

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ácido rosmarínico: complexação com ciclodextrinas, avaliação do potencial antioxidante *in vitro* e estudo de compatibilidade com excipientes com vistas ao desenvolvimento de formulação sólida oral.

KLEYTON SANTOS VERAS

PORTO ALEGRE, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ácido rosmarínico: complexação com ciclodextrinas, avaliação do potencial antioxidante *in vitro* e estudo de compatibilidade com excipientes com vistas ao desenvolvimento de formulação sólida oral.

Dissertação apresentada por **Kleyton Santos Veras** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Letícia Scherer Koester

PORTO ALEGRE, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.03.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cássia Virginia Garcia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. George González Ortega  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Veras, Kleyton Santos

Ácido rosmarínico: complexação com ciclodextrinas, avaliação do potencial antioxidante in vitro e estudo de compatibilidade com excipientes com vistas ao desenvolvimento de formulação sólida oral / Kleyton Santos Veras. -- 2017.

116 f.

Orientador: Letícia Scherer Koester.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Ácido rosmarínico. 2. Ciclodextrina. 3. Antioxidante. 4. Compatibilidade. I. Koester, Letícia Scherer, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento CNPq e CAPES. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, razão da minha, em quem coloco toda a minha esperança, por ter me dado fé quando pensei que não seria capaz de conseguir.

À minha família, que me deu asas para voar enquanto insistia em manter meus pés no chão. Vocês sonham muito mais além para mim do que a minha visão alcança. Muito obrigado! Amo vocês!

À Professora Letícia Scherer Koester, pela oportunidade de realizar um mestrado na UFRGS mesmo sem me conhecer pessoalmente, pelos ensinamentos e correções devidos na condução deste trabalho.

Aos Professores Helder Ferreira Teixeira e Valquíria Linck Bassani pelas pontuações e apoio.

Aos meus amigos, Layara Brandão e William Braga: a distância é apenas uma limitação física que não impede ou enfraquece a verdadeira amizade. Obrigado! Vocês são meus grandes incentivadores.

Aos GnosiaFriends, Jéssyca Wan Lume, Ludmilla Mesquita, Orlene Nascimento, Tálison Ferreira e Will Mesquita. Cada retorno meu à São Luís é como se eu nunca tivesse ido embora. Obrigado pela amizade e momentos compartilhados.

À Carliane Rosa, de uma procura à sala onde seria a aula de Química Orgânica I nasceu uma amizade. Muito obrigado pela tua companhia nestes 7 anos e que espero dure por muito mais.

Aos queridões do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, 606. Vocês tornaram minha adaptação muito mais fácil e agradável. Valeu muito mais a pena mudar de Estado por tê-los conhecido do que por qualquer título.

Em especial à Mariana Colombo, Lucélia Balestrin e Tainá Kreutz, por mais do que companheirismo no laboratório, mas pela amizade fora dele. Obrigado, queridonas!

À Flávia Fachel e Vanessa Pittol, pelo auxílio na execução de várias metodologias executadas neste trabalho. Ele também é fruto do trabalho de vocês.





Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pelo apoio e estrutura física que propiciaram a realização deste projeto.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.



## RESUMO

**Introdução:** O ácido rosmarínico (AR) é um composto fenólico que apresenta inúmeras atividades biológicas, dentre estas, destaca-se a atividade antioxidante. Entretanto, a biodisponibilidade do AR por via oral é de apenas 0,91 a 5,0%, fator que pode estar relacionado à sua solubilidade, estabilidade em meio gastrointestinal e mecanismo de absorção. Ciclodextrinas (CDs) são excipientes farmacêuticos utilizados com o objetivo de promover a absorção oral de fármacos por propiciarem aumento de solubilidade, estabilidade química e permeação pela membrana intestinal a partir da complexação com o fármaco. Tendo em vista o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica, estudos de compatibilidade entre o fármaco e excipientes se fazem necessários. **Objetivo:** Obter complexo do AR com CDs derivadas, avaliar a atividade antioxidante dos complexos e compatibilidade entre excipientes. **Materiais e métodos:** Estudo de solubilidade de fase foi realizado para se determinar estequiometria e constante de estabilidade entre o AR e duas CDs: HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD. Os complexos foram obtidos por liofilização e caracterizados por métodos espectroscópicos, calorimétrico e microscópico. A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH e estudo de compatibilidade entre excipientes foi realizado por método espectroscópico, calorimétrico e cromatográfico. **Resultados:** O AR apresentou proporção estequiométrica 2:1 AR:CD e alta constante de estabilidade. Os métodos de caracterização permitiram inferir a presença de formação de complexo de inclusão e complexo de não-inclusão, nos quais uma molécula do AR estaria interagindo com prótons internos e outra estaria interagindo com prótons externos da CD. A atividade antioxidante dos complexos foi superior à apresentada pelo AR não complexado, demonstrando a ação das CDs sobre a doação de prótons do AR e o estudo de compatibilidade de excipientes não demonstrou incompatibilidades viabilizando a obtenção de formas farmacêuticas. **Conclusão:** Considerando todos os resultados, pode-se inferir que complexos AR:CD podem ser uma alternativa tecnológica para superar a baixa absorção pela via oral, sem ocasionar perda na atividade antioxidante, propiciando também o desenvolvimento de formulações sólidas orais.

**Palavras-chave:** Ácido rosmarínico, ciclodextrinas derivadas, antioxidante, compatibilidade, excipientes.



## ABSTRACT

**Introduction:** Rosmarinic acid (RA) is phenolic compound which present several biological activities, among these, antioxidant is remarkable. However, oral bioavailability of RA is only 0.91 to 5.0%, a factor that may be related to its solubility, stability in gastrointestinal environment and absorption mechanism. Cyclodextrins (CDs) are pharmaceutical excipients used in oral drug absorption by promoting increased solubility, chemical stability and permeation by the intestinal membrane through complexation with the drug. In view of the development of a pharmaceutical formulation, excipients compatibility studies are also expected. **Objective:** To obtain RA complex with derivative CDs (HP $\beta$ CD and M $\beta$ CD), to evaluate the antioxidant activity of complexes and compatibility between excipients. **Materials and methods:** Phase-solubility study was performed to determine stoichiometry and stability constant between RA and CD. The complexes were obtained by lyophilization and characterized by spectroscopic, calorimetric and microscopic techniques. The antioxidant activity was determined by the DPPH method and compatibility study among excipients was performed by spectroscopic, calorimetric and chromatographic methods. **Results:** RA has presented a stoichiometric ratio 2:1 RA:CD and high stability constant. The characterization methods allowed to infer the presence of inclusion and non-inclusion complex in which one molecule of RA would be interacting with internal CD protons and another would be interacting with external CD protons. The antioxidant activity of the complexes was superior to that presented by non-complexed RA, demonstrating the action of the CD on the proton donation of the RA and the compatibility study of excipients demonstrated the feasibility development of pharmaceutical forms. **Conclusion:** Considering all the results, it can be inferred that RA:CD complexes can be a technological alternative to overcome the low absorption by the oral route, causing no loss in the antioxidant activity, and also favoring the development of oral solid formulations.

**Keywords:** Rosmarinic acid, derivative cyclodextrins, antioxidant, compatibility, excipients.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Estrutura química do AR. 31

### CAPÍTULO II

**Figure 1.** Chromatogram obtained for RA analysis by LC developed method. 60

**Figure 2.** Robustness of LC method analyzed by Plackett-Burman method. (A) Temperature, (B) Initial rate flow, (C) Organic composition and (D) Wavelength. 61

**Figure 3.** Phase-solubility diagrams of RA with HP $\beta$ CD and M $\beta$ CD. 63

**Figure 4.** Job's plot for RA and HP $\beta$ CD and M $\beta$ CD. 63

**Figure 5.** UV spectrum of uncomplexed (dotted line) and complexed RA with HP $\beta$ CD (red line) and M $\beta$ CD (blue line). 64

**Figure 6.** Thermograms of (A) RA, HP $\beta$ CD, RA:HP $\beta$ CD complex and RA:HP $\beta$ CD PM and (B) RA, M $\beta$ CD, RA:M $\beta$ CD complex and RA:HP $\beta$ CD PM. 65

**Figure 7.** FTIR spectra of (A) RA, HP $\beta$ CD, RA:HP $\beta$ CD complex and RA:HP $\beta$ CD PM and (B) RA, M $\beta$ CD, RA:M $\beta$ CD complex and RA:M $\beta$ CD PM. 67

**Figure 8.** Photomicrographs obtained by scanning electron microscopy of RA (A), HP $\beta$ CD (B), M $\beta$ CD (C), RA:HP $\beta$ CD complex (D), RA:M $\beta$ CD complex (E), RA:HP $\beta$ CD PM (F) and RA:M $\beta$ CD PM (G). 68

**Figure 9.** 1D <sup>1</sup>H NMR of RA at D<sub>2</sub>O (pH 1.0):  $\delta$ /ppm = 7.42 (d, J=16.0 Hz, H7), 7.00 (dd, J=2.0 Hz, H2), 6.91 (dd, J=8.3, 2.0 Hz, H6), 6.80 (d, J= 8.0 Hz, H5), 6.78 (d, J=1.5 Hz, H2'), 6.76 (d, J=8.0Hz, H5'), 6.68 (dd, J=8.1, 2.0 Hz, H6'), 6.18 (d, J=16 Hz, H8), 5.12 (dd, J=7.5, 4.8 Hz, H8'), 3.06 (ddd, J=14.4, 4.8 Hz, H7'). 70

**Figure 10.** 1D NMR <sup>1</sup>H spectrum of (A) HP $\beta$ CD and (B) M $\beta$ CD at D<sub>2</sub>O (pH 1.0). 71

**Figure 11.** ROESY spectrum of RA:HP $\beta$ CD complexes at D<sub>2</sub>O (pH 1.0). 72

**Figure 12.** ROESY spectrum of RA:M $\beta$ CD complexes at D<sub>2</sub>O (pH 1.0). 73

**Figure 13.** DPPH scavenging by uncomplexed and complexed RA at 50  $\mu$ g/mL. 74

**Figure 14.** DSC thermograms of (A) RA and excipients, (B) RA and binary mixtures, (C) RA:HP $\beta$ CD PM and mixtures and (D) RA:M $\beta$ CD PM and mixtures. 77

**Figure 15.** FTIR spectra of (A) RA and excipients, (B) RA and binary mixtures, (C) RA:HP $\beta$ CD PM and mixtures and (D) RA:M $\beta$ CD PM and mixtures. 77

**Figure 16.** Plot of the Pearson's correlation (r) of binary mixtures. 78

**Figure 17.** LC chromatograms of (A) RA and excipients, (B) RA and binary mixtures, (C) RA:HP $\beta$ CD PM and binary mixtures and (D) RA:M $\beta$ CD PM and binary mixtures. 79





## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I**

**Tabela 1.** Estudos farmacocinéticos encontrados para o AR na literatura. 39

### **CAPÍTULO II**

**Table 1.** Effect of complexation on RA protons shift displacement ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{uncomplexed}}$ ). 70

**Table 2.** Temperatures and enthalpy of melting ( $\Delta H$ ) values for RA, RA/Excipients, PMs, and PMs/Excipients 76



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	21
<b>OBJETIVOS</b>	25
Objetos gerais	27
Objetivo específicos	27
<b>Capítulo I</b>	29
Ácido rosmarínico	31
Potencial antioxidante do AR	32
Administração por via oral do AR	34
Abordagens tecnológicas aplicadas ao AR	44
Complexos com ciclodextrinas	46
Compatibilidade entre excipientes	49
<b>Capítulo II</b>	51
Abstract	53
Introduction	55
Materials and Methods	56
Results and Discussion	60
Conclusion	79
References	80
<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	89
<b>CONCLUSÕES</b>	97
<b>REFERÊNCIAS</b>	101



**INTRODUÇÃO**



O ácido rosmarínico (AR) é um composto fenólico, formado por reação de esterificação entre o ácido caféico e ácido 3,4-dihidroxifenilático, isolado pela primeira vez das folhas da *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), espécie que deu nome ao ácido (PETERSEN & SIMMONDS, 2003).

Estudos pré-clínicos tem demonstrado para o AR atividade antiinflamatória, anticâncer, antimutagênica, antidepressiva, antioxidante, dentre outras (BHATT et al., 2013), com destaque à atividade antioxidante, visto que a maioria das patologias existentes são causadas ou geram radicais livres, enfatizando os benefícios das substâncias antioxidantes na prevenção ou tratamento (VALKO et al., 2007).

Dentre as vias para a administração de fármacos, a via oral destaca-se pela maior aceitação pelo paciente e possibilidade de apresentar efeito sistêmico (AULTON, 2002). Os estudos já publicados para o AR por via oral demonstram baixa absorção, podendo estar relacionado à sua solubilidade, estabilidade química em meio gastrointestinal ou limitação pelo mecanismo de absorção (BABA et al., 2004 e 2005; KONISH et al., 2005; KONISH & KOBAYASHI, 2005; LAI et al., 2011; GAYOSO et al., 2016; ZORIC et al., 2016; WANG et al., 2017).

Como forma de melhorar sua solubilidade, estabilidade e absorção, a utilização de ciclodextrinas (CDs) se apresenta como alternativa, visto que o seu centro lipofílico é capaz de encapsular fármacos, permitindo uma maior interação destes com o meio líquido, promovendo proteção contra alterações físico-químicas e alterando a permeabilidade da membrana (LOFTSSON & BREWSTER, 1996).

Medicamentos que incluem CDs em sua composição já podem ser encontrados no mercado apresentando diversas formas farmacêuticas como cápsulas, comprimidos, soluções oftálmicas ou orais, spray nasal, supositórios, dentre outras (LOFTSSON & DUCHÊNE; LOFTSSON & BREWSTER, 2010). Um parâmetro importante no desenvolvimento de formas farmacêuticas é prever a compatibilidade entre a substância ativa e os excipientes, visto que estes podem alterar características físico-químicas do fármaco (MAROTHU et al., 2015).

Desta forma, este trabalho vem propor a realização de um estudo aprofundado da complexação do AR com duas CDs derivadas, hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP $\beta$ CD) e metil- $\beta$ -CD (M $\beta$ CD), como insumos tecnológicos para promover aumento

de solubilidade, estabilidade química e absorção, avaliar a atividade antioxidante dos complexos obtidos, bem como desenvolver estudo de compatibilidade com excipientes como perspectiva para delineamento de formulação sólida.



**OBJETIVOS**



**Objetivos Gerais**

Desenvolver complexos entre o ácido rosmarínico e ciclodextrinas derivadas como abordagem tecnológica visando o aumento da sua absorção pela via oral.

**Objetivos Específicos**

- Realizar complexação com ciclodextrinas derivadas pelo método de liofilização;
- Caracterizar os complexos obtidos por técnicas espectroscópicas, calorimétricas e microscópicas;
- Avaliar potencial antioxidante dos complexos por metodologia *in vitro* (DPPH);
- Realizar estudo de compatibilidade entre o ácido rosmarínico com ciclodextrina na presença de excipientes comumente empregados em formulações sólidas.



## **Capítulo I**

Revisão de Literatura



## ÁCIDO ROSMARÍNICO

O ácido rosmarínico (AR), um composto fenólico isolado pela primeira vez das folhas da espécie *Rosmarinus officinalis* L., é uma substância formada por reação de esterificação entre os ácidos caféico e 3,4-dihidroxifenilático (PETERSEN & SIMMONDS, 2003).

O composto está especialmente presente nas famílias Lamiaceae, restrito à subfamília Nepetoideae; e Boraginaceae. Revisões mais recentes tem reportado a presença do AR em 26 outras famílias e em mais de 50 espécies, como *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Anchusa officinalis*, *Chloranthus officinalis*, *Perilla frutescens* (PETERSEN & SIMMONDS, 2003; PETERSEN et al., 2009), algumas das quais são especiarias de uso alimentar (EMBUSCADO., 2015).

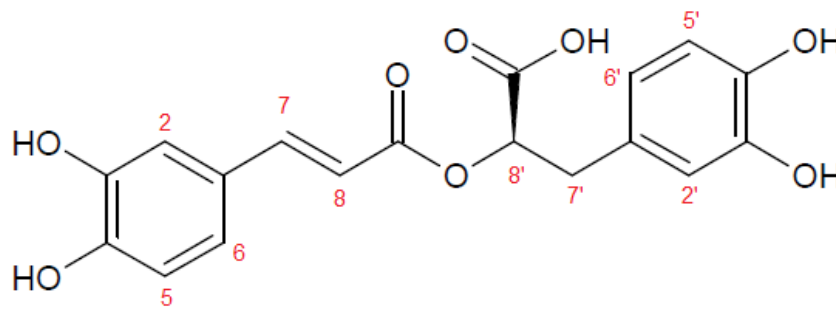


Figura 1. Estrutura química do AR.

Diversos modelos experimentais tem aplicado o AR como substância potencial de tratamento, demonstrando atividades como anticolinesterase (DASTMALCHI et al., 2009), antidepressiva (KONDO et al., 2015), antifibrótica (LI et al., 2010), antígeno tóxica (DE OLIVEIRA et al., 2012), antiinflamatória (ROCHA et al., 2015), antimicrobiana (ABEDINI et al. 2013), antimelanogênica (OLIVEIRA et al., 2013), antimutagênica (FURTADO et al., 2008), antinoceptiva (BOONYARIKPUNCHAI et al., 2014), antioxidante (PEREZ-FONS et al., 2010), antiviral (DUBOIS et al., 2008), fotoprotetora (SÁNCHEZ-CAMPILLO et al., 2009), na redução da dermatite atópica (LEE et al., 2008), na inibição da angiogênese (HUANG & ZHENG et al., 2006), dentre outras.

Diante da sua grande distribuição no reino vegetal, facilidade de obtenção por via biotecnológica através de cultura de células ou por extração com uso de solventes seguros, baixa toxicidade e atividades apresentadas, o AR se apresenta como uma molécula bioativa de interesse (BULGAKOV et al., 2012; ZIBETTI et al., 2013; KHOJASTEH et al., 2014; DIAS et al., 2016).

A busca por recursos naturais que apresentem atividade antioxidante, associado ao seu menor potencial tóxico, maior apelo social e promoção à saúde tem sido foco das indústrias farmacêutica e alimentar (VENKAT RATMAN et al., 2006; SHAHIDI & AMBIGAIPALAN., 2015; SOTO et al., 2015).

## **POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO AR**

O potencial de uma substância em neutralizar radicais livres tem ganhado interesse, em razão de estes serem responsáveis pelo aparecimento ou agravamento de diversas patologias, como as neurodegenerativas e cardiovasculares (VALKO et al., 2007). Estudos *in vitro* demonstraram que o AR apresenta resultados superiores aos demais ácidos fenólicos e derivados destes (SOBRATTEE et al., 2005; SEVGI et al., 2015). A inserção espontânea do AR em camadas lipídicas em uma proporção de AR: lipídios de 1% foi observada sem ocasionar mudanças na fluidez ou estrutura da membrana, agindo ativamente contra a lipoperoxidação (FADEL et al., 2011).

A característica de uma substância em exercer atividade antioxidante advém da doação de elétrons ou prótons dos grupos fenol ou catecol e posterior estabilização por reação de ressonância (CRAFT et al., 2012). O AR apresenta dois grupamentos catecol, um carbonila, um carboxílico e um vinílico em sua estrutura. Após a retirada de próton de um dos grupos catecol, ligações de hidrogênio intramoleculares mais curtas do que as existentes no estado fundamental são formadas para estabilizar o radical resultante. A atividade antioxidante na porção do ácido cafeico é similar à da porção do ácido 3,4-dihidroxifenilático. Entretanto, as hidroxilas do ácido 3,4-dihidroxifenilático liberam prótons mais rápido, em virtude da maior densidade eletrônica; já as quinonas formadas a partir da abstração de prótons da porção do ácido cafeico são mais estáveis devido à participação dos elétrons do grupamento vinílico e da carbonila (CAO et al., 2005; FUJIMOTA & MASUDA, 2012).



Gil et al. (2013), no entanto, reportam que o primeiro passo da oxidação no AR ocorre na porção do ácido caféico. A divergência entre os resultados obtidos para a estrutura molecular do AR quando este atua como antioxidante, estão relacionadas às condições nas quais a atividade é avaliada, como pH do meio e agente oxidante que podem alterar suas reações de doação de prótons e elétrons (PIRKER et al., 2009).

A viabilidade do AR ser um agente antioxidante já foi demonstrada em ensaio *in vivo* (ZHANG et al., 2015a). Sua atuação por via oral para o tratamento de câncer de boca (ANUSUYA & MANOHARAN., 2011), câncer colorretal (KARTHIKKUMAR et al., 2012; KARTHIKKUMAR et al., 2015), câncer de pele (SHARMILA & MANOHARAN., 2012), diabetes (BAKIREL et al., 2008; SOTNIKOVA et al., 2013; GOVINDARAJ & PILLAI., 2015; MUSHTAQ et al., 2015), hipercolesterolemia (CHEN et al., 2012; AFONSO et al., 2013), sepse (BACANLI et al., 2015), assim como na avaliação da diminuição da genotoxicidade induzida por etanol (DE OLIVEIRA et al., 2012), nefrotoxicidade induzida por gentamicina (TAVAFI & AHMADVAND., 2011), toxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (DOMITROVIC et al., 2013) e lesão pulmonar (SANBONGI et al., 2003), mostrou que além do retorno dos parâmetros bioquímicos, histológicos e imunológicos à normalidade ou próximos à normalidade, o AR aumentou a expressão das enzimas antioxidantes catalase, superóxido desmutase, glutatona peroxidase e glutatona reduzida; causou diminuição das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, marcador da lipoperoxidação; menor dano ao DNA, aumento da presença das vitaminas C e E e diminuição da expressão de 3-nitrotirosina, marcador para espécies reativas de nitrogênio.

Em humanos, a partir do consumo de decocto das flores de *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey na dose de 7 mg/kg, duas vezes ao dia, por 14 dias, constatou-se diminuição da lipoperoxidação e aumento da capacidade antioxidante total. O aumento das defesas antioxidantes no organismo foi relacionado à presença de flavonoides na composição química da espécie em estudo, em especial ao AR (RANJBAR et al., 2006).

Apesar da alta atividade antioxidante é importante ressaltar que o AR, como os demais compostos fenólicos, pode apresentar atividade pro-oxidante dependente

da concentração e das substâncias presentes no meio, como íons metálicos e oxidases. Porém a atividade antioxidante é preponderante sobre a pro-oxidante (MURAKAMI et al., 2007; PROCHÁZKOVÁ et al., 2011; MUÑOZ-MUÑOZ et al., 2013; GÜLÇİN et al., 2016).

Uma das vias que tem sido relatadas como responsável pela atividade antioxidante do AR é a do fator nuclear eritróide (Nrf2), ativando a proteína hemeoxigenase 1 (HO-1) (DOMITROVIC et al., 2013; FETONI et al., 2015; GOVINDARAJ & PILLAI., 2015; FERNANDO et al., 2016). O Nrf2 é o principal responsável pelo controle oxidativo celular basal e pós-indução, sendo umas das primeiras vias ativadas, presente no citoplasma celular ligado à *Kelch-like ECH associated protein 1* (Keap1) (BRYAN et al., 2013; LUSHCHAK, 2014).

Quando a célula é submetida a estresse oxidativo, a ligação entre Keap1:Nrf2 é rompida e o Nrf2 se desloca para o núcleo, onde forma um heterodímero com Maf (*Musculo-aponeurotíco fibrosarcoma*) e posteriormente liga-se ao elemento da resposta antioxidante (ARE). O ARE é a região reguladora dos genes de proteínas antioxidantes, dentre estas a HO-1, que catalisa a oxidação do heme em biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono, diminuindo o dano celular oxidativo causado pelo heme e produzindo as substâncias antioxidantes biliverdina e bilirrubina (ZHANG et al., 2013; ZHANG et al., 2015b).

