiency found in this work corroborates those described in the literature. In addition, the stealthy liposomes developed can allow the drug a longer time to circulate in the blood stream and greater possibilities of reaching the target cell. In anticancer treatments, stealthy systems provide a reduction in the incidence of toxic effects compared to normal cells, reducing the dose of the chemotherapeutic agent to a given degree of therapeutic response, thus improving therapeutic efficacy [30].

4. Conclusion

In the present study, stealthy liposomes containing GA stable, nanometers and with negative zeta potential were prepared. The analytical method by HPLC developed showed symmetrical chromatograms with good column efficiency. In addition, it was linear, accurate, accurate and reproducible in the range used. The method was applied to quantify GA encapsulated in liposomal forms, after disruption of the liposomes with solvent, without interference of the constituents of the formulation, revealing a high encapsulation efficiency of the drug in these systems. The analytical method by HPLC is, therefore, a tool in the quality control routine of the GA contained in liposomes.

References

- 1] J. C. T. Carvalho, G. Gosmann, E. P. Schenkel. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS. 5 (2004) 519.
- [2] S. Verma, A. Singh, A. Mishra. Environmental toxicology and pharmacology. 35 (2013) 473.
- [3] C. J. Bennett, S. T. Caldwell, D. B. McPhail, P. C. Morrice, G. G. Duthie, R. C. Hartley. Bioorganic & medicinal chemistry. 12 (2004) 2079.
- [4] R. Melo, J. P. Leal, E. Takács, L. R. Wojnárovits. Journal of hazardous materials. 172 (2009) 1185.
- [5] K. Polewski, S. Kniat, D. Slawinska, Current Topics in Biophysics. 26 (2002) 217.
- [6] C. G. Rosa, C. D. Borges, R. C. Zambiasi, M. R. Nunes, E. V. Benvenutti, S. R. da Luz, R. F. D'Avila, J. K. Rutz. Industrial Crops and Products. 46 (2013) 138.
- [7] S. M. Fiuza, C. Gomes, L. J. Teixeira, M. T. Girão da Cruz, M. N. D. S. Cordeiro, N. Milhazes, F. Borges, M. P. M. Marquesa. Bioorganic & medicinal chemistry. 12 (2004) 3581.

- [8] K. Nagpal, S. K. Singh, D. N. Mishra. International journal of biological macromolecules. 57 (2013) 83.
- [9] M. T. Mansouri, B. Naghizadeh, B. Ghorbanzadeh, Y. Farbood, A. Sarkaki, K. Bavarsad. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 111 (2013) 90.
- [10] J. Liu, J-F Lu, J. Kan, C-H Jin. International journal of biological macromolecules. 62 (2013) 321.
- [11] R. Díaz-Gómez, R. López-Solís, E. Obreque-Slier, H. Toledo-Araya. LWT - Food Science and Technology. 54 (2013) 331.
- [12] Y.P. Neo, S. Swift, S. Ray, M G-N, J. Jin, C. O. Pereca. Y. P. Food chemistry. 141 (2013) 3192..
- [13] B. R. You, W. H, Park. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA. 24 (2010) 1356.
- [14] S. Madlener et al. Cancer letters. 245 (2007) 156.
- [15] Y. Lu, F. Jiang, H. Jiang, K. Wu, X. Zheng, Y. Cai, M. Katakowski, M. Chopp, S-S T. To. European journal of pharmacology. 641 (2010) 102.
- [16] H-H. Ho, C-S. Chang, S-Y. Liao, C-J. Wang. et al. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 48 (2010) 2508.
- [17] D. Li, Z. Liu, W. Zhao, X. Yanli, F. Niu D. Process Biochemistry. 46 (2011) 2210.
- [18] L. Bitan-Cherbakovsky, A. Abraham, N. Garti. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces. 112 (2013) 87.
- [19] M. C. Batista, C. M. B. Carvalho, N. S. S. Magalhães. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 43 (2007) 165.
- [20] M. L. Sagristá, M. Mora, M. A. Madariaga. Cell. Mol. Biol. Lett. 5 (2000) 19.
- [21] V. C. F. Mosqueira, P. Legrand, A. Gulik, O. Bourdon, R. Gref, D. Labarre, G. Barratt. Biomaterials. 22 (2001) 2967.
- [22] M. C. B. Lira, M. S. Ferraz, D. G. V. DA Silva, M. E. Cortes, K. I. Teixeira, N. P. Caetano. R.D. Sinisterra, G. Ponchel, N. S. Santos-Magalhães. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. 64 (2009) 215.
- [23] International Conference on the Harmonization (ICH). Validation of analytical procedures. Text and Methodology – Q2 (R1). Genova, 2005.
- [24] S. Bhattacharjee. Journal of Controlled Release. 235 (2016) 337.