A biodisponibilidade de um polifenol definirá se este terá ação sobre o estresse oxidativo de forma direta (quelação de metais ou redução de radicais) ou indireta (síntese de proteínas ou sinalização celular) (FRAGA et al., 2011). A via mais comum para a administração de polifenóis é a via oral, visto que muitos são obtidos a partir de alimentos. Entretanto, vários são os fatores que afetam o processo de absorção por esta via, exemplo a ação de enzimas digestivas, mudança de pH no trânsito gastrointestinal, microbiota, composição da matrix alimentar, dentre outros, diminuindo a biodisponibilidade dos polifenóis ingeridos (CUSTÓDIO et al., 2008; BOHN, 2014).

## ADMINISTRAÇÃO POR VIA ORAL DO AR

O primeiro trabalho a reportar um estudo farmacocinético do AR por via oral foi publicado por Nakazawa & Ohsawa (1998), utilizando ratos da linhagem Sprague-Dawley e como fonte de AR o extrato de *Perilla frutescens* na dose de 200 mg/kg. Na urina dos animais foi detectada a presença dos ácidos caféico livre e sulfatado, coumárico livre e sulfatado, ferúlico sulfatado, *m*-hidroxifenilpropanóico e rosmarínico; e no plasma os ácidos coumárico livre e sulfatado, ferúlico sulfatado e *m*-hidroxifenilpropanóico.

Em trabalho posterior, utilizando a mesma linhagem animal e extrato de *P. frutescens* como fonte de AR na dose de 5 g/kg, o ácido caféico pode ser detectado no plasma na forma livre e sulfata. O mesmo estudo foi realizado em humanos com dose de 2 g, no qual o único derivado do AR presente na urina e plasma foi o ácido 1-O-(2,4,5-trimetoxicinamoil)- $\beta$ -glucurinado (Nakazawa & Ohsawa., 2000).

Baba et al. (2004) utilizando também animais Sprague-Dawley, mas AR puro com dose 50 mg/kg, detectou na urina alguns metabólitos a mais que os detectados por Nakazawa & Ohsawa (1998) (2000), como o AR glucurinado, AR metilado livre, glucurinado e sulfatado e ácido caféico glucurinado. No plasma, o AR livre/metabolizado apresentou concentração máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de 4,63  $\mu\text{mol/L}$  com tempo máximo ( $T_{m\acute{a}x}$ ) de 30 minutos, seguido do AR metilado com  $C_{m\acute{a}x}$  de 5,03  $\mu\text{mol/L}$  e  $T_{m\acute{a}x}$  1 hora e ácido coumárico com  $C_{m\acute{a}x}$  de 0,75  $\mu\text{mol/L}$  e  $T_{m\acute{a}x}$  de 8 horas.

Em estudo com humanos, utilizando extrato de *Perilla frutescens* na forma de comprimidos contendo 200 mg de AR, Baba et al. (2005) encontrou na urina o AR livre, glucurinado, sulfatado e sulfoglucurinado, AR metilado livre, sulfatado e sulfoglucurinado, ácido caféico sulfatado e sulfoglucurinado, ácido ferúlico livre, glucurinado e sulfatado e traços de ácido coumárico. No plasma o AR livre/metabolizado teve  $C_{m\acute{a}x}$  de 1,15  $\mu\text{mol/L}$  e  $T_{m\acute{a}x}$  de 30 minutos, seguido do AR metilado com  $C_{m\acute{a}x}$  de 0,65  $\mu\text{mol/L}$  e  $T_{m\acute{a}x}$  2 horas e ácido ferúlico com  $C_{m\acute{a}x}$  de 0,36  $\mu\text{mol/L}$  e  $T_{m\acute{a}x}$  de 30 minutos. Os ácidos cafeíco e coumárico não foram detectados pelo método aplicado.

Dos estudos realizados por Baba et al. (2004) (2005), pode-se inferir que o AR apresenta uma rápida absorção. Isto também foi comprovado por Konish et al. (2005), que utilizando linhagem de ratos Wistar e AR puro na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$ ,

obteve como  $T_{\text{máx}}$  o valor de 10 minutos e  $C_{\text{máx}}$  de 1,36  $\mu\text{mol/L}$  para o AR livre obtido a partir de coleta na veia porta. Quando a coleta foi realizada na artéria abdominal, o  $T_{\text{máx}}$  e  $C_{\text{máx}}$  obtidos foram 5 minutos e 0,46  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente.

Estudos realizados em células Caco-2 demonstraram que o ácido rosmarínico apresenta absorção tanto por via paracelular como por via transcelular, através dos transportadores de monocarboxilatos (MCT), polipeptídeos de ânions orgânicos (OATP) e proteína multirresistente (MRP) (KONISH & KOBAYASHI, 2005; QIANG et al., 2011; FALÉ et al., 2013). O uso de inibidores da glicoproteína-P (pg-P) e proteína multirresistente (MRP) não se mostrou efetivo na inibição do fluxo basolateral-apical (KONISHI & KOBAYASHI, 2005), fator que pode estar relacionado ao fato do AR ser um indutor da expressão de transportadores de efluxo através do Nrf2 (WU et al., 2016). Os resultados obtidos confirmam a baixa absorção do AR por via oral já demonstrada em estudos *in vivo*, visto que o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{\text{app}}$ ) em todos os estudos foi menor que  $1 \times 10^{-6}$  cm/s (YEE, 1997; LU et al., 2008; QIANG et al., 2013; YANG et al., 2015).

As junções paracelulares ou junções intercelulares diminuem em direção ao cólon, assim como há maior presença da microflora (UNGELL et al., 1998). A ligação éster do AR poderia ser hidrolisada tanto por esterases da membrana, quanto pela microbiota intestinal, processo que dá origem ao ácido caféico e seus derivados, que posteriormente são absorvidos e metabolizados. Nas células Caco-2 não foi verificada hidrólise, já em ensaio realizado com clorogenato esterase e *Lactobacillus johnsonii*, o AR, a partir do extrato de *R. officinalis*, foi totalmente hidrolisado aos ácidos caféico e 3,4-dihidroxifenilático. Quando simuladas as condições gastrointestinais sem *Lactobacillus johnsonii* não houve hidrólise, confirmando a ação da microbiota intestinal sobre a estabilidade química do AR (KONISH & KOBAYASHI., 2005; BEL-RHLID et al., 2009). Existem divergências de resultados quanto à estabilidade do AR nas condições gastrointestinais. Porfírio et al. (2010) e Gayoso et al. (2016) relatam que as condições intestinais provocaram degradação do AR, diminuindo a sua bioacessibilidade, enquanto Costa et al. (2014) e Zoric et al. (2016) atribuem degradação às condições gástricas.

Os diferentes  $T_{\text{máx}}$  descritos para o AR, podem ser explicados não apenas pela linhagem animal escolhida, como também pelo estado alimentar. Noguchi-

Shinohara et al. (2015) avaliou as diferenças farmacocinéticas encontradas para o AR em humanos com dose 500 mg em indivíduos em jejum e alimentados, obtendo como resultado  $T_{m\acute{a}x}$  aumentado em estado alimentado. Ele também observou que a área sob a curva (ASC) para o AR livre é superior ao metabolizado na mesma dose em estado alimentado, fator importante visto que as formas metabolizadas podem diminuir o potencial biológico (SCALBERT et al., 2002).

Konish et al. (2005), relata que a concentração do AR livre diminui e a do AR metabolizado aumenta independentemente se coletado na veia porta ou artéria abdominal. O  $T_{m\acute{a}x}$  para o AR conjugado obtido para os dois pontos de coleta é de 30 minutos, a  $C_{m\acute{a}x}$  na veia porta e artéria abdominal foram 0,86 e 0,96  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente, apresentando áreas sob a curva semelhantes. Desta forma, pode-se deduzir que processo de metabolização do AR ocorre principalmente na absorção, através da passagem pela membrana intestinal.

A ação do AR sobre algumas enzimas do metabolismo das subfamílias de fase I CYP1A, CYP2B e CYP3A em células HepG2/C3A e MH1C1, resultou no aumento da atividade das mesmas (LIU et al., 2013). Já Debersac et al. (2001) relatou que o AR não apresentou qualquer atividade sobre estas enzimas, como também sobre as enzimas de fase II glutathiona S-transferase, quinona redutase e UDP-glucuronosiltransferase (UGT). Esta última é descrita como uma barreira para a biodisponibilidade de fenólicos administrados por via oral (WU et al., 2011). O AR foi capaz de inibir *in vitro* a atividade das isoformas UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B4 e UGT2B7 em 72,3, 68,4, 80,5, 33,1, 61,3 e 77,5% respectivamente (LIN et al., 2013), divergindo dos resultados de Debersac et al. (2001).

Não existem dados na literatura quanto à distribuição do AR no organismo após administração oral, porém, baseado no tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) (57 a 64 minutos), deduz-se que apresenta uma rápida distribuição. A ligação com as proteínas plasmáticas neste processo é de vital importância. A constante de ligação do complexo AR/albumina obtida por metodologias *in vitro* demonstrou valor de  $4,29 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , sendo formado principalmente por interações hidrofóbicas, com proporção estequiométrica de 1:1, com uma porção apenas interagindo com a proteína (KONISH et al., 2005; LAI et al., 2011; PENG et al., 2016). O processo de eliminação é rápido,

com tempo médio de residência de 105 minutos e pode ocorrer principalmente por via hepática, de acordo com as diferenças encontradas nas áreas sob a curva na veia porta e artéria abdominal (KONISHI et al., 2005; LAI et al., 2011).

O somatório dos valores encontrados para a excreção urinária do AR e AR metilado apresentaram valores que variaram de 2,04% a 4,36%, em um período de 18 e 48 horas, respectivamente, demonstrando uma baixa absorção por via oral (Baba et al., 2004; Baba et al., 2005). A partir da  $ASC_{0 \rightarrow \infty}$  do AR administrado por via intravenosa e oral é possível obter uma biodisponibilidade que varia entre 0,91% a 5,29%, o que representaria uma baixa percentagem do AR biodisponível por via oral (LAI et al., 2011; WANG et al., 2017).

Um resumo das características farmacocinéticas de todos os trabalhos disponíveis na literatura é apresentado na tabela 1.

**Tabela 1.** Estudos farmacocinéticos encontrados para o AR na literatura.

Fonte	Modelo animal	Dose	Amostra	Resultados	Referência
<i>Perilla frutescens</i>	Ratos Sprague-Dawley	200 mg/kg	Urina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Metabólitos encontrados:</b> ácidos trans-caféico-4-O-sulfatado, trans-<i>m</i>-coumárico-3-O-sulfatado, trans-ferúlico-4-O-sulfatado, trans-caféico, <i>m</i>-hidroxifenilpropanóico, trans-<i>m</i>-coumárico e rosmarínico.</li> <li>• Em 48 h, aproximadamente 32% da quantidade administrada foi excretada na forma de AR intacto e metabólitos. AR intacto em menor (%).</li> </ul>	Nakazawa & Ohsawa., (1998)
			Plasma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Metabólitos encontrados:</b> trans-<i>m</i>-coumárico-3-O-sulfatado, trans-ferúlico-4-O-sulfatado, <i>m</i>-hidroxifenilpropanóico e trans-<i>m</i>-coumárico.</li> </ul>	
<i>Perilla frutescens</i>	Ratos Sprague-Dawley	5 g/kg	Urina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Metabólitos encontrados:</b> ácidos trans-caféico-4-O-sulfatado, trans-<i>p</i>-coumárico-4-O-sulfatado, trans-ferúlico-4-O-sulfatado, trans-<i>m</i>-coumárico-3-O-sulfatado, trans-caféico, <i>m</i>-hidroxifenilpropanóico, trans-<i>p</i>-coumárico e trans-<i>m</i>-coumárico.</li> </ul>	Nakazawa & Ohsawa., (2000)
			Plasma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Metabólitos encontrados:</b> ácidos trans-caféico-4-O-sulfatado, trans-<i>p</i>-coumárico-4-O-sulfatado, trans-ferúlico-4-O-sulfatado, trans-<i>m</i>-coumárico-3-O-sulfatado, trans-caféico, <i>m</i>-hidroxifenilpropanóico, trans-<i>p</i>-coumárico e trans-<i>m</i>-coumárico.</li> </ul>	
	Humanos	2 g	Urina e Plasma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Metabólito encontrado:</b> ácido 1-O-(2,4,5-trimetoxicinamoil)-<math>\beta</math>-glucuronado.</li> </ul>	
Puro	Ratos Sprague-Dawley	50 mg/kg	Urina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Metabólitos encontrados:</b> ácidos rosmarínico, rosmarínico metilado, caféico, ferúlico e coumárico.</li> </ul>	Baba et al., (2004)

**Tabela 1.** Estudos farmacocinéticos encontrados para o AR na literatura (continuação).

Fonte	Modelo animal	Dose	Amostra	Resultados	Referência
Puro	Ratos Sprague-Dawley	50 mg/kg	Urina	<ul style="list-style-type: none"> <li>Em 18 h, 5,47% da quantidade administrada foi excretada. AR livre e metilado (2,04%).</li> </ul>	Baba et al., (2004)
			Plasma	Formas livres e conjugadas <ul style="list-style-type: none"> <li>AR: <math>C_{máx} = 4,63 \mu\text{mol/L}</math> <math>T_{máx} = 30 \text{ min}</math></li> <li>AR metilado: <math>C_{máx} = 5,03 \mu\text{mol/L}</math> <math>T_{máx} = 1 \text{ h}</math></li> <li>Ácido coumárico: <math>C_{máx} = 0,75 \mu\text{mol/L}</math> <math>T_{máx} = 8 \text{ horas}</math></li> </ul>	
<i>Perilla frutescens</i>	Humanos	200 mg	Urina	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Metabólitos encontrados:</b> ácidos rosmarínico, rosmarínico metilado, caféico, ferúlico e coumárico.</li> <li>Em 48 h, 6,30% da quantidade administrada foi excretada. AR livre e metilado (4,36%).</li> </ul>	Baba et al., (2005)
			Plasma	Formas livres e conjugadas <ul style="list-style-type: none"> <li>AR: <math>C_{máx} = 1,15 \mu\text{mol/L}</math> <math>T_{máx} = 30 \text{ min}</math></li> <li>AR metilado: <math>C_{máx} = 0,65 \mu\text{mol/L}</math> <math>T_{máx} = 2 \text{ h}</math></li> <li>Ácido ferúlico: <math>C_{máx} = 0,36 \mu\text{mol/L}</math> <math>T_{máx} = 30 \text{ min}</math></li> </ul>	
Puro	Ratos Wistar	100 $\mu\text{mol/kg}$	Soro	Forma livre – Veia porta <ul style="list-style-type: none"> <li><math>C_{máx} = 1,36 \mu\text{mol/L}</math></li> <li><math>T_{máx} = 10 \text{ min}</math></li> <li><math>T_{1/2} = 57 \text{ min}</math></li> <li><math>ASC_{0 \rightarrow 1,5h} = 60,4 \mu\text{molmin/L}</math></li> </ul>	Konish et al., (2005)



**Tabela 1.** Estudos farmacocinéticos encontrados para o AR na literatura (continuação).

Fonte	Modelo animal	Dose	Amostra	Resultados	Referência
Puro	Ratos Wistar	100 $\mu\text{mol/kg}$	Soro	<p>Forma livre – Artéria abdominal</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>C_{\text{máx}} = 0,46 \mu\text{mol/L}</math></li> <li>• <math>T_{\text{máx}} = 5 \text{ min}</math></li> <li>• <math>t_{1/2} = 64 \text{ min}</math></li> <li>• <math>ASC_{0 \rightarrow 1,5\text{h}} = 16,6 \mu\text{molmin/L}</math></li> </ul> <p>Forma conjugada – Veia porta</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>C_{\text{máx}} = 0,86 \mu\text{mol/L}</math></li> <li>• <math>T_{\text{máx}} = 30 \text{ min}</math></li> <li>• <math>ASC_{0 \rightarrow 1,5\text{h}} = 65,2 \mu\text{molmin/L}</math></li> </ul> <p>Forma conjugada – Artéria abdominal</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>C_{\text{máx}} = 0,96 \mu\text{mol/L}</math></li> <li>• <math>T_{\text{máx}} = 30 \text{ min}</math></li> <li>• <math>ASC_{0 \rightarrow 1,5\text{h}} = 69,5 \mu\text{molmin/L}</math></li> </ul>	Konish et al., (2005)
<i>Salviae miltiorrhizae</i>	Ratos Sprague-Dawley	800 $\text{mg/kg}$	Plasma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>C_{\text{máx}1} = 1,45 \mu\text{g/mL}</math></li> <li>• <math>T_{\text{máx}1} = 10 \text{ min}</math></li> <li>• <math>C_{\text{máx}2} = 1,86 \mu\text{g/mL}</math></li> <li>• <math>T_{\text{máx}2} = 45 \text{ min}</math></li> <li>• <math>t_{1/2} = 64 \text{ min}</math></li> <li>• <math>ASC_{0 \rightarrow \infty} = 185,15 \mu\text{gmin/mL}</math></li> <li>• <math>MRT_{0 \rightarrow \infty} = 104,2 \text{ min}</math></li> </ul>	Lai et al., (2011)

**Tabela 1.** Estudos farmacocinéticos encontrados para o AR na literatura (continuação).

Fonte	Modelo animal	Dose	Amostra	Resultados	Referência
Puro	Ratos Sprague-Dawley	50 mg/kg	Plasma	<ul style="list-style-type: none"><li>• <math>C_{m\acute{a}x} = 327</math> ng/mL</li><li>• <math>T_{m\acute{a}x} = 20</math> min</li><li>• <math>t_{1/2} = 406</math> min</li><li>• <math>ASC_{0 \rightarrow t} = 58,24</math> ng/mLmin</li><li>• <math>ASC_{0 \rightarrow \infty} = 83,70</math> ng/mLmin</li></ul>	Yang et al., (2015)

Um fator que pode acarretar na baixa biodisponibilidade apresentada pelo AR é a sua solubilidade aquosa (KIM et al., 2010; CASANOVA et al., 2016). A solubilidade aquosa é a característica físico-química mais importante para que haja absorção, quando a administração é realizada por via oral, visto que há a necessidade de dissolução nos líquidos gastrointestinais. Substâncias com baixa solubilidade terão absorção incompleta, errática ou lenta (HU & LI., 2011).

A variação do pH do trato gastrointestinal pode alterar o comportamento da solubilidade das substâncias. Uma substância ácida apresentará baixa solubilidade e lenta dissolução no estômago em razão do seu baixo pH, já em pH mais alto há chances de que haja ionização (LEMKE et al., 2012).

Uma característica importante a ser observada é o LogP que determina a partição de uma molécula em meio aquoso e oleoso. Yang et al. (2015) relatou que o LogP do AR é alterado de acordo com o pH do meio. Para o pH 1.2, o valor de LogP (o/a) relatado foi 60,4, dado que resulta em baixa solubilidade no estômago. Entretanto o AR tem pKa entre 2,8 – 2,9, propriedade que beneficiaria a sua absorção estomacal devido à manutenção do estado não ionizado no pH ácido, no qual é absorvido mais rapidamente. Acredita-se que uma parcela das substâncias polifenólicas possa apresentar absorção estomacal em virtude do curto  $T_{\text{máx}}$  plasmático. Todavia, em decorrência da baixa superfície de contato do estômago, uma maior absorção deve ocorrer no intestino (KONISH et al., 2006; HU & LI., 2011; BOHN et al., 2014; GONG et al., 2016).

A estabilidade do AR frente às condições gastrointestinais apresenta resultados conflitantes, como mencionado anteriormente. A estabilidade química de uma substância na passagem pelo sistema gastrointestinal é também um dos fatores que pode vir a diminuir a sua biodisponibilidade e resultar em baixa atividade biológica (PORFÍRIO et al., 2010; COSTA et al., 2014; GAYOSO et al., 2016; ZORIC et al., 2016). Adomake-Bonsu et al. (2017) reportaram a importância da forma não ionizada na atividade antioxidante intracelular *in vitro* do AR em pH 7.4, utilizando metil rosarinato, um análogo do AR contendo uma metoxila no ácido carboxílico na porção do ácido 3,4-dihidroxifenilático, o que acarreta na diminuição da ionização nesta porção e maior penetração celular.

Um outro fator que acarretaria na diminuição da biodisponibilidade seria mecanismo de absorção. O mecanismo de absorção paracelular é um dos mais importantes para transporte do lúmen ao sistema circulatório. A resistência que as junções intercelulares apresentam ao transporte de substâncias, medida de acordo com a resistência elétrica transepitelial (RET), é diferente para cada órgão, sendo mais fraca no intestino e mais resistente no estômago e cólon (DELI, 2009), sendo que os poros paracelulares representam apenas 0,01 a 0,1% da superfície do intestino (STENBERG et al., 2002). Constitui a via de absorção de substâncias hidrofílicas, com baixa massa molecular e carregadas positivamente (KARLSSON et al., 1999; THOMAS et al., 2006), porém é relatada a absorção de moléculas de alta massa molecular, neutras ou carregadas negativamente, mas com intensidade menor (KARLSSON et al., 1999; SALAMAT-MILLER & JOHNSTON et al., 2005), sendo possivelmente este um dos entraves para a biodisponibilidade do AR.

Na tentativa de superar estas propriedades físico-químicas e aumentar a biodisponibilidade oral do AR podem ser empregadas abordagens tecnológicas.

## **ABORDAGENS TECNOLÓGICAS APLICADAS AO AR**

As substâncias polifenólicas apresentam entre si a característica de serem pouco biodisponíveis no organismo, como já foi constatado para o AR. A utilização de algumas alternativas tecnológicas como dispersões sólidas, nanopartículas lipídicas, sistemas de liberação autoemulsionáveis em escala macro, micro e nano, dentre outras, culminaram em maior absorção (LEWANDOSKA et al., 2013). Referente ao AR, na literatura ainda são poucos os trabalhos que investigam o uso de sistemas de liberação com o intuito exclusivo de aumentar sua absorção por via oral, sendo encontrados apenas nanopartículas lipídicas sólidas e complexos fosfolipídicos (CAMPOS et al., 2014; MADUREIRA et al., 2015; YANG et al., 2015; MADUREIRA et al., 2016).

A utilização de nanopartículas para a liberação oral de compostos bioativos tem sido uma estratégia aplicada pela possibilidade de proporcionar melhor estabilidade química, o aumento da biodisponibilidade e desempenho terapêutico, e

também por poderem ser posteriormente administradas como soluções aquosas ou como formas farmacêuticas sólidas (NUNES et al., 2015).

Nanopartículas lipídicas do AR com Witepsol H15 como fase lipídica e polissorbato 80 como tensoativo, produzidas com auxílio de planejamento experimental, com variação da porcentagem de fase lipídica e tensoativo, demonstraram tamanho de partícula acima do 300 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,3, potencial zeta abaixo de -38 mV e eficiência de associação acima de 99,8%. A estabilidade das nanopartículas foi estudada por um período de 28 dias, no quais elas se mantiveram estáveis. A concentração de 0,5% de Witepsol e 1-2% de polissorbato 80 foi relatada para obtenção de partículas com melhor estabilidade (CAMPOS et al., 2014).

Em outro estudo com nanopartículas lipídicas como carreadoras do AR, a fase lipídica escolhida foi a cera da carnaúba. O tamanho das partículas produzidas também através de planejamento experimental, variou de 35 a 945 nm no dia 0 e de 49 a 892 nm após 28 dias. O índice de polidispersão no dia 0 teve valores de 0,17 a 0,40 e após 28 dias de 0,24 a 0,37. O potencial zeta foi abaixo de -37,6 mV nos dias avaliados e a eficiência de associação também foi acima de 99,8%. Nanopartículas com características desejáveis à administração oral seriam obtidas a partir da combinação de cera da carnaúba com 1,0 a 1,5% e 2% de tensoativo (MADUREIRA et al., 2015). Comparando-se os dois estudos e levando-se em conta estritamente as características físicas das nanopartículas, pode-se afirmar que as elaboradas com Witepsol como fase lipídica alcançaram melhores resultados.

Madureira et al. (2016), avaliando as condições gastrointestinais sobre a liberação do AR nas nanopartículas lipídicas produzidas por Campos et al. (2014) e Madureira et al. (2015) observaram que ambas as nanopartículas apresentam um perfil de liberação controlado, o qual é influenciado pela combinação do pH e enzimas presentes no meio, havendo uma maior liberação em condições intestinais, devido à ação da pancreatina na estrutura das nanopartículas. Em células Caco-2, o perfil de liberação para as duas nanopartículas foi similar, já nas células Caco-2/HT29-MTX, as nanopartículas com Witepsol como fase lipídica tiveram maior liberação em decorrência da sua interação com a camada de glicoproteínas e também por apresentar ponto de fusão menor que as produzidas com carnaúba, facilitando assim

a liberação do AR. A atividade antioxidante do AR foi mantida em ambas as nanopartículas produzidas.

Outro sistema aplicado ao aumento de biodisponibilidade são os complexos fosfolipídicos. Complexos de fosfolipídios são formados principalmente lecitina, composta de fosfatidilcolina, fosfadiletanolamina e fosfatidilinositol. O seu uso advém da sua semelhança com a constituição da membrana celular e baixa toxicidade. O complexo é formado a partir de ligações intermoleculares de ligações de hidrogênio e atração eletrostática. O uso de complexos de fosfolipídios tem demonstrado grande eficiência no aumento da solubilidade e permeabilidade de fenólicos, elevando seu potencial terapêutico (WANG et al., 2015).

O complexo fosfolipídico do AR com lecitina de soja mostrou aumento da absorção do AR por métodos *in vitro* e *in vivo*. O  $T_{m\acute{a}x}$  obtido com o complexo foi de 6 minutos, contra os 20 minutos do AR não formulado, o que ressalta a absorção mais rápida pelo complexo, possivelmente por facilitar o transporte transmembranar do AR. Solução oleosa de triglicerídeos de cadeia média (TCM) do complexo também elevou a absorção do AR, apresentado uma ASC quase 3 vezes maior à do AR não formulado, fator devido à emulsificação do TCM pela bile e posterior hidrólise a ácidos graxos e monoacilglicerol por ação da pancreatina. Os produtos da lipólise podem modular a permeação da membrana e abrir a junções paracelulares, principal mecanismo de absorção já mencionado. A atividade antioxidante foi comprovada pelo aumento da expressão de enzimas antioxidantes, a exemplo da superóxido desmutase, catalase e glutathione peroxidase e diminuição das substâncias reativas ao ácido tiobartúrico, em comparação ao AR não formulado (KONISH & KOBAYASHA., 2005; YANG et al., 2015).

Outra alternativa que poderia ser abordada para a liberação do AR por via oral seria a complexação com ciclodextrinas.

## **COMPLEXOS COM CICLODEXTRINAS**

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose conectadas através de ligações do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$ . A conformação das unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose dão às CDs um formato truncado ou toroidal, no qual a região exterior tem um caráter mais hidrofílico devido às hidroxilas que são voltadas

a esta região, subdividas em primárias e secundárias. Já o interior, apresenta um caráter lipofílico em decorrência dos carbonos e oxigênios etéreos provenientes dos resíduos de glicose (BREWSTER & LOFTSSON, 2007; ARIMA et al., 2015).

As CD são classificadas de acordo com o número de unidades de  $\alpha$ -D-glicopirranose, sendo as CDs naturais,  $\alpha$ CD (n=6),  $\beta$ CD (n=7),  $\gamma$ CD (n=8), as mais relatadas na literatura (SZETJLI, 1998; CRINI, 2014). As CDs derivadas são formadas a partir das CD naturais através de reações de substituição nas hidroxilas por outros grupamentos orgânicos. Estas substituições promovem maior solubilidade e capacidade de complexação às CDs (SZENTE & SZEJTLI, 1999).

O centro das CDs permite a encapsulação de substâncias que apresentam baixa solubilidade em ambiente aquoso, em decorrência do micro ambiente lipofílico, formando complexos de inclusão, os quais não promovem formação ou quebra de ligações covalentes, favorecendo a sua dissolução em condições fisiológicas (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; BREWSTER & LOFTOSSON, 2007).

A inclusão em CD, além promover o aumento da solubilidade e dissolução em água, pode proteger contra efeitos oxidativos, radiação ultravioleta e luz visível, aquecimento, promoção do controle da volatilidade e sublimação, modificação de sabor e odor e liberação de forma controlada; processos que não apenas aumentam a absorção e biodisponibilidade, como também protegem contra alterações físico-químicas (VALLE, 2004). Devido a estas propriedades, as CDs tem sido utilizadas para liberação de substâncias por via tópica (LOFTSSON & MASSON, 2001), ocular (LOFTSSONA & JÄRVINEN, 1999), parenteral, como também oral (LOFTSSON et al., 2016).

O potencial de aumento da biodisponibilidade por via oral das CDs está vinculado tanto à promoção de solubilidade como permeação através da camada de água estacionária e da membrana intestinal. Na camada estacionária de água, as CDs comportam-se como agente caotrópico, desestabilizando as ligações de hidrogênio da camada de água. Desta maneira, facilita a passagem da substância ou complexo através da mesma, provocando o aumento de concentração na membrana intestinal, como também previne a interação da substância com o muco (LOFTSSON et al., 2007). Na membrana intestinal, a interação é dependente do tipo de CD. A  $\alpha$ CD tem maior afinidade na remoção dos fosfolipídios, enquanto que a  $\beta$ CD pelo colesterol,

processos que podem induzir redução da resistência da membrana, promovendo maior penetração (CARRIER et al., 2007).

As CDs tem sido reportadas também como inibidoras indiretas do efluxo de substâncias promovido pela P-gP. Este potencial está relacionado com a capacidade de depleção do colesterol da membrana intestinal, na qual estas proteínas estão localizadas (YUNOMAE et al., 2003; ZIDOVETZKI & LEVITAN., 2007). Da mesma forma, a depleção de colesterol aumenta a permeabilidade de substâncias por via paracelular por alterar ação das ocludinas (FRANCIS et al., 1999; LAMBERT et al., 2007; CASAS et al., 2010).

O primeiro trabalho a avaliar a complexação do AR com CD foi realizado Çélik et al. (2011), utilizando diferentes tipos de CDs, tanto naturais como derivadas, dentre estas a hidroxipropil- $\beta$ CD (HP $\beta$ CD) e randomicamente metilada- $\beta$ CD (RM $\beta$ CD). A razão estequiométrica e constante de associação foram obtidos por método de variação contínua (*Job's Plot*) através de fluorescência. Como resultados, Çélik et al. (2011) obteve para todas as CDs, razão estequiométrica na razão de 1:1, ou seja, cada molécula do AR supostamente interage com apenas uma molécula de CD; e as constantes variaram de  $82 \text{ M}^{-1}$  ( $\alpha$ CD) à  $328 \text{ M}^{-1}$  (RM $\beta$ CD).

Complexos secos foram produzidos por liofilização e caracterizados apenas por infravermelho, no qual o desaparecimento das bandas referentes às hidroxilas do AR sugere a formação de complexo. A atividade antioxidante dos complexos foi realizada por metodologia baseada na transferência de elétrons (CUPRAC), demonstrando o aumento da atividade antioxidante do AR quando complexado com CD (ÇÉLIK et al., 2011).

Subsequentemente, Medronho et al. (2014) e Aksamija et al. (2016) realizaram estudo entre AR e  $\beta$ CD quanto a razão estequiométrica e constante de associação também utilizando o método de *Job's Plot* por ressonância magnética nuclear (RMN) e eletroforese capilar. Esta última apenas realizada por Aksamija et al. (2016).

Ambos os trabalhos relataram a presença de estequiometria 1:1, entretanto o valor das constantes e a configuração na qual o AR se complexa com a  $\beta$ CD se mostraram diferentes. Medronho et al. (2011) reporta a interação da porção do ácido



3,4-dihidroxifenilático com o hidrogênio interno (H3) da CD enquanto a porção do ácido caféico ao mesmo tempo estaria interagindo com hidrogênios externos (H1 e H2). Já Aksamija et al. (2016) relata que os dois grupos aromáticos do AR apresentam interação com os hidrogênios interno da CD (H3 e H5).

$\beta$ CD é mais comumente encontrada em formulações farmacêuticas disponíveis no mercado, seguida pela HP $\beta$ CD,  $\alpha$ CD e RM $\beta$ CD (KURKOV & LOFTSSON, 2013). Se utilizadas por via oral, uma baixa concentração é absorvida pelo trato intestinal superior, além de não apresentar metabolismo nesta região (BELLRINGER et al., 1995; IRIE & UEKAMA, 1997; STELLA & HE., 2008). Entre as formulações farmacêuticas de uso oral que mais empregam CD estão cápsulas e comprimidos (BREWSTER & LOFTSSON, 2007; LOFTSSON & DUCHÊNE, 2007; LOFTSSON & BREWSTER, 2010).

## **COMPATIBILIDADE ENTRE EXCIPIENTES**

Excipientes são componentes sem atividade farmacológica presentes nas formulações farmacêuticas que apresentam múltiplas funções, como modular liberação do princípio ativo, modificar cor, odor ou sabor, lubrificação, preenchimento, dentre outras, facilitando a administração da substância ativa (ELDER et al., 2016). Entretanto, no processo de obtenção de uma forma farmacêutica, a mistura substância ativa/ excipiente ou excipiente/ excipiente pode gerar instabilidades física e/ou química, afetando a segurança e eficácia do produto final, afirmando a necessidade de estudo de compatibilidade no processo de pré-formulação (KAUR et al., 2016).

Estudos de compatibilidade permitem estimar se a combinação entre substância ativa e excipiente ou excipiente e excipiente em determinada condição resultará em uma formulação estável. Técnicas como estresse isotérmico, calorimetria diferencial exploratória, análise térmica diferencial, difração por raio-X, infravermelho, ressonância magnética nuclear no estado sólido, microscopia eletrônica de varredura, cromatografia líquida, juntamente com a aplicação de técnicas estatísticas multivariadas são algumas das mais aplicadas nos estudos de compatibilidade,

apresentando entre si vantagens e desvantagens (VERMA & GARG., 2005; CHADHA & BHANDARI, 2014; ROJEK & WESOLOWSKI, 2016).

No tocante às CDs, estudos de compatibilidade de excipientes tem demonstrado o potencial de seu uso sem provocar alterações nos fármacos (ALVES-SILVA et al., 2014), já outros mostram a incompatibilidade com CD, sendo justificada pela formação de complexos que não causam alteração as características físico-química do fármaco (CUNHA-FILHO et al., 2007; TALVANI et al., 2014). É importante citar que apenas um estudo de compatibilidade de excipientes foi encontrado na literatura que realiza o efeito de excipientes sobre mistura binária fármaco/CD (CORTI et al., 2008).

## **CAPÍTULO II**

Trabalho experimental apresentado na forma de manuscrito a ser submetido à publicação em periódico de circulação internacional.



**Development and characterization of rosmarinic acid complexes with derivative cyclodextrins, assessment of antioxidant activity and compatibility study of excipients**

Kleyton S. Veras <sup>1</sup>, Mariana Colombo <sup>1</sup>, Flávia N. S. Fachel <sup>1</sup>, Helder F. Teixeira <sup>1</sup>,  
Amélia T. Henriques <sup>1</sup>, Valquíria L. Bassani <sup>1</sup>, Letícia S. Koester <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Ipiranga Avenue, 2752, 906010-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Abstract**

The rosmarinic acid (RA) is a phenolic compound with remarkable antioxidant activity, but it presents a low bioavailability when administrated by oral route. Cyclodextrins (CD), among these, the derivatives hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD) and methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) have been used to solve the poor absorption of drugs. Phase-solubility study was performed to determine the stoichiometric ratio and apparent constant stability. Complexes between RA and HP $\beta$ CD or M $\beta$ CD were prepared by freeze-drying and characterized by UV/vis, DSC, FTIR, SEM and H<sup>1</sup> NMR. The antioxidant activity of complexes was performed by DPPH assay and excipients compatibility study was assessed by DSC, FTIR and LC. A 2:1 (RA:CD) stoichiometric ratio and strong apparent constant stability were found for both complexes. The complexes characterization shows the formation of inclusion and non-inclusion complexes and the antioxidant activity was 2.98-fold and 2.93-fold higher to RA: HP $\beta$ CD and RA: M $\beta$ CD, respectively. Hypromellose (HPMC, Methocel K100), microcrystalline cellulose (MCC) and spray-dried lactose (LAC) have demonstrated compatibility with RA and physical mixtures (PMs). These results suggested that the RA:CD complexes can be a technological approach to increase the RA bioavailability, its antioxidant potential and allow the development of pharmaceutical dosage forms.

Keywords: Rosmarinic acid, cyclodextrin, antioxidant, compatibility study.



## 1. Introduction

Rosmarinic acid (RA) is a phenolic compound formed by esterification reaction between caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid (Petersen & Simmonds, 2003). Many *in vitro* and *in vivo* activities have been described to RA as anticholinesterase (Dastmalchi et al., 2009), antidepressant (Kondo et al., 2015), antifibrotic (Li et al., 2010), antigenotoxic (De Oliveira et al., 2012), antiinflammatory (Rocha et al., 2015), antimicrobial (Abedini et al. 2013), antimelanogenic (Oliveira et al., 2013), antimutagenic (Furtado et al., 2008), antinociceptive (Boonyarikpunchai et al., 2014), antioxidant (Perez-Fons et al., 2010), antiviral (Dubois et al., 2008), photoprotective (Sánchez-Campillo et al., 2009), and others. Among these, antioxidant is the most remarkable activity. Despite its great potential, the bioavailability of RA by oral route is limited (~ 0.91 – 5.0%) (Baba et al., 2004; Baba et al., 2005; Lai et al., 2011; Wang et al., 2017). The use of nanoparticles and lipidic complexes have been applied to the delivery of RA by oral route, obtaining formulation with great technological characteristics, safety and increased RA absorption (Campos et al., 2014; Madureira et al., 2015; Yang et al., 2015; Madureira et al., 2016 a,b). Another approach that has been applied to the delivery of substances with low bioavailability by oral route is drug complexation with cyclodextrins (CD) (Carrier et al., 2007).

CD are cyclic oligosaccharides with a truncated shape, classified according to number of D-glucopyranoses units in  $\alpha$  (6),  $\beta$  (7) and  $\gamma$  (9) CD. They have a hydrophilic outer surface due hydroxyl groups and a lipophilic cavity able to form complex with molecules, increasing its solubility, stability or bioavailability (Loftsson & Brewster., 2010; Loftsson et al., 2016). Derivatives CD are formed by substitutions reactions on hydroxyl groups for methyl, hydroxypropyl, sulfobutylether, among other moieties, intensifying its solubility and complexation ability (Szente & Szejtli, 1999).

Çelik et al., (2011), Medronho et al., (2014) and Aksamija et al., (2016) have reported the interaction of RA with CD. Among these, only Çelik et al., (2011) has described RA complexation with derivative CD, evaluating the stoichiometric ratio and binding constant by Job's plot and characterizing the complex at solid state, but just by infrared spectroscopy. With respect to complexation phenomenon, Çelik et al., (2011) suggest the interaction of caffeoyl moiety or 3,4-dihydroxyphenyllactic moieties with the cyclodextrin cavity.

In literature and pharmaceutical market, the drug/cyclodextrin complexes have been administered in a liquid, semisolid or solid dosage form (Tiwari et al., 2010; Kurkov & Loftsson, 2013). In order to develop a pharmaceutical dosage form, an important feature that must be explored in preformulation stage is the compatibility between drug and excipients to assure the safety and efficiency of the product (Rojek et al., 2013).

Although some information about RA complexation with CDs is already available, the lack of a deep understanding of how this complexation takes place has prompted us to investigate the complexation of RA with CD derivatives. In this context, the aims of this study were to produce and characterize HP $\beta$ CD and M $\beta$ CD complexes with RA, to assess their *in vitro* antioxidant activity and, for the first time, to evaluate the compatibility between RA complexes with excipients in view to produce solid oral dosage forms.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Materials**

Rosmarinic acid standard (96% purity), 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP $\beta$ CD) (0.8 molar substitution/ MW 1460), 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma Aldrich (Slovakia). Methyl- $\beta$ -CD (M $\beta$ CD) (0.57 molar substitution/ MW 1191) was purchased from Roquette (France).

### **2.2 Liquid Chromatograph (LC) analysis**

The LC analysis was performed on Shimadzu LC (LC10), coupled to UV detector. The stationary phase was a Perkin reversed-phase C18 column (150 x 4.6 mm; particle size 5 $\mu$ m), protected by C-18 guard column. The mobile phase was composed of (A) acidified water (0.01% trifluoroacetic acid) (75%) and (B) acidified acetonitrile (0.01% trifluoroacetic acid) (25%) at isocratic flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup>. The wavelength was 330 nm, injection volume was 10  $\mu$ L and temperature was 30°C.

### **2.3 Validation of LC method**

The validation of LC method was performed based on International Conference of Harmonization guidelines (ICH) (1995). The specificity was determined by injection of HP $\beta$ CD or M $\beta$ CD water: methanol (1:1, v/v) solution at concentration of 100 mM. Linearity of the method was determined from three standard curves obtained in three consecutive days, by plotting the peak area versus the concentration of RA ranging



0.5 – 10.0 µg/mL in methanol. Each concentration level was analyzed in triplicate. The linear regression using the coefficient of determination was used to analyze the results. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) of the method were obtained from linearity curves.

The intra-day precision (repeatability) was determined by analyzing RA methanolic solution at three levels (1.0, 5.0, 10.0 µg/mL) in the same day. Inter-day precision (intermediate precision) was performed by assaying RA methanolic solution of the same concentration levels on three different days. The standard deviation and the relative standard deviation (RSD) were calculated for each level. The accuracy was determined by recovery of RA from complexes with HPβCD and MβCD at molar ratio 2:1 at 1.0, 5.0 and 10.0 µg/mL of RA. The robustness was evaluated by Plackett-Burman design. The factors analyzed in low levels (-1) and high levels (+1) were temperature (29 and 31°C), initial rate flow (0.9 and 1.1 mL/min), organic composition (24 and 26 %) and wavelength (329 and 331 nm).

## 2.4 Determination of complex stoichiometric and apparent stability constant (*K*)

### 2.4.1 Phase-solubility study

Phase-solubility studies were carried out according to Higuchi & Connors (1965) method. An excess of RA was added in aqueous acid solution (0.1 M HCl, pH 1.2) with different concentrations (0 – 10 mM) of HPβCD or MβCD, and shaken at room temperature (25°C) for 24 hours, protected from light. After reaching equilibrium, the solutions were filtered with 0.45 µm membrane and analyzed in triplicate by validated LC method.

The apparent stability constant (*K*) was calculated from phase-solubility diagrams using

$$K_{2:1} = \frac{\text{Slope}}{S_0^2 (2 - \text{Slope})}$$

where  $S_0$  is the solubility of RA in the absence of HPβCD or MβCD.

### 2.4.2 Continuous variation method (Job's plot)

Job's plot studies were carried out according to Job (1928) method (Saha et al., 2016). Different volumes of RA (0.1 mM) and HPβCD or MβCD (0.1 mM) in aqueous acid

solution (0.1 M HCl, pH 1.2) were mixed to a constant volume, varying the molar fraction (R) of RA in the range 0 – 1. The absorbance (A) of each solution was read at spectrophotometer at 330 nm. The Job's plot was generated by plotting  $\Delta A \times R$  against R, where  $\Delta A$  is the difference in absorbance of RA without CD and with CD.

## 2.5 Preparation of RA:CD complexes

### 2.5.1 Freeze-drying method (FD)

The freeze-dried complexes were prepared in aqueous acid solution (0.1 M HCl, pH 1.2) at the molar ratio 2:1 of RA and HP $\beta$ CD or M $\beta$ CD, and stirred for 24 hours at 25°C protected from light. After that, the dispersions were filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane, frozen at – 18°C and then dried by liophilization.

### 2.5.2 Physical mixture (PM)

The physical mixture (PM) was prepared at the molar ratio of 2:1 of RA: HP $\beta$ CD or M $\beta$ CD by vortexing for 5 min in glass vials.

## 2.6 Complexes characterization

### 2.6.1 RA assay in CD complexes

The content of RA in complexes was determined by LC validated method.

### 2.6.2 UV/ vis spectrophotometry

The aqueous solution (0.1 M HCl, pH 1.2) of uncomplexed and complexed RA at 50  $\mu$ g/mL were analyzed on UV/vis spectrophotometer in the wavelength range of 250 – 400 nm.

### 2.6.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The DSC curve was performed in a DSC-60 calorimeter (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) using the following conditions: dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/ min) and heating rate of 10°C/ min. The RA, CDs, complexes and PMs were accurately weighted and submitted to further heat scanning from 15 to 360 °C in a sealed aluminum pan. An

empty sealed aluminum pan was used as reference. Data analysis was carried out using TA 60 Analysis Software.

#### 2.6.4 Fourier transformed-infrared (FTIR) spectroscopy

Infrared spectra covering the range of 4000–600  $\text{cm}^{-1}$  were obtained for RA, CDs, complexes and PMs with a Spectrum BX FTIR spectrometer with MIRacle ATR accessory (Perkin Elmer, MA, USA). The spectra were an average of 40 scans at a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.6.5 Scanning electron microscopy

The photomicrographs of the RA, CDs, complexes and PMs were taken using a Joel JSM 6060 microscope (Tokyo, Japan) at a voltage of 10 kV. The samples were previously mounted on aluminum stubs using double-sided adhesive tape and vacuum-coated with a thin layer of gold.

#### 2.6.6 Nuclear magnetic resonance spectroscopy

The 1D  $^1\text{H}$  NMR of RA, CD and complexes and 2D (ROEZY)  $^1\text{H}$  NMR of complexes were recorded on a Bruker Ascend 400 MHz spectrometer in order to define the structural organization of complex.

### 2.7 DPPH assay

The antioxidant activity of uncomplexed and complexed RA was assayed using DPPH stable radical according to Brand-Williams et al. (1995). 100  $\mu\text{L}$  of uncomplexed and complexed RA at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were mixed with 3.900  $\mu\text{L}$  of DPPH solution (0.06 mM) dissolved in methanol or methanol: water 50:50 (v:v). These solvents were chosen to assess their effects on antioxidant activity. After 60 minutes, the solutions were read in spectrophotometers at 515 nm. The results are expressed in DPPH scavenging (%). All measurements were made in triplicate.