- [25] US FDA. Guidance for industry - Bioanalytical Method Validation. US department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, 2001. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
- [26] M. G. Carvalho. *Chromatographia*. 69 (2009) 249.
- [27] H. Wang, K. Helliwell, X. You. *Food Chemistry*. 68 (2000) 115.
- [28] H. Wang, G. J. Provan, K. Helliwell. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (2003) 539.
- [29] P. Robert, P. García, N. Reyes, J. Chávez, J. Santos. *Food Chemistry*. 134 (2012) 1.
- [30] B. Haley, E. Frenkel. *Urol Oncol*. 26 (2008) 57.

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B

INTRODUCTION

The Journal of Chromatography B publishes papers on developments in separation science relevant to biology and biomedical research including both fundamental advances and applications.

Analytical techniques which may be considered include the various facets of chromatography, electrophoresis and related methods, affinity and immunoaffinity-based methodologies, hyphenated and other multi-dimensional techniques, and microanalytical approaches. The journal also considers articles reporting developments in sample preparation, detection techniques including mass spectrometry, and data handling and analysis.

Developments related to preparative separations for the isolation and purification of components of biological systems may be published, including chromatographic and electrophoretic methods, affinity separations, field flow fractionation and other preparative approaches.

Applications to the analysis of biological systems and samples will be considered when the analytical science contains a significant element of novelty, e.g. a new approach to the separation of a compound, novel combination of analytical techniques, or significantly improved analytical performance. Areas to be considered include:

- the qualitative and quantitative analysis of biopolymers including proteins, peptides and their post-translational modifications as well as nucleic acids and glycans
- the comparative analysis of biological systems using proteomics, genomics, metabonomics and other "omics" approaches
- clinical analysis, pharmacokinetics, metabolism, therapeutic drug monitoring, toxicological analysis, doping analysis, veterinary applications, analysis of environmental contaminants in biological systems
- the screening and profiling of body fluids, tissues, cells, biological matrices and systems, analysis of endogenous compounds, biomarkers
- identification of new bioactive compounds Applications which utilize published or commercial analytical or preparative protocols with little or no modification or where the results of the application rather than the analytical methodology comprise the major element of novelty of the manuscript should be directed to more specialized journals. Modifications to a previously published method may be considered for a short communication in cases where the improvement in performance is significant. Reports of analytical methods for compounds in early pharmaceutical development often lack general interest and will not be published unless the authors can demonstrate the broader significance of the methodology involved.

Quality control analyses of bulk drugs, natural products or pharmaceutical formulations are not within scope.

Types of Paper

The following types of papers are published in the Journal of Chromatography B: Regular research papers (full-length papers), Review articles, Short Communications, Discussions, and Letters to the Editor. Review articles are invited or proposed in writing to the Editors, who welcome suggestions for subjects. An outline of the proposed Review should first be forwarded to the Editors for preliminary discussion prior to preparation. Short Communications are usually descriptions of short investigations, or they can report technical improvements of previously published procedures: they reflect the same quality of research as full-length papers, but should preferably not exceed five printed pages (typically no more than 2850 words (including title, authors and references), with no more than five figures and tables combined).

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles
Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles
Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:
Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

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

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Access

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-

commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Every paper must be accompanied by a letter from the senior author, stating that he/she is submitting the paper for publication in the Journal of Chromatography B.

Please submit your article via <http://www.elsevier.com/locate/jchromb>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature

Widely accepted symbols, abbreviations and units (SI) should be used. If there is any doubt about a particular symbol or abbreviation, the full expression followed by the abbreviation should be given the first time it appears in the text. Abbreviations used in tables and figures should be explained in the captions. In general, the recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) should be followed and attention should be given to the recommendations of the Analytical Chemistry Division in the journal *Pure and Applied Chemistry: Nomenclature for Chromatography*, *Pure Appl. Chem.*, 65 (1993) 819-872. Decimal points should be indicated by full stops. All decimal numbers smaller than unity should include a leading zero (e.g. 0.11).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. Table footnotes Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic

artwork

General

points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
 TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do note:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to

'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

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

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

Vídeo data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal

will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by

the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.