### 2.8 Compatibility study of excipients

Binary mixtures of RA, RA:HP $\beta$ CD PM and RA:M $\beta$ CD PM with excipients (HPMC, MCC, LAC and MgSTE) were prepared in the 1:1 (w/w) by vortexing for 5 min in glass vials. HPMC (controlled release agent), MCC and LAC (filler agent) and MgSTE

(lubricant agent) are the most common excipients in solid pharmaceutical dosage forms. The compatibility study of RA and PMs with excipients was assessed by DSC, FTIR and LC methods previously described.

## 2.9 Statistical analysis

Statistical data analyses were performed using a one-way ANOVA followed by Tukey's  $p < 0.05$ . Pearson's correlation was applied to analyze the compatibility between RA and excipients. Calculations were performed using the GraphPad Prism program.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Validation of LC method

A methanolic solution of RA at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  has demonstrated retention time of 6.1 minutes, theoretical plates over 5.000, tailing factor lower than 1.1 and resolution higher 10.0 (Figure 1). As expected, both CD used in the experiments did not show any peak in chromatogram, demonstrating the specificity of method to analyze RA. Calibration curves obtained at three consecutive days were statically similar and the analysis of residuals and coefficient of determination ( $R^2$ ) (0.9991) confirmed the linearity of method applied. The LOD and LOQ of the method were calculated based on the standard deviation of the intercept and on the slope of the standard curve, presenting values of 0.04 and 0.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The intra-day precision showed RSD values between 1.4 – 3.2% and inter-day precision RSD values between 1.3 – 3.2%. The accuracy results for RA in CD complexes were within the 95.1% to 103.4% range. With respect to robustness, the initial rate flow was the only factor to affect the quantification of RA (Figure 2), needing a precise control. All results here presented are according to ICH guidelines (2005).

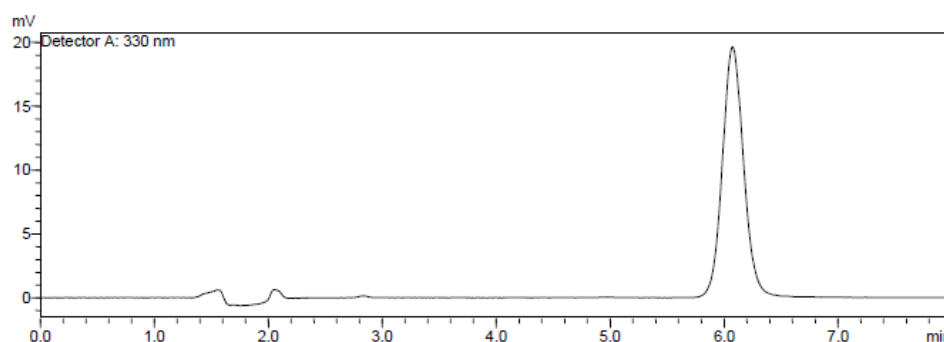


Figure 1. Chromatogram obtained for RA analysis by LC developed method.

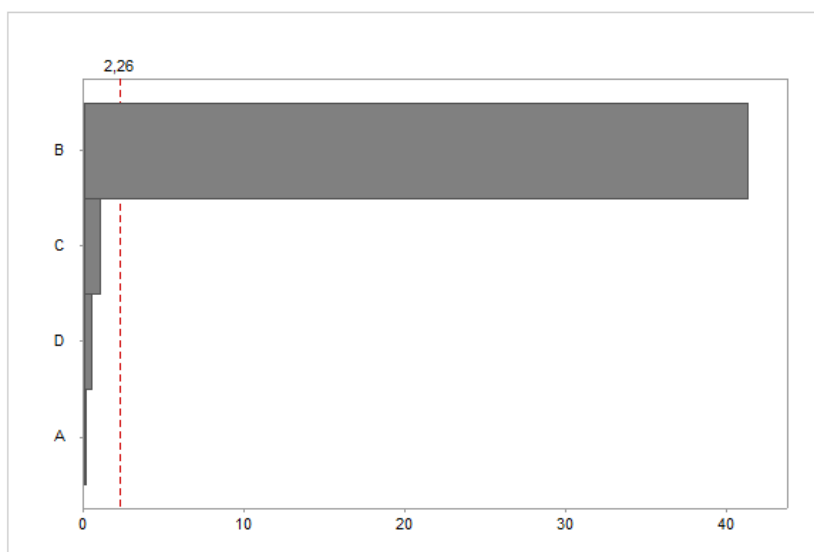


Figure 2. Robustness of LC method analyzed by Plackett-Burman method. (A) Temperature, (B) Initial rate flow, (C) Organic composition and (D) Wavelength.

### 3.2 Determination of complex stoichiometric and apparent stability constant ( $K$ )

The RA aqueous solubility in pH 1.2 without cyclodextrin was near to 5 mM. The phase-solubility diagrams for RA: HP $\beta$ CD and RA: M $\beta$ CD complexes have demonstrated that the increase of cyclodextrin concentration enhances RA solubility (Figure 3), presenting a diagram of AL-type profile, with slope higher than one unit but lesser than two units, characterizing formation of higher-order complex, 2:1 type, with respect to RA (Higuchi & Connors, 1965; Loftsson & Brewster, 2010). Most of research have reported the presence of 1:1 type complex, but studies have demonstrated the 2:1 stoichiometric ratio to some substances as acridine (Correa et al., 2002), ibuprofen (Loftsson et al., 2002),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (Hazekamp & Verpoorte, 2006) and enalapril maleate (Ali et al., 2006).

Çelik et al., (2011) has reported the interaction of RA with different types of cyclodextrins derivatives, as HP $\beta$ CD and RM $\beta$ CD, and a 1:1 stoichiometric ratio but did not show the CD effects on RA solubility. The stoichiometric ratio difference could be explained by the difference in pH of complexation medium, but Aksamija et al. (2016) has performed the complexation of RA with  $\beta$ CD by Job's plot at pH 1.0 and a 1:1 ratio was found. The Job's plot was performed and a 1:1 ratio was found too (Figure

4), demonstrated by the point of inflection on 0.5 molar fraction. So, another hypothesis is the methodology applied. Job's plot methodology frequently shows only 1:1 ratio (Ryzhakov et al., 2016), and is based on analysis of dilute solution of drug and CD, while the phase-solubility studies are performed in aqueous solutions saturated with the drug, then by this method it is more likely to find higher-order complexes than by Job's plot, in which the drug samples is already solubilized (Loftsson et al., 2004; Ryzhakov et al., 2016).

Besides it, we cannot rule out the possible existence of different stoichiometric ratios in solution. De Sousa et al., (2008) has proved the existence of three stoichiometric ratios (1:1, 1:2 and 2:1) in solution between imipramine hydrochloride and  $\beta$ CD, but just one is the most energetically favorable.

This is the first study to report the use of phase-solubility diagram to analysis the complexation behavior between RA and CD. Assuming the phase-solubility study is the most suitable methodology to determinate the stoichiometry, the interaction 2:1 RA:CD was assigned as more probable.

The apparent constant stability ( $K$ ) determined by Equation 1, was 62.010 and 61.454  $M^{-1}$  to RA:HP $\beta$ CD and RA:M $\beta$ CD, respectively, suggesting a great interaction between RA and both CD. Comparing our results with Çelik et al., (2011), we have found differences in the  $K$  value. The  $K$  found by Çelik et al., (2011) to RA:HP $\beta$ CD and RA:M $\beta$ CD was 267 and 328  $M^{-1}$ , respectively, factor that could be related to pH and the stoichiometric molar ratio. Çelik et al., (2011) has used a phosphate buffer solution at pH 7.0, while we have used aqueous solution at pH 1.2. RA has the first pKa between 2.8 – 2.9, where the point of ionization is on carboxylic acid from 3,4-dihydroxyphenyllactic acid moiety (Danaf et al., 2016; Gong et al., 2016). According to Medronho et al., (2014) this moiety is the most favorable to complex due the formation of additional hydrogen bonds with internal (or external)  $\beta$ CD's protons. The second RA pKa is 8.4 and the ionization is on para hydroxyl group from caffeic acid (Danaf et al., 2016). Thus, at pH 7.0, two possible ionizations in opposite sites can be occurring on RA structure, decreasing its affinity toward CD, giving a lower  $K$ . Loukas (1997) has reported that an erroneous stoichiometric ratio determination causes wrong result for  $K$ .

The greater  $K$  was presented to complex with HP $\beta$ CD, while Çelik et al. (2011) found the greater  $K$  to complex with M $\beta$ CD. This can be explained by its higher degree of

substitution of HP $\beta$ CD, which leads to enhance of CD cavity and better complexation (Shönbeck et al., 2010; Schönbeck et al., 2011). In literature it is possible to find  $K$  with  $10^5$  to  $10^7$  magnitude (Manilla et al., 2005; Hazekamp & Verpoorte, 2006; Perry et al., 2006; Dahan et al., 2010; Glisone et al., 2012; Bard-Eldin et al., 2013; Olesen et al., 2016). The  $K$  is a parameter which must be observed as long as the development of pharmaceutical dosage forms with CD is concerned to determine the dissociation equilibrium between free and complexed form of the drug, an important factor to drug absorption (Carrier et al., 2007).

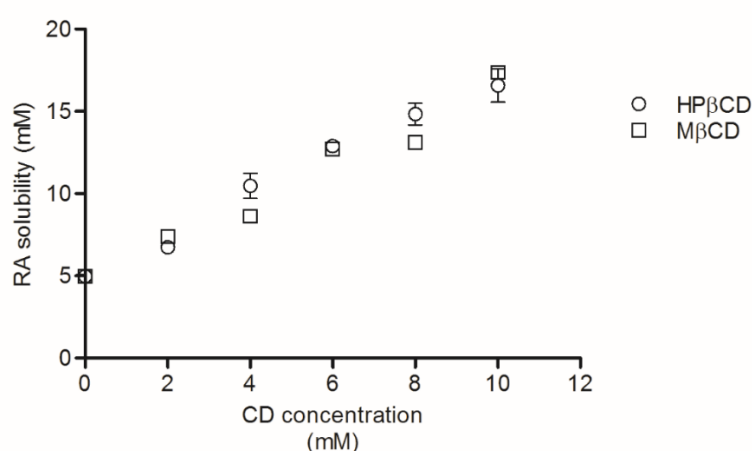


Figure 3. Phase-solubility diagrams of RA with HP $\beta$ CD and M $\beta$ CD.

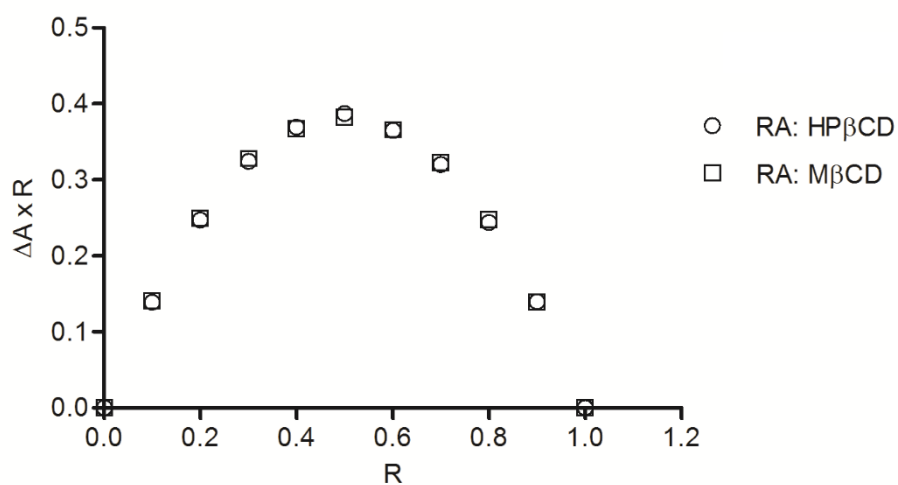


Figure 4. Job's plot for RA and HP $\beta$ CD and M $\beta$ CD.

### 3.3 Complex characterization

#### 3.3.1 RA content in complexes

The RA:CD complexes are presented as a yellow and bright powder. The RA content was  $0.247 \pm 0.00056$  and  $0.302 \pm 0.00006$  mg/mg to RA: HP $\beta$ CD and RA: M $\beta$ CD complexes, respectively. The yield to RA: HP $\beta$ CD was 87.25% and to RA: M $\beta$ CD was 86.11%. The high RA content in complexes powder overcame a formulation bulk need, avoiding excess amounts of CD (Loftsson & Brewster, 2012).

#### 3.3.2 UV/ vis spectrophotometric

The uncomplexed RA has showed a maximum absorbance at 330 nm, while the complexes have showed a slight hypsochromic shift (329 nm) and increase of absorption (Figure 5). The transfer of RA from an aqueous medium to the non-polar CD cavity has created a new chemical environment, justifying these modifications in UV/vis spectrum and evidencing the interaction of RA with CD (Mura, 2014). A bathochromic shift and decrease of absorption was found by Çelik et al., (2011), using a solution at pH 7.0. Likely, these differences in results can be related to solvent pH used which can modify the maximum wavelength absorption and intensity (Danaf et al., 2016).

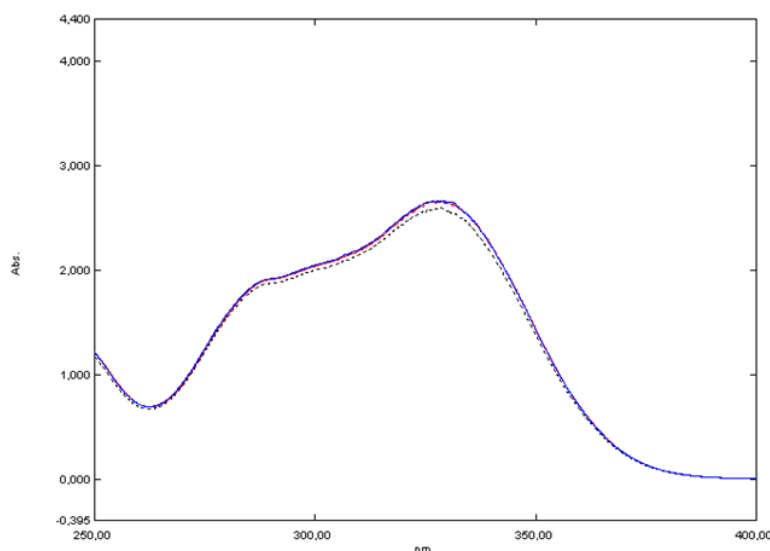


Figura 5. UV/ vis spectro of uncomplexed (dotted line) and complexed RA with HP $\beta$ CD (red line) and M $\beta$ CD (blue line).

#### 3.3.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)



Thermogram of RA shows a characteristic endothermic peak at 173°C. The thermograms of HP $\beta$ CD and M $\beta$ CD show the same profile with an endothermic peak ranging between 90 – 130°C and a decomposition peak above 300°C (Mura et al., 2015). In the thermograms of complexes, the RA melting point peak completely disappear and HP $\beta$ CD and M $\beta$ CD peaks show a slightly shifted. In the RA:CD PMs, a shifted of peak relative to RA melting point to low temperature can be observed, it suggests the non-complete complexation (Figure 6).

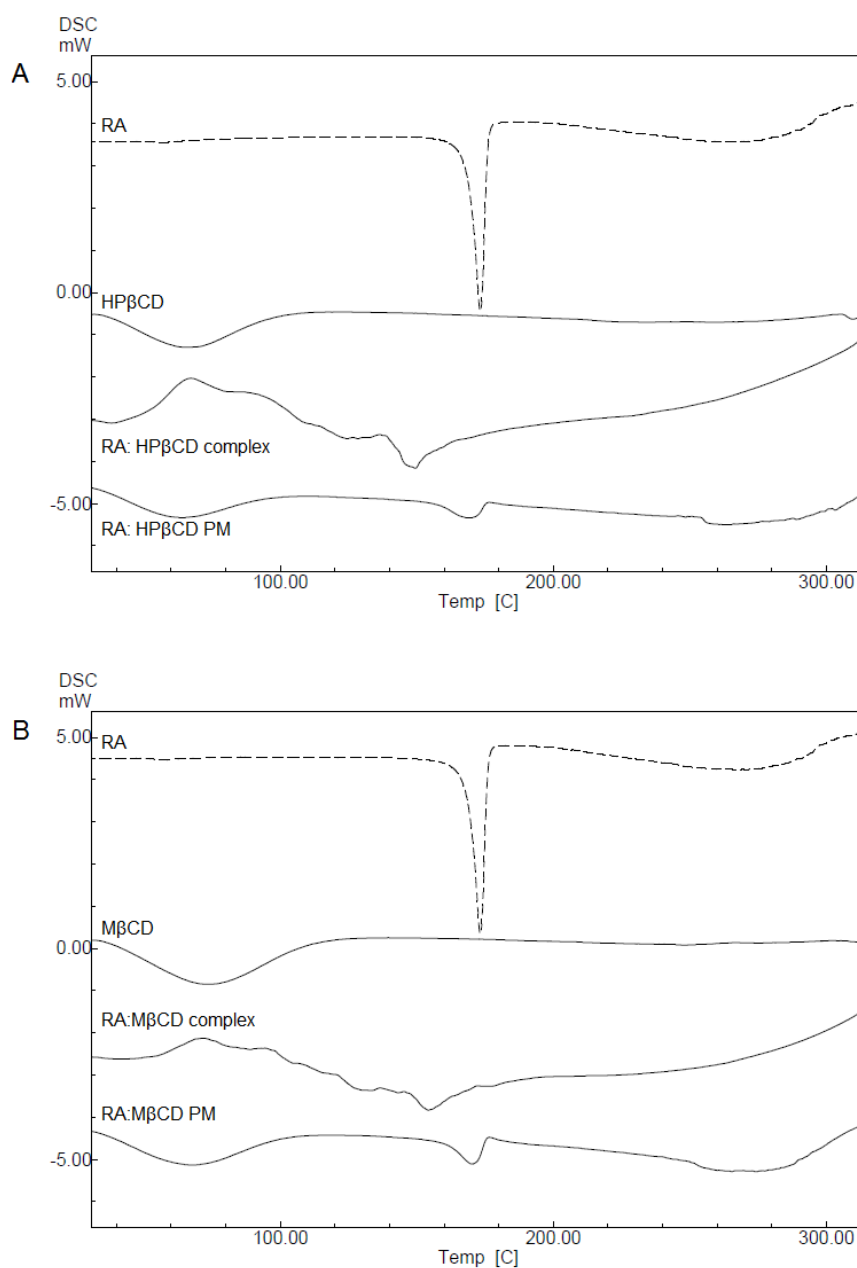


Figure 6. Thermograms of (A) RA, HP $\beta$ CD, RA: HP $\beta$ CD complex and RA: HP $\beta$ CD PM and (B) RA, M $\beta$ CD, RA: M $\beta$ CD complex and RA: M $\beta$ CD PM.

### 3.3.4 Fourier transformed-infrared (FTIR) spectroscopy

FTIR spectrum of RA (Figure 7) showed bands in 3453 and 3396  $\text{cm}^{-1}$  related to phenolic  $\text{-OH}$  stretching frequency, 3168  $\text{cm}^{-1}$  related to  $\text{C-H}$  stretching frequency,  $\sim 1700$   $\text{cm}^{-1}$  related to  $\text{C=O}$  stretching frequency, 1646  $\text{cm}^{-1}$  related to  $\text{C=C}$  stretching frequency, 1617 and 1516  $\text{cm}^{-1}$  related to aromatic  $\text{C-C}$  stretching frequency, 1464  $\text{cm}^{-1}$  related to  $\text{C-C}$  stretching frequency or  $\text{CH}_2$  bending, 1284 to 1075  $\text{cm}^{-1}$  related to aromatic  $\text{C-H}$  bending or  $\text{C-O}$  stretching, 971  $\text{cm}^{-1}$   $\text{H-C(=C)}$  bending and 851 to 688  $\text{cm}^{-1}$  aromatic  $\text{C-H}$  (Mariappan et al., 2012). The FTIR spectrum of  $\text{HP}\beta\text{CD}$  (Figure 7A) showed characteristic band at 3338  $\text{cm}^{-1}$  related to  $\text{O-H}$  stretching, 2925  $\text{cm}^{-1}$  related to  $\text{C-H}$  ( $\text{CH}_3$  or  $\text{CH}_2$ ) stretching, 1646  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{H-O-H}$  bending), 1331  $\text{cm}^{-1}$  and  $\sim 1000$   $\text{cm}^{-1}$  related to  $\text{C-O}$  stretching (Yatsu et al., 2013).  $\text{M}\beta\text{CD}$  FTIR spectrum has presented a similar profile to  $\text{HP}\beta\text{CD}$ , except for the lower transmittance intensity presented to  $\text{-OH}$  band (Figure 7B). In both complexes spectrum, the bands corresponding to  $\text{-OH}$  moieties from RA are overlapped by  $\text{-OH}$  band from CD. The strong bands relative to  $\text{C=O}$ , aromatic  $\text{C-H}$  and  $\text{C-C}$  bands and  $\text{C-O}$  band had their transmittances reduced. Other bands from RA could not be identified. These changes can suggest the possibility of interaction between RA and cyclodextrins as by caffeoyl moiety as by 3,4-dihydroxyphenyllactic moiety. The FTIR spectrum of physical mixture showed peaks corresponding to the original compounds (Figure 7).

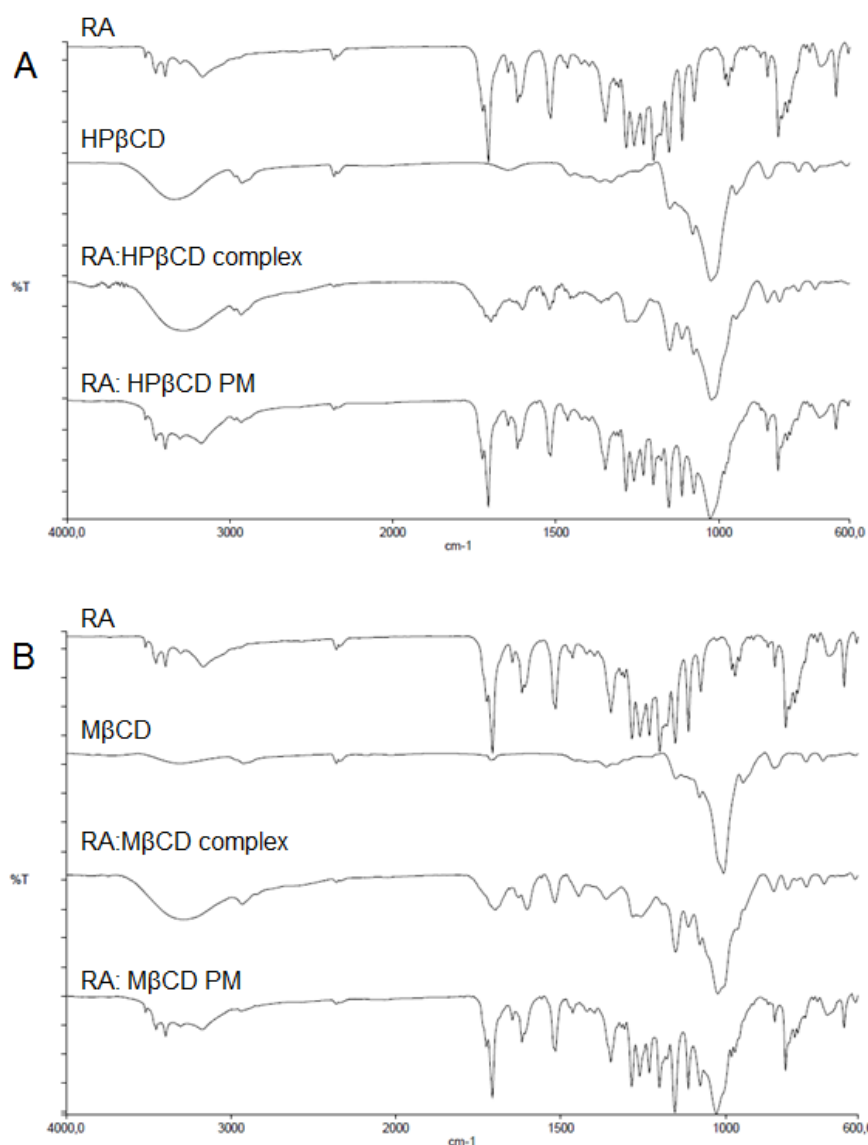


Figure 7. FTR spectrum of (A) RA, HP $\beta$ CD, RA: HP $\beta$ CD complex and RA: HP $\beta$ CD PM and (B) RA, M $\beta$ CD, RA:M $\beta$ CD complex and RA:M $\beta$ CD PM.

### 3.3.5 Scanning electron microscopy

The photomicrographs obtained for RA, HP $\beta$ CD, M $\beta$ CD, RA:HP $\beta$ CD, RA:M $\beta$ CD complexes and physical mixtures are presented in Figure 8. The RA presented a crystal particle with smooth surface, in many different sizes and prismatic shape. Both CDs have showed amorphous spherical particles with different sizes. The complexes have presented amorphous particles without size or shape defined and in the PMs is possible to observe RA crystals and CD amorphous spherical particles.

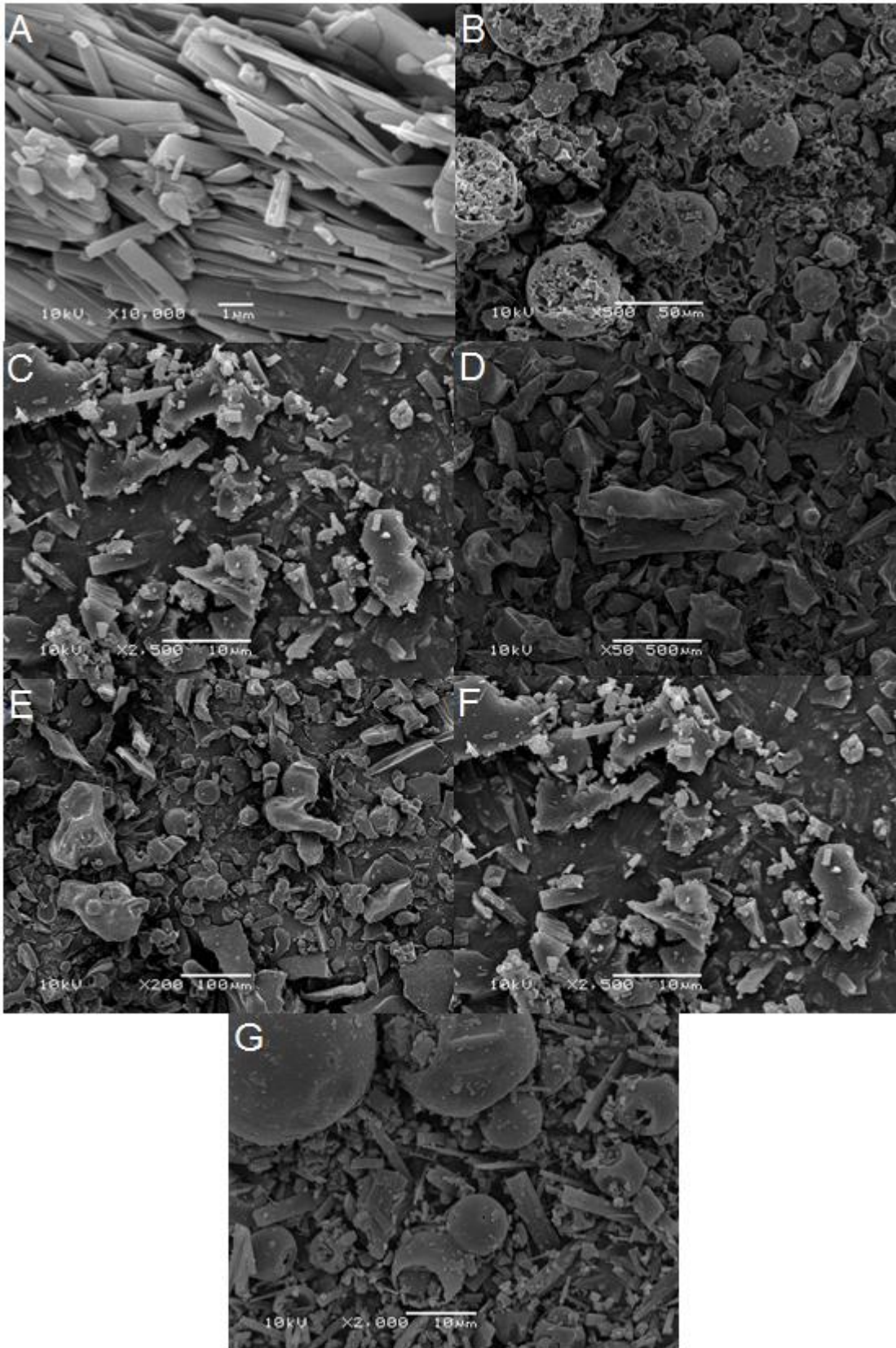


Figure 8. Photomicrographs obtained by scanning electron microscopy of RA (A), HPβCD (B), MβCD (C), RA: HPβCD complex (D), RA: MβCD complex (E), RA: HPβCD PM (F) and RA: MβCD PM (G).

### 3.3.8 Nuclear magnetic resonance spectroscopy

The assignments of RA, HP $\beta$ CD and M $\beta$ CD (Figures 9 and 10) protons has been reported in literature (Castelli et al., 2008; Zime-Diawara et al., 2012; Wang et al., 2015; Aksamija et al., 2016), so they will not be described here. The analyses of 1D  $^1\text{H}$  NMR complexes spectrums showed an upfield shift on RA protons signals (Table 1), suggesting some perturbation on RA protons due the complexation with CD (Tsao et al., 2012; Yatsu et a., 2013), excepted on H8' proton, which presented a downfield shift, probably because this proton has entered on CD cavity, but in stable complex form, it was been exposed to solvent again (Hazekamp & Verpoorte, 2006). Small shift displacement ( $\Delta\delta$ ) values are indicative of a relative weak interaction, thus we can summarize that 3,4-dihydroxyphenyllactic acid moiety has more affinity to CD than caffeic acid moiety. This was postulated by Medronho et al., (2014) complexing RA with the parent  $\beta$ CD, where the 3,4-dihydroxyphenyllactic acid moiety has demonstrated a stronger  $K$  than caffeic acid moiety. To be sure about how the complexation occurs, the 2D (ROESY) analyses were performed. The analysis of ROESY spectrum of RA:HP $\beta$ CD has shown great cross peak between RA protons and HP $\beta$ CD's protons (Figure 11), but due the overlapping of HP $\beta$ CD's signal protons it is hard to confirm which RA's protons are complexing with HP $\beta$ CD's protons. The caffeic acid moiety can be interacting by inclusion at HP $\beta$ CD H3 or non-inclusion at HP $\beta$ CD H6, while 3,4-dihydroxyphenyllactic acid moiety is interacting by non-inclusion at HP $\beta$ CD H2, H4 or H7. In RA:M $\beta$ CD ROESY is possible to see interaction between RA aromatic protons (H2, H5, H6, H2', H5' and H6') and vinylic protons (H7 and H8) as inner M $\beta$ CD's protons (H3) as outside M $\beta$ CD's protons (H4, H6 and 2OMe), confirming the presence of inclusion and non-inclusion complexes (Figure 12). The inclusion and non-inclusion complexes have also been found by other authors who reported 2:1 ratio (Correa et al., 2002; Loftsson et al., 2002; Hazekamp & Verpoorte, 2006) and only one study has reported the presence of two inclusion complexes (Ali et al., 2006).

Table 1. Effect of complexation on RA protons shift displacement ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{uncomplexed}}$ ).

RA Proton	$\Delta\delta$ (ppm)	
	RA: HP $\beta$ CD	RA: M $\beta$ CD
H7	-0.03	-0.03
H2	-0.02	-0.04
H6	0.00	-0.03
H5	-0.02	-0.03
H2'	-0.02	-0.05
H5'	-0.03	-0.05
H6'	-0.01	-0.06
H8	-0.03	-0.07
H8'	+0.01	+0.02
H7'	-0.04	-0.09

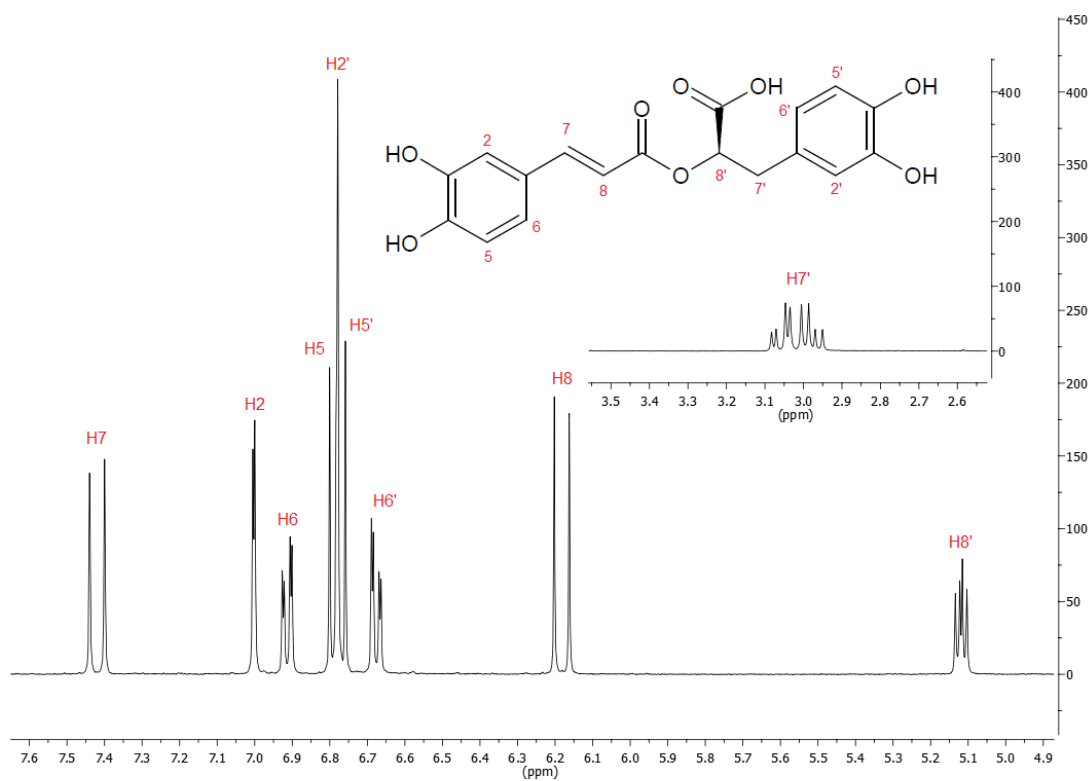


Figure 9. 1D  $^1\text{H}$  NMR of RA at  $\text{D}_2\text{O}$  (pH 1.0):  $\delta/\text{ppm} = 7.42$  (d,  $J=16.0$  Hz, H7), 7.00 (dd,  $J=2.0$  Hz, H2), 6.91 (dd,  $J=8.3, 2.0$  Hz, H6), 6.80 (d,  $J=8.0$  Hz, H5), 6.78 (d,  $J=1.5$  Hz, H2'), 6.76 (d,  $J=8.0$  Hz, H5'), 6.68 (dd,  $J=8.1, 2.0$  Hz, H6'), 6.18 (d,  $J=16$  Hz, H8), 5.12 (dd,  $J=7.5, 4.8$  Hz, H8'), 3.06 (ddd,  $J=14.4, 4.8$  Hz, H7').

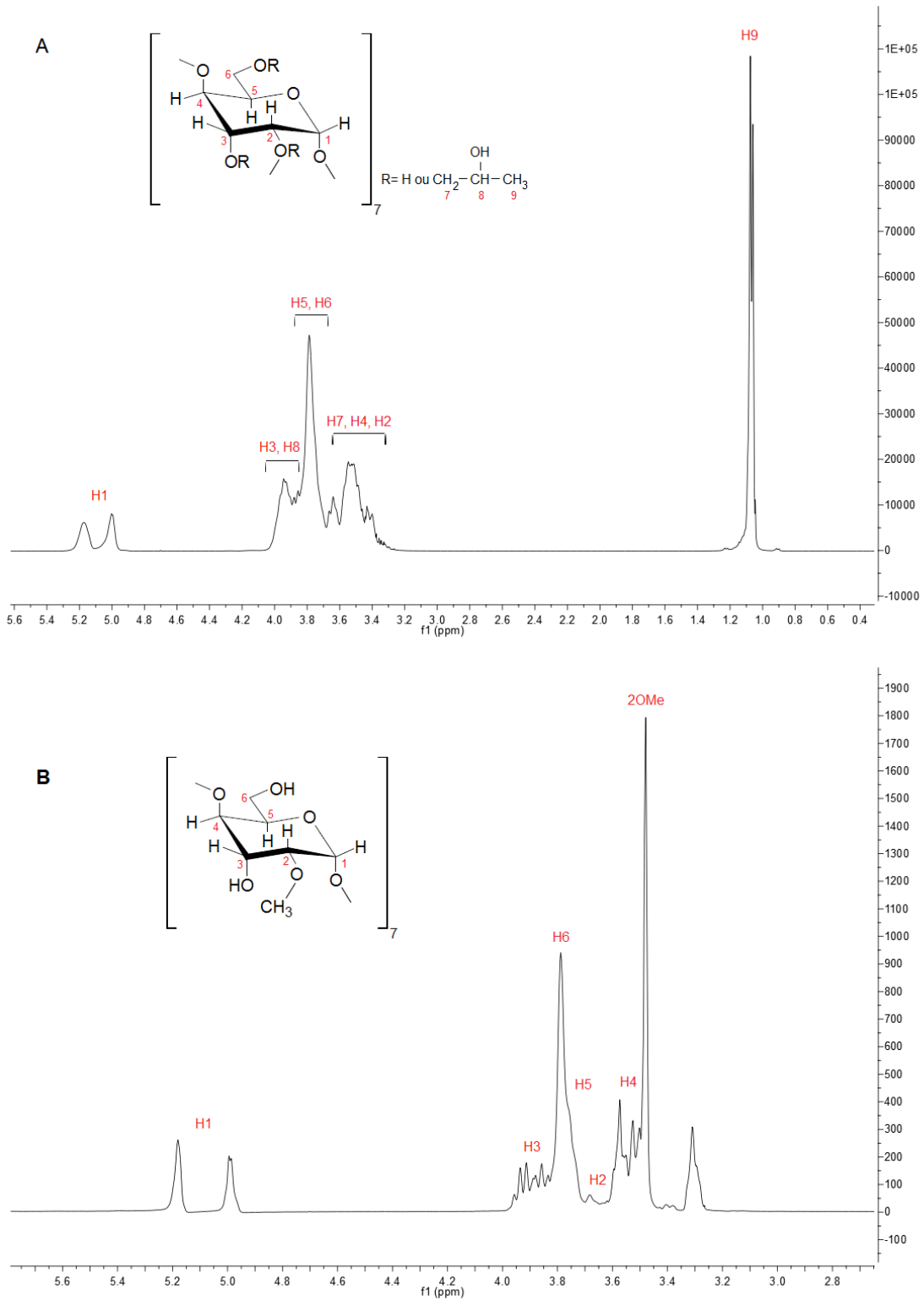


Figure 10. 1D NMR  $^1\text{H}$  spectrum of (A) HP $\beta$ CD and (B) M $\beta$ CD at  $\text{D}_2\text{O}$  (pH 1.0).

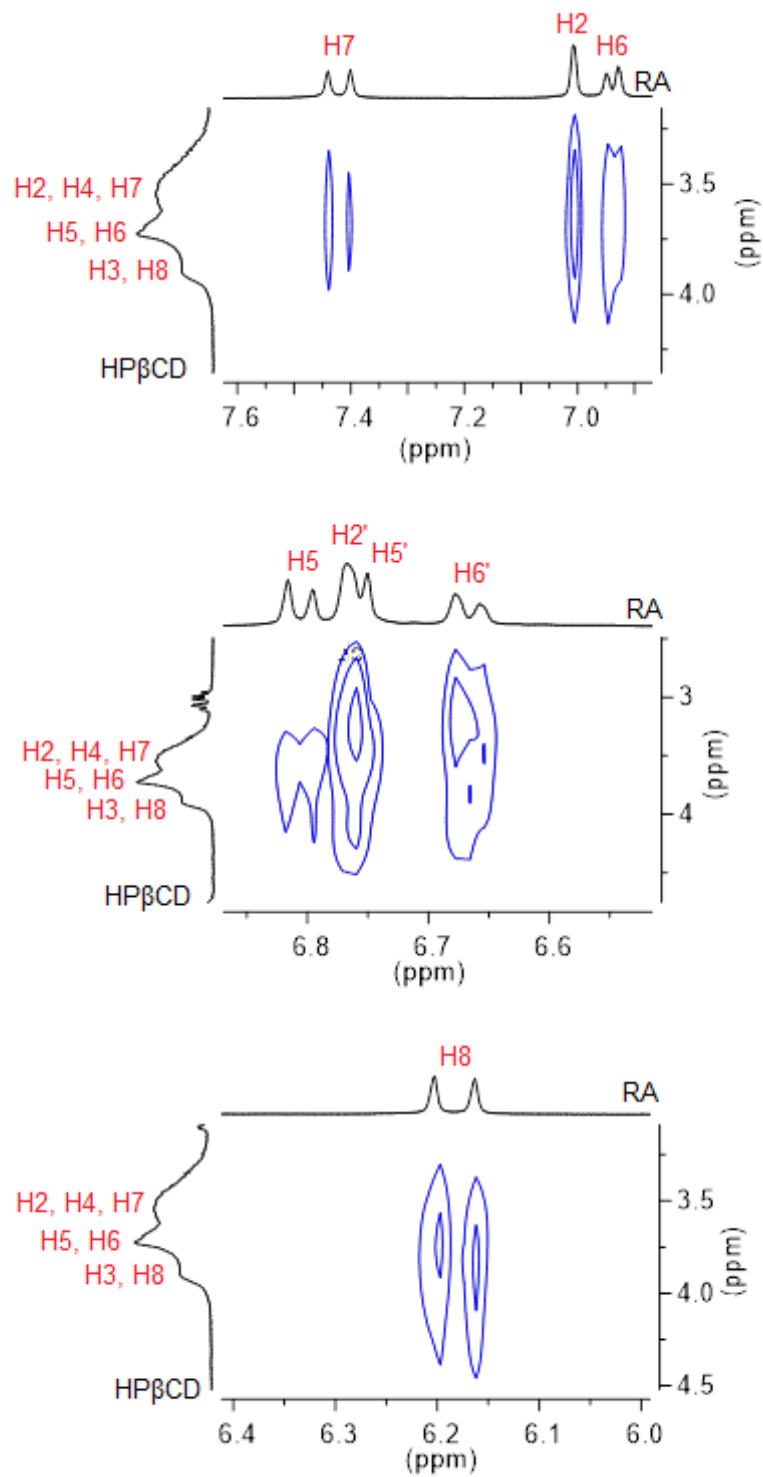


Figure 11. ROESY spectrum of RA: HPβCD complexes at D<sub>2</sub>O (pH 1.0).



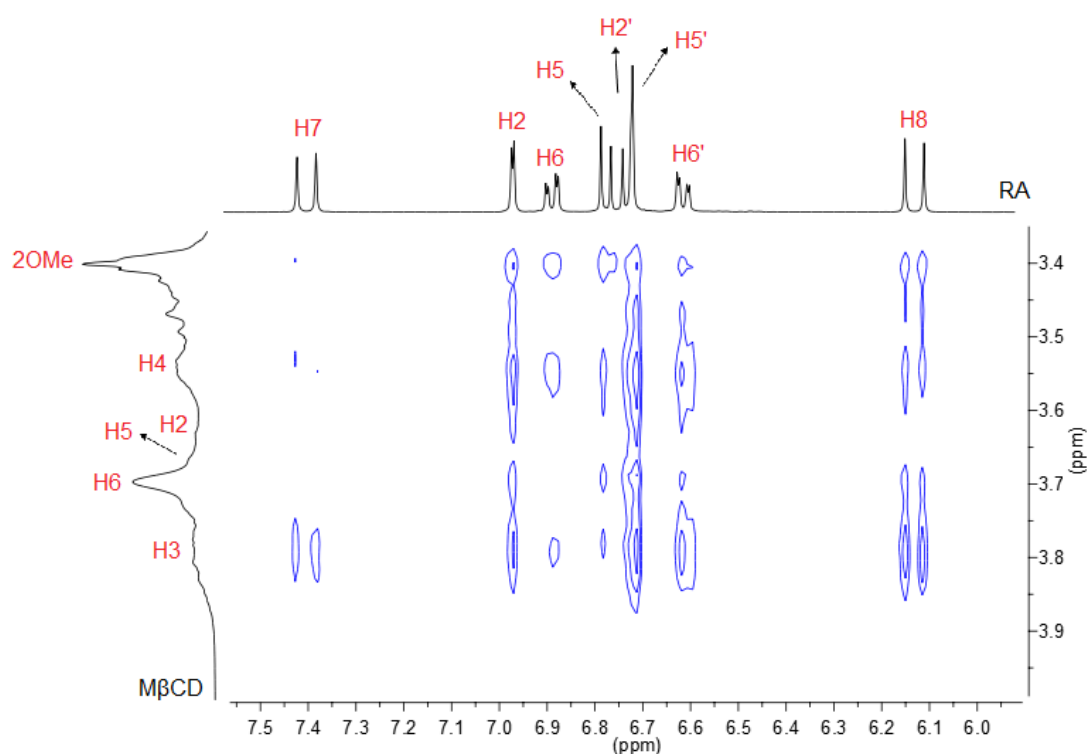


Figure 12. ROESY spectrum of RA: M $\beta$ CD complexes at D<sub>2</sub>O (pH 1.0).

### 3.4 Antioxidant activity

The antioxidant activity by DPPH assay has shown different results to uncomplexed and complexed RA according to solvent used. The DPPH scavenging (%) potential of RA uncomplexed using methanol: water was 1.59-fold higher than methanol alone (Figure 13). RA can present a mixed action against DPPH radical by hydrogen and electron transfer which is affected by medium solvent. Methanol is a hydrogen bonding solvent, which decreases the transfer of protons, while water supports ionization of solutes, enhancing the hydrogen transfer and DPPH scavenging (Xie & Schaich, 2014; Schaich & Xie, 2015). The complexes have shown a superior DPPH scavenging in methanol and methanol: water solvents comparing to uncomplexed RA and they have shown a similar activity, what can be related to similar *K* between them. These results are confirmed by Çelik et al., (2011) and Medronho et al., (2014) who have demonstrated the capacity of natural and derivatives CDs to increase the antioxidant potential of RA by CUPRAC and ORAC methods. The increment of activity is related to formation of hydrogen bonds between RA and CD, weakening the RA intramolecular hydrogen bonds, thus facilitating the release of these to react with DPPH radical

(Pápay et al., 2016). The DPPH scavenging potential (%) of complexes in methanol: water was lower than in methanol medium. This was also reported by Ferreira et al., (2013), who has observed an enhancement of antioxidant activity as long as the organic solvent ratio increases. As mentioned above, in water medium, RA can react with DPPH by hydrogen transfer, decreasing the CD effect on RA hydrogen bonds, what can explain the complexes antioxidant activity decrease (Xie & Schaich, 2014; Schaich & Xie, 2015). Another hypothesis is the possible competition of DPPH radical for CD cavity (Nakanishi et al., 2015). Nevertheless, the complexes have shown a slight higher activity than RA uncomplexed. CD alone did not show any effect on DPPH radical.

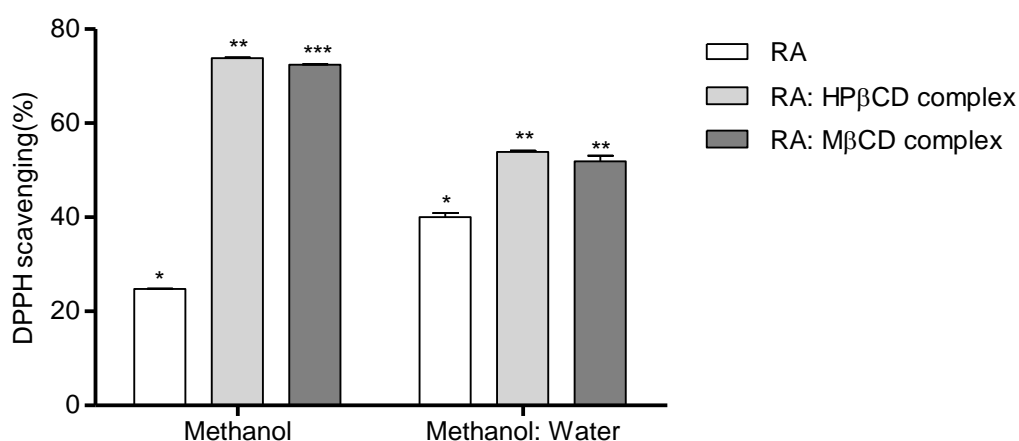


Figure 13. DPPH scavenging by uncomplexed and complexed RA at 50  $\mu$ g/mL.

Besides the antioxidant potential increase, CD increases the physical-chemical stability of compound submitted to harmful external and internal body environment (Loftsson & Brewster, 1996). The RA powder present a great stability when submitted to different external conditions (Razborzek, 2011), but degradation has been reported in gastrointestinal medium, decreasing its bioaccessibility (Gayoso et al., 2016) and cellular antioxidant activity (Adomako-Bonsu et al., 2017).

Therefore, the use of RA:CD complexes could overcome this issue and afford the development of pharmaceutical dosage forms with RA as antioxidant agent, based in the research for natural antioxidants (Brewer, 2011).

### 3.5 Compatibility study of excipients

The assessment of drug-excipients compatibility is the first stage before formulating a pharmaceutical dosage forms, allowing to know possible physical and chemical interactions between drug and excipient which can alter the stability, bioavailability, and effectiveness of active pharmaceutical ingredient (Verma & Garg, 2005; Tita et al., 2011).

Many techniques may be employed to assay drug-excipients compatibility, among them DSC, FTIR and LC methods which present as advantages fast data acquisition, low samples consumption and other relative to each technique (Chadha & Bhandari, 2014).

Since RA:CD complexes are formed by interaction between these two molecules and at DSC thermograms and FTIR spectra of complexes the RA characteristics have changed as showed before, turning its analyses impossible or inaccurate, the PMs were used in compatibility study to performed the excipients effect on RA and CD together.

The analysis of RA DSC thermograms shows a characteristic endothermic peak approximately at 173°C. RA: HP $\beta$ CD PM and RA: M $\beta$ CD PM thermograms shows a broad endothermic peak at 72°C corresponding to CD and another peak at 170°C and 172°C, respectively, corresponding to RA, as previously related. HPMC and MCC thermograms has shown a broad endotherm peak at 71.90°C and 65.50°C, respectively, corresponding to the loss of water (Vueba et al., 2006; Gao et al., 2015). LAC thermograms has demonstrated three endothermic events. The first at 146.48°C related to dehydration, the second at 218.78°C related to melting point and the third at 242.79°C (Wu et al., 2014; Gao et al., 2015). MgSTE thermogram shows two endothermic events. One at 83.96°C related to loss of water and another at 112.07°C, related to overlap of dehydration and melting point (Rao et al., 2005) (Figure 14).

The thermal profile of RA does not overlap with any thermal event of excipients, so it is expected that thermograms of RA/excipients to be the superposition of both thermal profiles, whereas thermal profile of PMs overlap with HPMC, MCC and MgSTE, but this overlapping does not affect the analysis of RA.

The peak of temperature ( $T_{\text{peak}}$ ), onset transition temperature ( $T_{\text{onset}}$ ) and enthalpy ( $\Delta H$ ) of RA, PMs and binary mixtures are summarized in table 2.

Comparing the thermograms of binary mixtures is possible to observe the corresponding RA melting point peak, being this the first indicative of no interaction with excipients. The shift of peak ( $T_{\text{onset}}$  and  $T_{\text{peak}}$ ) or enthalpy reduction (lesser than a half of RA isolated and PM) has been related as an incompatibility (Daniel et al., 2013), but these variations can be an effect of heterogeneity in samples, due the low weight necessary to analysis (1–2 mg) (Gao et al., 2015; Lima et al., 2015b). The most difference at  $T_{\text{onset}}$  and  $T_{\text{peak}}$  has presented for binary mixtures between RA/LAC, RA:HP $\beta$ CD PM/LAC, RA:HP $\beta$ CD PM/MgSTE, RA:M $\beta$ CD PM/MgSTE. The lower shift present to mixtures with LAC can be due to the partial miscibility between samples and LAC (Pani et al., 2012). Furthermore, the samples are submitted to high temperatures and possible interactions between them may not be applicable in ambient conditions, resulting in misleading or inconclusive results (Chadha & Bhandari, 2014).

Table 2. Temperatures and enthalpy of melting ( $\Delta H$ ) values for RA, RA/Excipients, PMs, and PMs/Excipients.

Samples	$T_{\text{peak}}/^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{onset}}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/\text{J g}^{-1}$
RA	173.71	169.15	125.93
RA/HPMC	173.99	168.24	44.33
RA/MCC	174.50	169.30	93.51
RA/LAC	171.97	165.77	35.57
RA/MgSTE	174.46	169.77	73.56
RA: HP $\beta$ CD PM	169.03	158.63	35.03
RA: HP $\beta$ CD PM /HPMC	172.11	157.78	13.45
RA: HP $\beta$ CD PM /MMC	173.63	162.79	15.77
RA: HP $\beta$ CD PM /LAC	167.06	155.35	11.04
RA: HP $\beta$ CD PM /MgSTE	173.69	168.47	21.20
RA: M $\beta$ CD PM	171.93	163.29	30.15
RA: M $\beta$ CD PM /HPMC	172.64	164.84	15.30
RA: M $\beta$ CD PM /MCC	173.92	165.57	19.26
P RA: M $\beta$ CD PM /LAC	173.57	166.37	10.50
RA: M $\beta$ CD PM /MgSTE	173.69	168.52	20.19

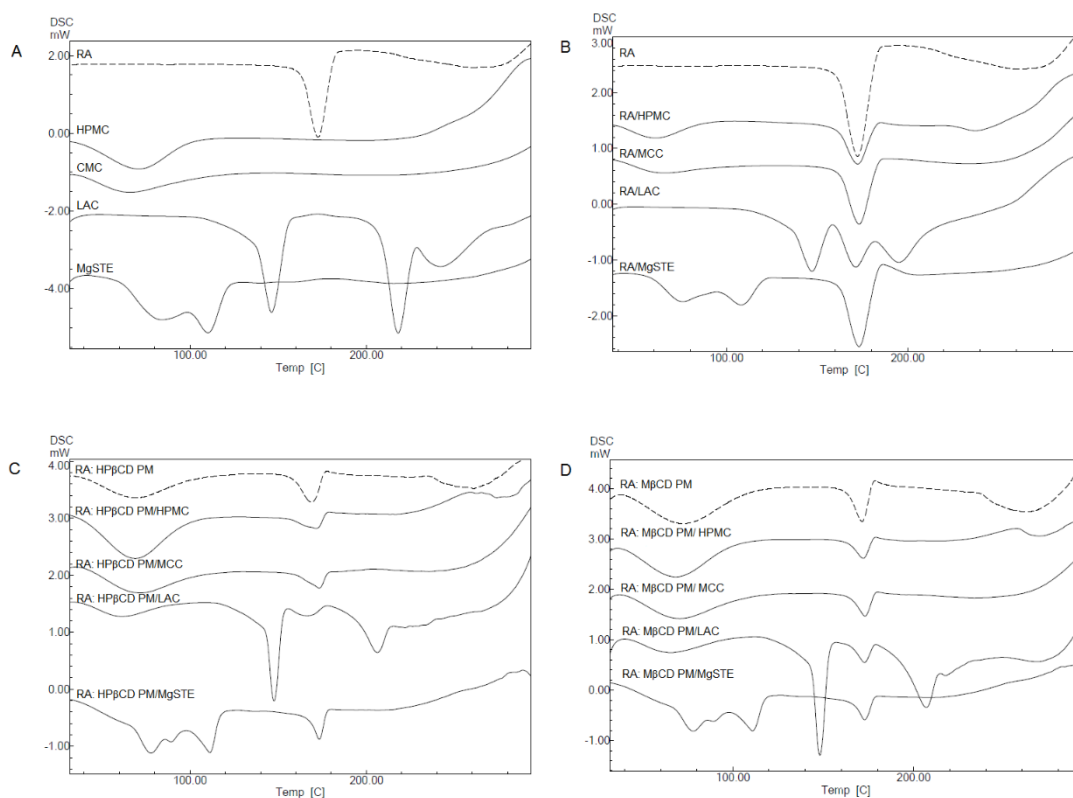


Figure 14. DSC thermograms of (A) RA and excipients, (B) RA and binary mixtures, (C) RA:HP $\beta$ CD PM and mixtures and (D) RA:M $\beta$ CD PM and mixtures.

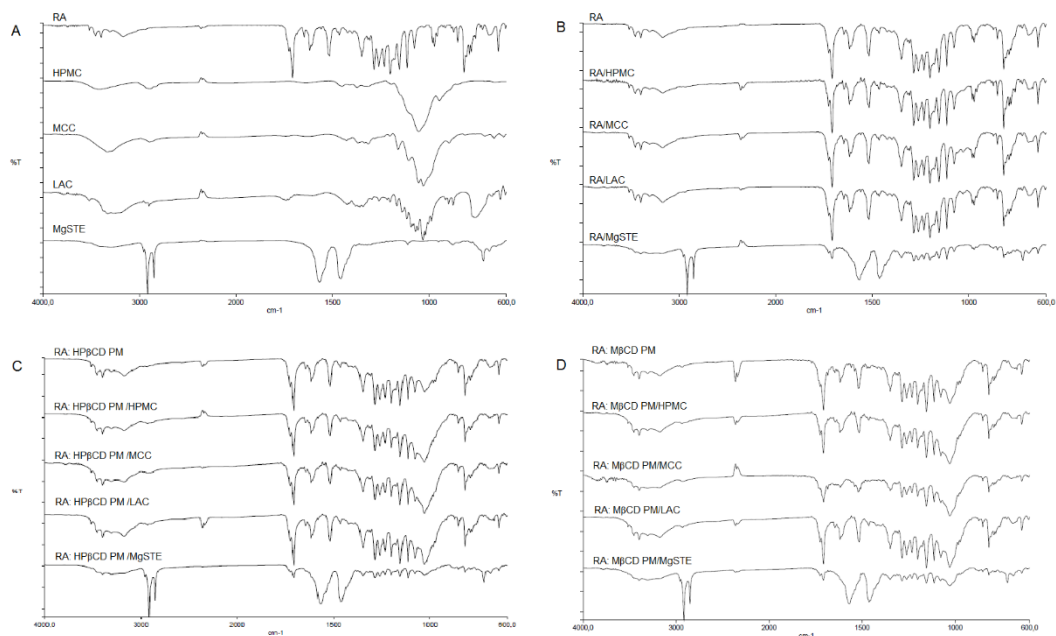


Figure 15. FTIR spectrum of (A) RA and excipients, (B) RA and binary mixtures, (C) RA:HP $\beta$ CD PM and mixtures and (D) RA:M $\beta$ CD PM and mixtures.

The RA and PMs FTIR spectrums were previously described. The FTIR spectrum of binary mixtures between RA/excipients and PMs/excipients have demonstrated a similar profile to mixtures with HPMC, MCC and LAC, suggesting no incompatibilities or interaction with these excipients. Though, the binary mixtures with MgSTE the only bands visible referent to RA are  $1700\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching) and  $1300\text{ to }1100\text{ cm}^{-1}$  (C–O stretching), approximately, both weakly, suggesting interaction with this excipient (Figure 15).

To take a deep analysis and just not visual about the possible interaction between RA, PMs and respective binary mixtures FTIR spectrums were submitted to Pearson's correlation statistical analysis, taking RA and PMs as theoretical spectra and binary mixtures as experimental spectra. Correlations between 0.80 and 1.00 indicate of simple mixture of solids. Correlations between 0.5 and 0.80 indicate of possible interactions and below 0.50 indicative of low similarity between spectrums, demonstrating chemical degradation (Da Silva et al., 2016; Lima et al., 2015a).

The results of Pearson's correlation are demonstrated in figure 16. The highest correlation to RA was obtained to RA/HPMC ( $r = 0.960$ ), followed by RA/LAC ( $r = 0.949$ ) and RA/MCC ( $r = 0.935$ ). To RA:HP $\beta$ CD PM, the highest correlation was found to LAC ( $r = 0.974$ ), followed by HPMC ( $r = 0.956$ ) and MCC ( $r = 0.947$ ). To RA:M $\beta$ CD PM, the highest correlation was found to LAC ( $r = 0.959$ ), followed by MCC ( $r = 0.926$ ) and HPMC ( $r = 0.916$ ). To MgSTE a correlation lesser than 0.65 was found in all binary mixtures, what suggest incompatibility between this excipient and RA and PMs.

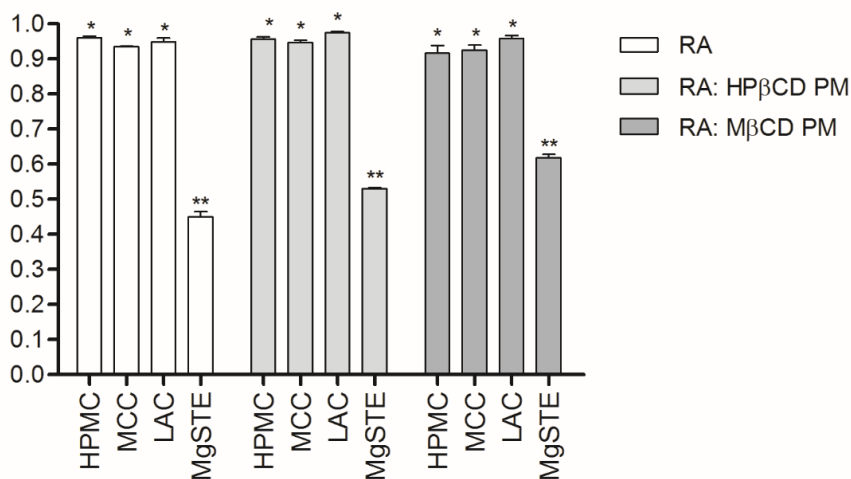


Figure 16. Plot of the Pearson's correlation (r) of binary mixtures.

The LC chromatograms of excipients did not show any peak, allowing the RA quantification without interferences (Figure 17). The LC analyzes of RA/excipients, RA:HP $\beta$ CD PM/excipients and RA:M $\beta$ CD PM/excipients have showed just one peak corresponding to RA and the recovery was next to 100%. The retention time, peak shape, tailing factor, resolution and theoretical plates have remained unchanged and the absence of degradation peaks in chromatogram confirm the compatibility with excipients (Kumar et al., 2009).

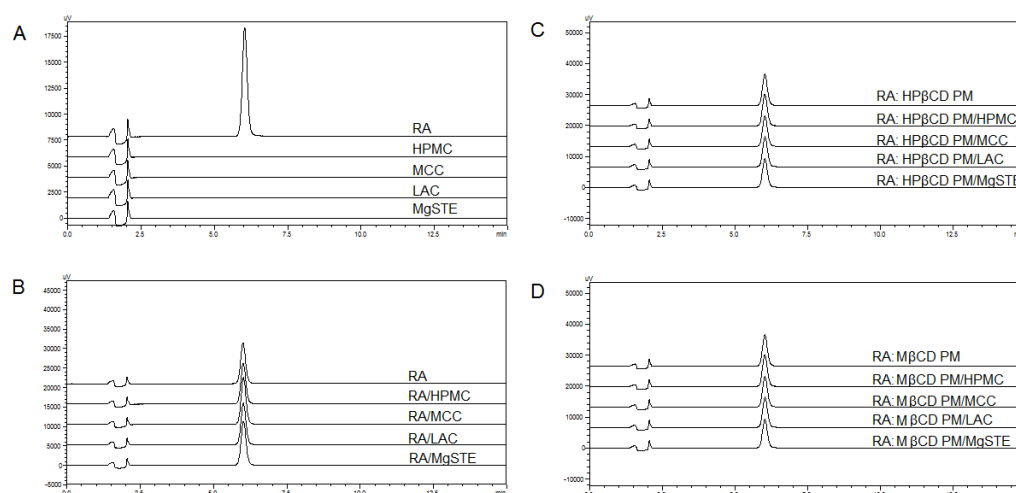


Figure 17. LC chromatograms of (A) RA and excipients, (B) RA and binary mixtures, (C) RA: HP $\beta$ CD PM and binary mixtures and (D) RA: M $\beta$ CD PM and binary mixtures.

The MgSTE was the only one excipient in the compatibility study to present an expressive incompatibility with RA and PMs by FTIR method, but it is important to note that the usual concentration of MgSTE in solid dosage is among 0.25 – 1.00 % (Rowe et al., 2012), then some interaction found on compatibility study is not likely to be relevant in a solid dosage form.

#### 4. Conclusion

The data obtained in the present study indicate a great complexation between RA and both derivatives CD, at 2:1 ratio (RA:CD), resulting in a high RA content in complexes powder, avoiding a large bulk formulation. The complexes were characterized as inclusion and non-inclusion complexes which have increased the RA antioxidant

activity. The RA and it in presence of both derivatives CD was compatible with most of the excipients tested but MgSTE.

## References

ABEDINI, A.; ROUMY, V.; MAHIEUX, S.; BIABIANY, M.; STANDAERT-VITSE, A.; RIVIERE, C.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F.; NEUT, C.; HENNEBELLE, T. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 1–11, 2013.

ADOMAKO-BONSU, A.; CHAN, S.L.F.; PRATTEN, M.; FRY, J. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology in Vitro*, v. 40, p. 248–255, 2017.

AKSAMIJA, A.; POLIDORI, A.; PLASSON, R.; DANGLES, O.; TOMAO, V. The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: A thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, v. 208, p. 258–263, 2016.

ALI, S.M.; MAHESHWARI, A.; ASMAT, F.; KOKETSU, M. Complexation of enalapril maleate with  $\beta$ -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solution. *Química Nova*, v. 4, p. 685–688, 2006.

BABA, S.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TERAU, J. Orally administrated rosmarinic acid is present as conjugated and/or methylated forms in plasm, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Science*, v. 75, p. 165–178, 2004.

BABA, S.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; YASUDA, A.; MUTO, Y.; HIYOSHI, K.; TAKANO, H.; YOSHIKAWA, T.; TERAU, J. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *European Journal of Nutrition*, v. 44, p. 1–9, 2005.

BARD-ELDIN, S.M.; AHMED, T.A.; ISMAIL, H.R. Aripiprazole-cyclodextrin binary systems for dissolution enhancement: Effect of preparation technique, cyclodextrin type and molar ratio. *Iranian Journal of Basic Medicinal Science*, v. 16, p. 1223–1231, 2013.

BOONYARIKPUNCHAI, W.; SUKRONG, S.; TOWIWAT, P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 124, p. 67–73, 2014.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, p. 221–247, 2011.



CAMPOS, D.A.; MADUREIRA, A.R.; GOMES, A.M.; SARMENTO, B.; PINTADO, M.M. Optimization of the production of solid Witepsol nanoparticles loaded with rosmarinic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 115, p. 109–117, 2014.

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, v. 123, p. 78–99, 2007.

CASTELLI, V.V.A.; TRIVIERI, G.; ZUCHELLI, I.; BRAMBILLA, L.; BARBUZZI, T.; CASTIGLIONI, C.; PACI, M.; ZERBI, G.; ZANOL, M. Characterization of an inclusion complex between cladribine and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, p. 3897–3906, 2008.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening – Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, p. 82–97, 2014.

ÇELİK, S.E.; ÖZYÜREK, M.; TUFAN, A.N.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 78, p. 1615–1624, 2011.

CORREA, I.; BEZZENINE, N.; RONZANI, N.; PLATZER, N.; BELOEIL, J-C.; DOAN, B-T. Study of inclusion complexes of acridine with  $\beta$ - and (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin by use of solubility diagrams and NMR spectroscopy. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v. 15, p. 647–659, 2002.

DA SILVA, E.P.; PEREIRA, M.A.V.; LIMA, I.P.B.; LIMA, N.G.P.B.; BARBOSA, E.G.; ARAGÃO, C.F.S.; GOMES, A.P.B. Compatibility study between atorvastatin and excipients using DSC and FTIR. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.123, 2016.

DAHAN, A.; MILLER, J.M.; HOFFMAN, A.; AMIDON, G. E.; AMIDON, G.L. The solubility-permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: Mechanistic modeling and application to progesterone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, p. 2739–2749, 2010.

DANAF, N.A.; MELHEM, R.A.; ASSAF, K.I.; NAU, W.N.; PATRA, D. Photophysical properties of neutral and dissociated forms of rosmarinic acid. *Journal of Luminescence*, v. 175, p. 50–56, 2016.

DANIEL, J.S.P.; VERONEZ, I.P.; RODRIGUES, L.L.; TREVISAN, M.G.; GARCIA, J.S. Risperidone – Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using thermal and non-thermal techniques. *Thermochimica Acta*, v. 568, p. 148–155, 2013.

DASTMALCHI, K.; OLLILAINEN, V.; LACKMAN, P.; GENNÄS, G.B.; DORMAN, H.J.D.; JÄRVINEN, P.P.; YLI-KAUHALOUMA, J.; HILTUNEN, R. Acetylcholinesterase inhibitory guided fractionation of *Melissa officinalis* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 867–871, 2009.

DE OLIVEIRA, N.C.D.; SARMENTO, M.S.; NUNES, E.A.; PORTO, C.M.; ROSA, D.P.; BONA, S.R.; RODRIGUES, G.; MARRONI, N.P.; PEREIRA, P.; PICADA, J.N.; FERRAZ, A.B.F.; THIESEN, F.V.; DA SILVA, J. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 1208–1214, 2012.

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

DUBOIS, M.; BAILLY, F.; MBEMBA, G.; MOUSCADET, J.F.; DEBYSER, Z.; WITVROUW, M.; COTELLE, P. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new antiHIV-1 agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, p. 2575–2579, 2008.

FERREIRA, F.R.; VALENTIM, I.B.; RAMONES, E.L.C.; TREVISAN, M.T.S.; AZAR, C.O.; CRUZ, F.P.; DE ABREU, F.V. GOULART, M.O.F. Antioxidant activity of mangiferin inclusion complex with  $\beta$  cyclodextrin. *LWT-Food Science and Technology*, v. 51, p. 129–134, 2013.

FURTADO, M.A.; ALMEIDA, L.C.F.; FURTADO, R.A.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 657, p. 150–154, 2008.

GAO, R.; JIN, Y.; YANG, Q-Y.; SUN, B-W.; LIN, J. Study of stability and drug-excipient compatibility of estradiol and pharmaceutical excipients. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120, p. 839–845, 2015.

GAYOSO, L.; CLAERBOUT, A-S.; CALVO, M.I.; CAVERO, R.Y.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the in vitro gastrointestinal digestion models. *Journal of Functional Foods*, v. 26, p. 428–438, 2016.

GLISONE, R.L.; CHIAPPETA, D.A.; MOGLIONI, A.G.; SOSNIK, A. Novel l-indanone thiosemicarbazone antiviral candidates: Aqueous solubilization and physical stabilization by means of cyclodextrins. *Pharmaceutical Research*, v. 29, p. 739–755, 2012.

GONG, X.; HUANG, S.; JIAO, R.; PAN, J.; LI, Y.; QU, H. The determination of dissociation constants for active ingredients from herbal extracts using a liquid-liquid equilibrium method. *Fluid Phase Equilibria*, v. 409, p. 447–457, 2016.

HAZEKAMP, A.; VERPOORTE, R.; Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with the randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p. 340–347, 2006.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, v. 4, p. 117–212, 1965.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). *Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B*, 1995.

JOB, P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Annali Di Chimica*, v. 9, p. 113–203, 1928.

KONDO, S.; OMRI, A.E.; HAN, J.; ISODA, H. Antidepressant-like effects of rosmarinic acid through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and brain-derived neurotrophic factor modulation. *Journal of Functional Foods*, v. 14, p. 758–766, 2015.

KUMAR, V.; SHAH, R.P.; MALIK, S.; SINGH, S. Compatibility of atenolol with excipients: LC-MS/TOF characterization of degradation/interaction products, and mechanisms of their formation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, p. 880–888, 2008.

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 453, p. 167–180, 2013.

LAI, X-J.; ZHANG, L.; LIA, J-S.; LIU, H-Q.; LIU, X-H.; DI, L-Q.; CAI, C-B.; CHEN, L-H. Comparative pharmacokinetic and bioavailability studies of three salvianolic acids after the administration of *Salviae miltiorrhizae* alone or with synthetical borneol in rats. *Fitoterapia*, v. 82, n. 6, p. 883–888, 2011.

LI, G-S.; JIANG, W-L.; TIAN, J-W.; QU, G-W.; ZHU, H-B.; FU, F-H. *In vitro* and *in vivo* antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. *Phytomedicine*, v. 17, p. 282–288, 2010.

LIMA, I.P.B.; LIMA, N.G.P.B.; BARROS, D.M.C.; OLIVEIRA, T.S.; BARBOSA, E.G.; GOMES, A.P.B.; FERRARI, M.; DO NASCIMENTO, T.G.; ARAGÃO, C.F.S. Compatibility study of tretinoin with several pharmaceutical excipients by thermal and non-thermal techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 120, p. 733, 2015a.

LIMA, I.P.B.; LIMA, N.G.P.B.; BARROS, D.M.C.; OLIVEIRA, T.S.; MENDONÇA, C.M.S.; BARBOSA, E.G.; RAFFIN, F.N.; LIMA E MOURA, T.F.A.; GOMES, A.P.B.; FERRARI, M.; ARAGÃO, C.F.S. Compatibility study between hydroquinone and the excipients used semi-solid pharmaceutical forms by thermal and non-thermal techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 120, p. 719–732, 2015b.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, p. 3019–3032, 2012.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 85, p. 1017–1025, 1996.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, p. 1607–1621, 2010.

LOFTSSON, T.; MAGNÚSDÓTTIR, A.; MÁSSON, M.; SIGURJÓNSDÓTTIR, J.F. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 91, p. 2307–2316, 2002.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; BREWSTER, M.E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 93, p. 1091–1099, 2004.

LOFTSSON, T.; MOYA-ORTEGA, M.D.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/ cyclodextrin complexes. *Journal Pharmacy and Pharmacology*, v. 68, p. 544–555, 2016.

LOUKAS, Y.L. Evaluation of the methods for the determination of the stability constant of cyclodextrin-chlorambucil inclusion complexes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 16, p. 275–280, 1997.

MADUREIRA, A.R. NUNES, S.; CAMPOS, D.A.; FERNANDES, J.C.; MARQUES, C.; ZUZARTE, M.; GULLÓN, B.; RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L.M.; CALHAU, C.; SARMENTO, B.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; REIS, F. Safety profile of solid lipid nanoparticles loaded with rosmarinic acid for oral use: *in vitro* and animal approaches. *International Journal of Nanomedicine*, v. 11, p. 3621–3640, 2016b.

MADUREIRA, A.R.; CAMPOS, D.A.; FONTE, P.; NUNES, S.; REIS, F.; GOMES, A.M.; SARMENTO, B.; PINTADO, M.M. Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnaúba wax for rosmarinic acid oral delivery. *RSC Advances*, v. 5, p. 22665–22673, 2015.

MADUREIRA, A.R.; CAMPOS, D.A.; OLIVEIRA, A.; SARMENTO, B.; PINTADO, M.M.; GOMES, A.M. Insights into protective protective role of solid lipid nanoparticles on rosmarinic acid bioactivity during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 139, p. 277–284, 2016a.

MANNILA, J.; JARVINEN, T.; JARVINEN, K.; TARVAINEN, M.; JARHO, P. Effects of RM-beta-CD on sublingual bioavailability of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rabbit. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 26, p. 71–77, 2005.

MARIAPPAN, G.; SUNDARAGANESAN, N.; MANOHARAN, S. Experimental and theoretical spectroscopic studies of anticancer drug rosmarinic acid using HF and density functional theory. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 97, p. 340–351, 2012.

MEDRONHO, B.; VALENTE, A.J.M.; COSTA, P.; ROMANO, A. Inclusion complexes of rosmarinic acid and cyclodextrins: stoichiometry, association constants and antioxidant potential. *Colloid and Polymer Science*, v. 292, p. 885–894, 2014.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 101, p. 238–250, 2014.

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

NAKANISHI, I.; OHKUBO, IMAI, K.; KAMIBAYASHI, M.; YOSHIHASHI, Y.; MATSUMOTO, K-I.; FUKUHARA, K.; TERADA, K.; ITOH, S.; OZAWA, T.; FUKUZUMI, S. Solubilisation of a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in water by  $\beta$ -cyclodextrin to evaluate the radical-scavenging activity of antioxidants in aqueous media. *Chemical Communications*, v. 51, p. 8311–8314, 2015.

OLESEN, N.E.; VANA, V.; HOLM, R. Does the digestibility of cyclodextrin influence the in vivo absorption of benzo[a]pyrene in rats? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 105, p. 2698–2702, 2016.

OLIVEIRA, K.B.; PALÚ, E.; WEFFORT-SANTOS, A.M.; OLIVEIRA, B.H. Influence of rosmarinic acid and *Salvia officinalis* extracts on melanogenesis of B16F10 cells. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 23, p. 249–258, 2013.

PANI, N.R.; NATH, L.K.; ACHARYA, S.; BHUNIYA, B. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 108, p. 219–226, 2012.

PÁPAY, Z.E.; SEBESTYÉN, Z. LUDÁNYI, K.; KÁLLAI, N.; BALOGH, E.; KÓSA, A.; SOMAVARAPU, S.; BÖDDI, B.; ANTAL, I. Comparative evaluation of the effect of cyclodextrins and pH on aqueous solubility of apigenin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 117, p. 210–216, 2016.

PEREZ-FONS, L.; GARZON, M.T.; MICOL, V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 161–171, 2010.

PERRY, C.S; CHARMAN, S.A.; PRANKERD, R.J.; CHIU, F.C.K.; SACNLON, M.J.; CHALMERS, D.; CHARMAN, W.N. The binding interaction of synthetic ozonide antimalarials with natural and modified  $\beta$ -cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical*, v. 95, p. 146–158, 2006.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M.S.J. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, v. 62, p. 121–125, 2003.

RAO, K.P.; CHAWLA, G.; KAUSHAL, A.M.; BANSAL, A.K. Impact of solid-state properties on lubrication efficacy of magnesium stearate. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 10, p. 423–437, 2005.

RAZBORSEK, M.I. Stability studies on trans-rosmarinic acid and GC-MS analysis of its degradation product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, p. 1010–1016, 2011.

ROCHA, J.; EDUARDO-FIGUEIRA, M.; BARATEIRO, A.; FERNANDES, A.; BRITES, D.; BRONZE, R.; DUARTE, C.M.M.; SERRA, A.T.; PINTO, R.; FREITAS, M.; FERNANDES, E.; SILVA-LIMA, B.; MOTA-FILIFE, H.; SEPODES, B. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 116, p. 398–413, 2015.

ROJEK, B.; WESOLOWSKI, M.; SUCHACZ, B. Detection of compatibility between baclofen and excipients with aid of infrared spectroscopy and chemometry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 116, p. 532 – 538, 2013.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; COOK, W.G.; FENTON, M.E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 7 ed. London: Pharmaceutical UK, 2012. 1064 p.

RYZHAKOV, A.; THI, T.D.; STAPPAERTS, J.; BERTOLETTI, L.; KIMPE, K.; COUTO, A.R.S.; SAOKHAM, P.; VAN DEN MOOTER, G.; AUGUSTIJNS, P.; SOMSEN, G.W.; KURKOV, S.; INGHELBRECHT, S.; ARIEN, A.; JIMIDAR, M.I.; SCHRIJNEMAKERS, K.; LOFTSSON, T. Self-assembly of cyclodextrins and their complexes in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 105, p. 2556–2569, 2016.

SAHA, S., ROY, A.; ROY, K.; ROY, M.N. Study of explore the mechanism to form inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with vitamin molecules. *Scientific Reports*, v. 6, 2016.

SÁNCHEZ-CAMPILLO, M.; GABALDON, J.A.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL BAÑO, M.J.; ALCARAZ, M.; VICENTE, V.; LOZANO, J.A. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 386–392, 2009.

SCHÖNBECK, C.; WESTH, P.; MADSEN, J.C.; LARSEN, K.L.; STÄDE, L.W.; HOLM, R. Hydroxypropyl-substituted  $\beta$ -cyclodextrins: Influence of degree of substitution on the thermodynamics of complexation with tauroconjugated and glycoconjugated bile salts. *Langmuir*, 26, p. 17949–17957, 2010.

SCHÖNBECK, C.; WESTH, P.; MADSEN, J.C.; LARSEN, K.L.; STÄDE, L.W.; HOLM, R. Methylated  $\beta$ -Cyclodextrins: Influence of degree and pattern of substitution on the thermodynamics of complexation with tauro- and glyco-conjugated bile salts. *Langmuir*, v. 27, p. 5832–5841, 2011.

SCHAICH, K.M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, v. 14, p. 111–125, 2015.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties and trends in development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 36, p. 17–28, 1999.

TITA, B.; FULIAS, A.; BUNDAR, G.; MARIAN, E.; TITA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 56, p. 221–227, 2011.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; RAI, A.K. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 2, p. 72–79, 2010.

TSAO, J-Y.; WU, C-P.; TSAI, H-H.; PENG, K-C.; LIN, P-Y.; SU, S-Y.; CHEN, L-D.; TSAI, F-J.; TSAI, Y. Effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexation on the aqueous solubility, structure, thermal stability, antioxidant activity, and tyrosinase inhibition of paeonol. *Journal of Inclusion Phenomena and Macroscopic Chemistry*, v. 72, p. 405–411, 2012.

VERMA, R.K.; GARG, S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p. 633–644, 2005.

VUEBA, M.L.; DE CARVALHO, L.A.E.B.; VEIGA, F.; SOUSA, J.J.; PINA, M.E. Influence of cellulose ether mixtures on ibuprofen release: MC25, HPC and HPMC K100M. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 11, p. 213–228, 2006.

WANG, J.; LI, G.; RUI, T.; KANG, A.; LI, G.; FU, T.; LI, J.; DO, L.; CAI, B. Pharmacokinetics of rosmarinic acid in rats by LC-MS/MS: Absolute bioavailability and dose proportionality. *RSC Advances*, v. 7, p. 9057–9063, 2017.

WANG, Y.; TANG, J.; ZHU, H.; JIANG, X.; LIU, J.; XU, W.; MA, H.; FENG, Q.; WU, J.; ZHAO, M.; PENG, S. Aqueous extract of *Rabdosia rubescens* leaves: forming nanoparticles, targeting P-selectin, and inhibiting thrombosis. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 6905–6918, 2015.

WU, L.; MIAO, X.; SHAN, Z.; HUANG, Y.; LI, L.; PAN, X.; YAO, Q.; LI, G.; WU, C. Studies on the spray dried lactose as carrier for dry powder inhalation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 9, p. 336–341, 2014.

XIE, J.; SCHAICH, K.M. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, p. 4251–4260, 2014.

YATSU, F.K.J.; KOESTER, L.S.; LULA, I.; PASSOS, J.J.; SINISTERRA, R.; BASSANI, V.L. Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction. *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 726–735, 2013.

ZIME-DIAWARA, H.; DIVE, G.; PIEL, G.; MOUDACHIROU, M.; FREDERICH, M.; QUETIN-LECLECQ, J.; EVRARD, B. Understanding the interactions between artemisinin and cyclodextrins: spectroscopic studies and molecular modeling. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 74, p. 305–315, 2012.







CD são adjuvantes farmacêuticos normalmente utilizados para aumento de biodisponibilidade de fármacos que apresentem a solubilidade como fator limitante, a exemplo fármacos da classe II e IV na classificação biofarmacêutica (LOFTSSON, 2002). Os dados quanto à solubilidade do AR na literatura são conflitantes, sendo apresentado ora como pouco solúvel, necessitando de adjuvantes que melhorem sua solubilidade e ora como solúvel, fator que limitaria sua absorção por via oral, por diminuir sua capacidade permeação pela membrana (MEDRONHO et al., 2015; YANG et al., 2015).

Nossos resultados demonstraram que a solubilidade intrínseca do AR em pH 1.2 a 25°C foi de 5 mM, aproximadamente 2 mg/mL, podendo ser classificado de acordo com a Farmacopeia como pouco solúvel (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Entretanto, para classificar uma substância em baixa ou alta solubilidade pelo sistema de classificação biofarmacêutica, um aspecto a ser abordado é a solubilidade em uma faixa de pH 1.0 a 6.8 em temperatura de 37°C (FDA, 2015).

A solubilidade de uma substância é influenciada pelo pH do meio e a temperatura. O AR apresenta seu primeiro pKa entre 2.8 e 2.9. Desta forma, podemos inferir que o aumento do pH do meio resultará no aumento da solubilidade do AR, devido à formação das formas ionizadas que são mais solúveis (DANAF et al., 2016; GONG et al., 2016). Apesar da considerável solubilidade que AR apresenta, a complexação deste com CD naturais e derivadas tem sido reportada em faixa de pH 1.0 a 7.0 (ÇÉLIK et al., 2011, MEDRONHO et al., 2014; AKSAMIJA et al., 2016).

Um fator importante a ser analisado antes de desenvolver uma formulação com CD é determinar a relação estequiométrica e a constante de ligação com o fármaco. Para isto, dois métodos são amplamente aplicados: estudo de solubilidade (HIGUCHI & CONNORS, 1965) e de variação contínua ou *Job's Plot* (JOB, 1928).

Nos estudos já publicados, a relação estequiométrica existente entre o AR e as CD naturais ou derivadas utilizadas foi na ordem de 1:1, ou seja, uma molécula de AR interage com uma molécula de CD (ÇÉLIK et al., 2011; MEDRONHO et al., 2014; AKSAMIJA et al., 2016). Entretanto, uma relação de ordem maior em relação ao AR, do tipo 2:1, foi encontrada para AR com HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD. As diferenças nas relações estequiométricas entre os estudos podem ser explicadas pela metodologia aplicada.

Çelik et al., (2011), Medronho et al., (2014) e Aksamija et al., (2016) aplicaram o método *Job's Plot*. Este método é baseado na obtenção de solução diluída do fármaco e CD em uma mesma concentração, e posteriormente estas são misturadas em diferentes volumes gerando de frações molares. As amostras são submetidas a análise por RMN  $H^1$ , UV/vis ou fluorescência e a partir dos deslocamentos ou absorbâncias encontrados é obtido gráfico de determinar a relação estequiométrica (SAHA et al., 2016). Já no estudo de solubilidade um excesso do fármaco é adicionado em soluções com diferentes concentrações de CD, que após período determinado mantidas em agitação, são analisadas e obtido diagrama de fases e curva analítica. O *slope* da curva determinará a relação estequiométrica (VALLE et al., 2004).

No *Job's Plot*, devido ao fato de o AR já estar dissolvido e em baixa concentração, existe uma menor chance de formação de complexos de ordem maior, devido a uma estabilidade já ter sido alcançada, enquanto que no estudo de solubilidade, o excesso de AR não dissolvido entra em contato com a CD em solução, promovendo a complexação, solubilização e gerando a estabilidade do AR no meio (LOFTSSON et al., 2004). Para efeito de comparação, a concentração de AR utilizada para o estudo de solubilidade, se este fosse totalmente dissolvido, seria de 277,5 vezes maior que a do *Job's Plot*. Ryzhakov et al., (2016) afirma a maior probabilidade do *Job's Plot* apenas gerar resultados 1:1 e isto foi comprovado quando o método foi aplicado.

Apenas um trabalho reporta a complexação do AR com CD derivadas, dentre estas a  $HP\beta CD$  e  $M\beta CD$  (ÇÉLIK et al., 2011), porém foram reportados valores de constante de ligação inferiores aos encontrados neste trabalho. A diferença entre os valores pode estar relacionada à diferença na relação estequiométrica como também pelo pH do meio utilizado para complexação. Loukas (1997) relata que a determinação da estequiometria como 1:1, existindo a possibilidade de complexos de ordem maior, irá gerar resultados de constante de ligação incorretos.

Como já comentado acima, o AR apresenta seu primeiro  $pK_a$  entre 2,8–2,9, formando estrutura ionizada sobre a hidroxila presente no ácido carboxílico na porção do ácido 3,4-dihidroxifenilático (DANAF et al., 2016). Medronho et al., (2014) relata que a porção do ácido 3,4-dihidroxifenilático é mais favorável para formação de complexo por propiciar interação com prótons internos ou externos da CD. O segundo

pKa do AR é 8,4, ocorrendo ionização sobre a hidroxila na posição para do grupo catecol do ácido caféico (DANAF et al., 2016). Çelik et al., 2011 realizou a complexação em meio com pH 7.0, assim, neste pH, duas possíveis ionizações em lados opostos podem estar ocorrendo sobre a molécula do AR, tornando-o mais solúvel, diminuindo a sua interação pela CD e constante de ligação. O efeito do pH sobre a complexação também foi evidenciado sobre outros flavonoides, como apigenina, catequina e epicatequina (LIU et al., 2016; PÁPAY et al., 2016).

Os complexos secos obtidos por liofilização apresentaram um alto rendimento (> 85%). As possíveis perdas foram ocasionadas pelo processo de filtração, anterior à liofilização, que reteve as partículas que não foram solubilizadas. O teor apresentado para os complexos AR: HP $\beta$ CD (0.25 mg AR/ mg) e AR: M $\beta$ CD (0.30 mg AR/ mg) em proporção milimolar (mM) seriam 0.70:0.51 mM para AR:HP $\beta$ CD e 0.83:0.58 mM para AR:M $\beta$ CD. Os complexos não apresentaram a exata relação 2:1 mM como foram produzidos, como relatado acima, processo que vem estar relacionado à perda do AR não solubilizado no processo de filtração, visto que a eficiência de complexação não é 100% (LOFTSSON & BREWSTER, 2012). A partir do rendimento e teor de AR obtidos nos complexos, pode-se inferir que no complexo AR:HP $\beta$ CD houve a perda de 33.95% de AR e 1,89% de HP $\beta$ CD, já no complexo AR:M $\beta$ CD a perda de AR foi de 31.11% e para M $\beta$ CD foi de 3,55%, demonstrando um rendimento para o AR acima de 65%.

As metodologias de UV, calorimetria diferencial exploratória (DSC), infravermelho (IV) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizadas para caracterizar os complexos e misturas físicas, podem detectar mudanças químicas ou físicas no AR ocasionadas no processo de complexação, porém não são capazes de informar em quais prótons do AR e CD ocorre interação. Utilizando ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN H<sup>1</sup>) bidimensional, podemos inferir que para o complexo com HP $\beta$ CD, a porção ácido caféico do AR possa estar interagindo com os hidrogênios 5 (interno) ou 6 (externo) da HP $\beta$ CD e a porção do ácido 3,4-dihidroxifenilático possa interagir com os hidrogênios 2, 4 e 7 da HP $\beta$ CD, estes todos externos, podendo assim existir complexo de inclusão e não-inclusão ou apenas complexo de não-inclusão. A dificuldade em se determinar com qual hidrogênio da HP $\beta$ CD ocorre interação advém da sobreposição de sinais que estes apresentaram.

Já para o complexo com M $\beta$ CD, é possível visualizar interação dos hidrogênios aromáticos e vinílicos do AR com os hidrogênios 3 (interno) e 4,6, e do grupamento metila (externos), demonstrando a presença de complexos de inclusão e de não-inclusão. Este é o primeiro trabalho a reportar como ocorre o mecanismo de interação do AR com CDs derivadas.

Apesar de as interações AR com as CDs demonstrarem a possibilidade da existência de um complexo na ordem de 2:1, uma técnica que seria mais adequada para se determinar esta característica seria a utilização de espectrometria de massas acoplada a ionização por *electrospray*. Esta técnica por promover leve ionização e manter as ligações não covalentes, torna-se adequada para a determinação da massa de um complexo, podendo afirmar com certeza quantas moléculas do AR interagem com a CD (MARANGOCCI et al., 2011).

A atividade antioxidante dos complexos pelo método DPPH foi superior ao do AR sozinho, o que pode ser devido à ação das CD sobre os prótons do AR que facilitam a sua liberação (PÁPAY et al., 2016). O aumento do potencial antioxidante do AR por complexação com CD foi também levantado por Çélik et al., (2011) e Medronho et al., (2014) pelos métodos CUPRAC e ORAC respectivamente. Todavia, quando a atividade foi realizada em meio 50:50 (água:metanol) houve a diminuição do potencial do complexo podendo ser explicado por duas hipóteses: a primeira consiste que em meio mais aquoso, o AR pode agir mais livremente na liberação de prótons, diminuindo a ação aditiva da CD (XIE & SCHAICH, 2014; SCHAICH & XIE, 2015); a segunda hipótese a ser levantada é a possível competição do radical DPPH pela cavidade da CD. O radical DPPH apresenta solubilidade elevada em meios orgânicos, porém precipita em meio aquoso. No entanto, Nakanishi et al., (2015) demonstrou a possibilidade o uso da  $\beta$ CD como agente solubilizante do radical sem afetar o seu potencial oxidante.

No tocante ao estudo de compatibilidade, lactose e estearato de magnésio apresentaram incompatibilidade com AR e misturas físicas. Lactose apresentou incompatibilidade apenas pelo método DSC, relacionada à solubilização do AR ou mistura física no excipiente (PANI et al., 2012), já estearato de magnésio apresentou incompatibilidade tanto pelo método DSC como pelo IV.

O estearato de magnésio comumente apresenta incompatibilidades com fármacos na etapa de estuda de pré-formulação, fator que se relaciona com o aumento do pH criado pelo excipiente, acelerando reações de hidrólise alcalina; reações de oxidação, presença de impurezas como óxido de magnésio e o íon metálico magnésio (LI & WU, 2014).

Apesar das incompatibilidades reportadas, a submissão das misturas a altas temperaturas não reflete as condições nas quais as formas farmacêuticas são produzidas e as quantidades usuais de estearato de magnésio não ultrapassam os 5% (ROWE et al., 2012; CHADHA & BHANDARI, 2014).

Em suma, a complexação do AR com CDs demonstrou um alto rendimento, não afetando o potencial antioxidante e os ensaios de compatibilidade demonstraram resultados promissores para obtenção de formulações sólidas de uso oral que promovam aumento de biodisponibilidade.





**CONCLUSÕES**



- O AR pelo diagrama de fase solubilidade apresentou para as duas CD utilizadas um diagrama do tipo  $A_L$ , no qual o aumento da concentração de CD, aumenta a solubilidade do AR.
- A estequiometria entre o AR e CD foi do tipo 2:1, na qual duas moléculas de AR interagem com uma molécula de CD, sendo esta uma forte interação.
- Na caracterização dos complexos obtidos, observou-se a formação de complexos de inclusão e de não-inclusão.
- O potencial antioxidante dos complexos pelo método DPPH foi superior ao do AR não complexado.
- O AR e as misturas físicas destes não apresentaram significativas interações com os excipientes utilizados, propiciando o seu uso para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas.



## **REFERÊNCIAS**



ABEDINI, A.; ROUMY, V.; MAHIEUX, S.; BIABIANY, M.; STANDAERT-VITSE, A.; RIVIERE, C.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F.; NEUT, C.; HENNEBELLE, T. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 1–11, 2013.

ADOMAKO-BONSU, A.; CHAN, S.L.F.; PRATTEN, M.; FRY, J. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology in Vitro*, v. 40, p. 248–255, 2017.

AKSAMIJA, A.; POLIDORI, A.; PLASSON, R.; DANGLES, O.; TOMAO, V. The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: A thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, v. 208, p. 258–263, 2016.

ALVES-SILVA, I.; SÁ-BARRETO, L.C.L.; LIMA, E.M.; CUNHA-FILHO, M.S.S. Preformulation studies of itraconazole associated with benzimidazole and pharmaceutical excipients. *Thermochimica Acta*, v. 575, p. 29–33, 2014.

ANUSUYA, C.; MANOHARAN, S. Antitumor initiating potential of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, v. 30, n. 3, p. 199–211, 2011.

ARIMA, H.; HAYASHI, Y.; HIGASHI, T.; MOTOYAMA, K. Recent advanced in cyclodextrin delivery techniques. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 12, p. 1–17, 2015.

AULTON, M.E. *Pharmaceutics: The Science of dosage form design*. 2 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002. 679 p.

BABA, S.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TERAOKA, J. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Science*, v. 75, p. 165–178, 2004.

BABA, S.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; YASUDA, A.; MUTO, Y.; HIYOSHI, K.; TAKANO, H.; YOSHIKAWA, T.; TERAOKA, J. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *European Journal of Nutrition*, v. 44, p. 1–9, 2005.

BAKIREL, T.; BAKIREL, U.; KELES, O.U.; ÜLGEN, S.G.; YARDIBI, H. *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p. 64–73, 2008.

BANCALI, M. AYDIN, S.; TANER, G.; GÖKTAS, H.G.; SAHIN, T.; BASARAN, A.A.; BASARAN, N. Does rosmarinic acid treatment have protective role against sepsis-induced oxidative damage in Wistar albino rats? *Human and Experimental Toxicology*, p. 1–10, 2015.

BEL-RHLID, R.; CRESPIY, V.; PAGÉ-ZOERKLER, N.; NAGY, K.; RAAB, T.; HANSEN, C-E. Hydrolysis of rosmarinic acid from rosemary extract with esterases and

*Lactobacillus johnsonii* in vitro and in a gastrointestinal model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 7700–7705, 2009.

BELLRINGER, M.E.; SMITH, T.G.; READ, R.; GOPINATH, C.; OLIVER, P.  $\beta$ -Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 5, p. 367–376, 1995.

BHATT, R.; MISHRA, N.; BANSAL, P.K. Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, v. 2, n. 2, p. 28–34, 2013.

BOHN, TORSTEN. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, p. 1–24, 2014.

BOONYARIKPUNCHAI, W.; SUKRONG, S.; TOWIWAT, P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 124, p. 67–73, 2014.

BREWSTER, M.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Reviews*, v. 59, p. 645–666, 2007.

BRYAN, H.K.; OLAYANJU, A.; GOLRING, C.; PARK, B.K. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and –independent mechanisms of regulation. *Biochemical Pharmacology*, v. 85, p. 705–717, 2013.

BULGAKOV, V.P.; INYUSHKINA, Y.V.; FEDOREYEV, S.A. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 32, n. 2, p. 203–217, 2012.

CAMPOS, D.A.; MADUREIRA, A.R.; GOMES, A.M.; SARMENTO, B.; PINTADO, M.M. Optimization of the production of solid Witepsol nanoparticles loaded with rosmarinic acid. *Colloids and Surfaces B: Interfaces*, v. 115, p. 109–117, 2014.

CAO, H.; CHENG, W-X.; LI, C.; PAN, X-L.; XIE, X-G.; LI, T-H. DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 719, p. 177–183, 2005.

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, v. 123, p. 78–99, 2007.

CASANOVA, F.; ESTEVINHO, B.N.; SANTOS, L. Preliminary studies of rosmarinic acid microencapsulation with chitosan and modified chitosan for topical delivery. *Powder Technology*, v. 297, p. 44–49, 2016.

CASAS, E.; BARRON, C.; FRANCIS, S.A.; MCCORMACK, J.M.; MCCARTHY, K.M.; SCHNEEBERGER, E.E.; LYNCH, R.D. Cholesterol efflux stimulates metalloproteinase-mediated cleavage of occluding and release of extracellular membrane particles containing its C-terminal fragments. *Experimental Cell Research*, v. 316, p. 353–365, 2010.

ÇÉLIK, S.E.; ÖZYÜREK, M.; TUFAN, A.N.; GÜÇLU, K.; APAK, R. Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural



and derivatives cyclodextrins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 78, p. 1615–1624, 2011.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening – Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, p. 82–97, 2014.

CHEN, B.; ZHOU, H.; ZHAO, W.; ZHOU, W.; YUAN, Q.; YANG, G. Effects of aqueous extract of *Portulaca oleracea* L. on oxidative stress and liver, spleen leptin, PAR $\alpha$  and FAS mRNA expression in high-fat diet induced mice. *Molecular Biology Reports*, v. 39, p. 7981–7988, 2012.

CORTI, G.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; MENNINI, N.; MURA, P. Sustained-release matrix tablets of metformin hydrochloride in combination with triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, v. 68, p. 303–309, 2008.

COSTA, P.; GREVENSTUK, T.; COSTA, A.M.R.; GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Antioxidant and anti-cholinesterase activities of *Lavandula viridis* L'Hér extracts after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products*, v. 55, p. 83–89, 2014.

CRAFT, B.D.; KERRIHARD, A.L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for the assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 11, p. 148–173, 2012.

CRINI, G. Review: A history of cyclodextrin. *Chemical Reviews*, v. 114, p. 10940–10975, 2014.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Compatibility of the antitumoral  $\beta$ -lapachone with different solid dosage forms excipients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 45, p. 590–598, 2007.

CUSTODIO, J.M.; WU, C-Y.; BENET, L.Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/ transport interplay and the role of food on drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 717–733, 2008.

DANAF, N.A.; MELHEM, R.A.; ASSAF, K.I.; NAU, W.N.; PATRA, D. Photophysical properties of neutral and dissociated forms of rosmarinic acid. *Journal of Luminescence*, v. 175, p. 50–56, 2016.

DASTMALCHI, K.; OLLILAINEN, V.; LACKMAN, P.; AF GENNAS, G.B.; DORMAN, H.J.D.; JARVINEN, P.P.; YLI-KAUHALOUMA, J.; HILTUNEN, R. Acetylcholinesterase inhibitory guided fractionation of *Melissa officinalis* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 867–871, 2009.

DE OLIVEIRA, N.C.D.; SARMENTO, M.S.; NUNES, E.A.; PORTO, C.M.; ROSA, D.P.; BONA, S.R.; RODRIGUES, G.; MARRONI, N.P.; PEREIRA, P.; PICADA, J.N.; FERRAZ, A.B.F.; THIESEN, F.V.; DA SILVA, J. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 1208–1214, 2012.

DEBERSAC, P.; VERNEVAUT, M-F.; AMIOT, M-J.; SUSCHETET, M.; SIESS, M-H. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic

acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, v. 39, p. 109–117, 2001.

DELI, M.A. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1788, p. 892–910, 2009.

DIAS, M.I.; SOUSA, M.J.; ALVES, R.C.; FERREIRA, I.C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review. *Industrial Crops and Products*, v. 82, p. 9–22, 2016.

DOMITROVIC, R.; SKODA, M.; MARCHESI, V.V.; CVIJANOVIC, O.; PUGEL, E.P.; STEFAN, M.B. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, p. 370–378, 2013.

DUBOIS, M.; BAILLY, F.; MBEMBA, G.; MOUSCADET, J.F.; DEBYSER, Z.; WITVROUW, M.; COTELLE, P. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: discovery of nitro- and dinitro-rosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, p. 2575–2579, 2008.

ELDER, D.P.; KUENTZ, M.; HOLM, R. Pharmaceutical excipients – quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, p. 88–99, 2016.

EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 811–819, 2015.

FADEL, O.; KIRAT, K.E.; MORANDAT, S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1808, p. 2973–2980, 2011.

FALÉ, P.; ASCENSÃO, L.; SERRALHEIRO, M.L.M. Effect of luteolin and apigenin on rosmarinic acid bioavailability in Caco-2 cell monolayers. *Food & Function*, v. 4, p. 426–431, 2013.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system - Guidance for Industry*. 2015.

FERNANDO, P.M.D.J.; PIAO, M.J.; KANG, K.A.; RYU, Y.S.; HEWAGE, S.R.K.M.; CHAE, S.W.; HYUN, J.W. Rosmarinic acid attenuates cell damage against UVB radiation-induced oxidative stress via enhancing antioxidant effects in human HaCat cells. *Biomolecules & Therapeutics*, v. 24, n. 1, p. 75–84, 2016.

FETONI, A.R.; PACIELLO, F.; ROLES, R.; ERAMO, S.L.M.; MANCUSO, C.; TROIANI, D.; PALUDETTI, G. Rosmarinic acid up-regulates the noise-activated Nrf2/HO-1 pathway and protects against noise-induced injury in rats cochlea. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 85, p. 269–281, 2015.

FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. Dietary flavonoids: role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, p. 813–823, 2011.

FRANCIS, S.A.; KELLY, J.M.; MCCORMARK, J.; ROGERS, R.A.; LAI, J.; SCHNEEBERGER, E.E.; LYNCH, R.D. Rapid reduction of MDCK cell cholesterol by methy- $\beta$ -cyclodextrin alters steady state transepithelial electrical resistance. *European Journal of Cell Biology*, v. 78, p. 473–484, 1999.

FUJIMOTO, A.; MASUDA, T. Antioxidant mechanism of rosmarinic acid, identification of an unstable quinone derivative by the addition of odourless thiol. *Food Chemistry*, v. 132, p. 901–906, 2012.

FURTADO, M.A.F.; ALMEIDA, L.C.R.; FURTADO, R.A.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research*, v. 657, p. 150–154, 2008.

GAYOSO, L.; CLAERBOUT, A-S.; CALVO, M.I.; CAVERO, R.Y.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the in vitro gastrointestinal digestion models. *Journal of Functional Foods*, v. 26, p. 428–438, 2016.

GIL, E.S.; ENACHE, T.A.; OLIVEIRA-BRETT, A.M. Redox behavior of verbascoside and rosmarinic acid. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 16, n.2, p. 92–97, 2013.

GONG, X.; HUANG, S.; JIAO, R.; PAN, J.; LI, Y.; QU, H. The determination of dissociation constants for active ingredients from herbal extracts using a liquid-liquid equilibrium method. *Fluid Phase Equilibria*, v. 409, p. 447–457, 2016.

GOVINDARAJ, J.; PILLAI, S.S.; Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protects pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 404, p. 143–159, 2015.

GÜLÇİN, I.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C.T.; KOKSAL, Z.; TURKAN, F.; ÇETINKAYA, S.; BINGÖL, Z.; HUYUT Z.; ALWASEL, S.H. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lacto peroxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016. <http://dx.doi.org/10.3109/14756366.2015.1135914>.

HU, M.; LI, X. Bioavailability: basic principles, advanced concepts and applications. 1ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011. 568p.

HUANG, S-S.; ZHENG, R-L. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Letters*, v. 239, p. 271–280, 2006.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, p. 147–162, 1997.

KARLSSON, J.; UNGELL, A-L.; GRAJÖ, J.; ARTURSSON, P. Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 9, p. 47–56, 1999.

KARTHIKKUMAR, V.; SIVAGAMI, G.; VINOTHKUMAR, R.; RAJKUMAR, D.; NALINI, N. Modulatory efficacy of rosmarinic acid on premalignant lesions and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 34, p. 949–958, 2012.

KARTHIKKUMAR, V.; SIVAGAMI, G.; VISWANATHAN, P.; NALINI, N. Rosmarinic acid inhibits DMH-induced cell proliferation in experimental rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, v. 26, n. 2, p. 185–200, 2015.

KAUR, A.; GOINDI, S.; KATARE, O.P. Thermal analysis and quantitative characterization of compatibility between diflunisal and lipid excipients as raw materials for development of solid nanoparticles. *Thermochimica Acta*, v. 643, p. 23–32, 2016.

KHOJASTEH, A.; MIRJALLI, M.H.; HIDALGO, D.; CORCHETE, P. PALAZON, J. New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. *Biotechnology Letters*, v. 36, p. 2393–2406, 2014.

KIM, H-J.; KIM, T-H.; KANG, K-C.; PYO, H-B.; JEONG, H-H.; Microencapsulation of rosmarinic acid using polycaprolactone and various surfactants. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 32, p. 185–191, 2010.

KONDO, S.; EL OMRI, A.; HAN, J.; ISODA, H. Antidepressant-like effects of rosmarinic acid through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and brain-derived neurotrophic factor modulation. *Journal of Functional Food*, v. 14, p. 758–766, 2015.

KONISHI, Y.; HITOMI, Y.; YOSHIDA, M.; YOSHIOKA, E. Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4740–4746, 2005.

KONISHI, Y.; ZHAO, Z.; SHIMIZU, M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7539–7543, 2006.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S. Transepithelial transport of rosmarinic acid in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, n. 3, p. 583–591, 2005.

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 453, p. 167–180, 2013.

LAMBERT, D.; O'NEILL, C.A. PADFIELD, P.J. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin increases permeability Caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junction. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 20, p. 495–506, 2007.

LAI, X-J.; ZHANG, L.; LIA, J-S.; LIU, H-Q.; LIU, X-H.; DI, L-Q.; CAI, C-B.; CHEN, L-H. Comparative pharmacokinetic and bioavailability studies of three salvianolic acids after

the administration of *Salviae miltiorrhizae* alone or with synthetical borneol in rats. *Fitoterapia*, v. 82, n. 6, p. 883–888, 2011.

LEE, J.; JUNG, E.; KOH, J., KIM, Y.S.; PARK, D. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *Journal of Dermatology*, v. 35, p. 768–771, 2008.

LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A.; ROCHE, V.F.; ZITO, S.W. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7 ed. Filadelfia: Lippincott USA, 2012. 1520 p.

LEWANDOWSKA, U.; SZEWCZYK, K.; HRABEC, E.; JANECKA, A.; GORLACH, S. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 12183–12199, 2013.

LI, G-S.; JIANG, W-L.; TIAN, J-W.; QU, G-W.; ZHU, H-B.; FU, F-H. *In vitro* and *in vivo* antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. *Phytomedicine*, v. 17, p. 282–288, 2010.

LI, J.; WU, Y. Lubrificants in pharmaceutical solid dosage forms. *Lubrificants*, v. 2, p. 21–43, 2014.

LIN, Y.; CHEN, P.; XU, X. Investigation of rosmarinic acid inhibition towards UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) isoforms. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 32, n. 3, p. 459–461, 2013.

LIU, M.; ZHENG, Y.; WANG, C.; XIE, J.; WANG, B.; WANG, Z.; HAN, J.; SUN, D.; NIU, M. Improved stability of (+)-catechin and (-)-epicatechin by complexing with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Effect of pH, temperature and configuration. *Food Chemistry*, v. 196, p. 148–154, 2016.

LIU, Y.; FLYNN, T.J.; FERGUSON, M.S.; HOAGLAND, E.M. Use of the combination index to determine interactions between plant-derived phenolic acids on hepatotoxicity endpoints in human and rat hepatoma cells. *Phytomedicine*, v. 20, p. 461–468, 2013.

LOFTSSON, T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 44, p. 63–67, 2002.

LOFTSSONA, T.; JÄRVINEN, T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 36, p. 59–79, 1999.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, 2012.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 85, p. 1017–1025, 1996.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, p. 1607–1621, 2010.

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

LOFTSSON, T.; MASSON M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 225, p. 15–30, 2001.

LOFTSSON, T.; MOYA-ORTEGA, M.D.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONHEIRO, A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 68, p. 544–555, 2016.

LOFTSSON, T.; VOGENSEN, S.B.; BREWSTER, M.E.; KONRÁÐSDÓTTIR, F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, n. 10, p. 2532–2546, 2007.

LOUKAS, Y.L. Evaluation of the methods for the determination of the stability constant of cyclodextrin-chlorambucil inclusion complexes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 16, p. 275–280, 1997.

LU, T.; YANG, J.; GAO, X.; CHEN, P.; DU, F.; SUN, Y.; WANG, F.; XU, F.; SHANG, H.; HUANG, Y.; WANG, Y.; WAN, R.; LIU, C.; ZHANG, B.; LI, C. Plasma and urinary tanshinol from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) can be used as pharmacokinetic markers for cardiotoxic pills, a cardiovascular herbal medicine. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 36, p. 1578–1586, 2008.

LUSHCHAK, V. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, v. 224, p. 164–175, 2014.

MADUREIRA, A. R.; CAMPOS, D.A.; FONTE, P.; NUNES, S.; REIS, F.; GOMES, A.M.; SARMENTO, B.; PINTADO, M.M. Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for rosmarinic acid oral delivery. *RSC Advances*, v. 5, p. 22665–22673, 2015.

MADUREIRA, A.R.; CAMPOS, D.A.; OLIVEIRA, A.; SARMENTO, B.; PINTADO, M.M.; GOMES, A.M. Insights into the protective role of solid lipid nanoparticles on rosmarinic acid bioactivity during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 139, p. 277–284, 2016.

MARANGOCI, N.; MARES, M.; SILION, M.; FIFERE, A.; VARGANICI, C.; NICOLESCU, A.; DELEANU, C.; COROABA, A.; PINTEALA, M.; SIMIONESCU, B.C. Inclusion complex of new propiconazole derivative with  $\beta$ -cyclodextrin: NMR, ESI-MS and preliminary pharmacological studies. *Results in Pharma Sciences*, v. 1, p. 27–37, 2011.

MAROTHU, V.K.; YERRAMOTHU, P.; GORREPATI, M.; MAJETA, S.; MAMIDALA, S.K.; NELLUTLA, A. Application of HPLC to assess the compatibility of bisoprolol fumarate with selected excipients in mixtures by isothermal stress testing. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v. 73, p. 442–451, 2015.

MEDRONHO, B.; VALENTE, A.J.M.; COSTA, P.; ROMANO, A. Inclusion complexes of rosmarinic acid and cyclodextrins: stoichiometry, association constants, and antioxidant potential. *Colloid and Polymer Science*, v. 292, p. 885–894, 2014.

MURAKAMI, K.; HANEDA, H.; QIAO, S.; NARUSE, M.; YOSHINO, M. Prooxidant action of rosmarinic acid: Transition metal-dependent generation of reactive oxygen species. *Toxicology in Vitro*, v. 21, p. 613–617, 2007.

MUSHTAQ, N.; SCHMATZ, R.; AHMED, M.; PEREIRA, L.B.; COSTA, P.; REICHERT, K.P.; DALENOGARE, D.; PELINSON, L.P.; VIEIRA, J.M.; STEFANELLO, N.; OLIVEIRA, L.S.; MULINACCI, N.; BELLUMORI, M.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R. Protective effect of rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 71, n. 4, p. 743–751, 2015.

NAKANISHI, I.; OHKUBO, IMAI, K.; KAMIBAYASHI, M.; YOSHIHASHI, Y.; MATSUMOTO, K-I.; FUKUHARA, K.; TERADA, K.; ITOH, S.; OZAWA, T.; FUKUZUMI, S. Solubilisation of a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in water by  $\beta$ -cyclodextrin to evaluate the radical-scavenging activity of antioxidants in aqueous media. *Chemical Communications*, v. 51, p. 8311–8314, 2015.

NAKAZAWA, T.; OHSAWA, K. Metabolism of rosmarinic acid. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 993–996, 1998.

NAKAZAWA, T.; OHSAWA, K. Metabolites of orally administered *Perilla frutescens* extract in rats and humans. *Biology Pharmaceutical Bulletin*, v. 23, n. 1, p. 122–127, 2000.

NOGUCHI-SHINOHARA, M.; ONO, K.; HAMAGUCHI, T.; IWASA, K.; NAGAI, T.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, H.; YAMADA, M. Pharmacokinetics, safety and tolerability of *Melissa officinalis* extract which contained rosmarinic acid in healthy individuals: a randomized controlled trial. *Plos One*, p. 1–13, 2015.

NUNES, S. MADUREIRA, R.; CAMPOS, D.; SARMENTO, B.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.; REIS, F. Solid lipid nanoparticles as oral delivery systems of phenolic compounds: overcoming pharmacokinetic limitations for nutraceutical applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1031337>

OLIVEIRA, K.B.; PALÚ, E.; WEFFORT-SANTOS, A.M.; OLIVEIRA, B.H. Influence of rosmarinic acid and *Salvia officinalis* extracts on melanogenesis of B16F10 cells. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 23, n. 2, p. 249–258, 2013.

PANI, N.R.; NATH, L.K.; ACHARYA, S.; BHUNIYA, B. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 108, p. 219–226, 2012.

PENG, X.; WANG, X.; QI, W.; SU, R.; HE, Z. Affinity of rosmarinic acid to human serum albumin and its effect on protein stability. *Food Chemistry*, v. 192, p. 178–187, 2016.

PEREZ-FONS, L.; GARZON, M.T.; MICOL, V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 161–171, 2010.

PETERSEN, M.; ABDULLAH, Y.; BENNER, J. EBERLE, D.; GEHLEN, K.; HÜCHERIG, S.; JANIÁK, V.; KIM, K.H.; SANDER, M.; WIETZEL, C.; WOLTERS, S. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, v. 70, p. 1663–1679, 2009.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M.S.J. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, v. 62, p. 121–125, 2003.

PIRKER, K.F.; KAY, C.W.M.; STOLZE, K.; TUNEGA, D.; REICHNAUER, T.G.; GOODMAN, B.A. Free radical generation in rosmarinic acid investigated by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radical Research*, v. 43, n. 1, p. 47–57, 2009.

PORFÍRIO, S.; FALÉ, P.L.V.; MADEIRA, P.J.A.; FLORÊNCIO, M.; ASCENSÃO, L.; SERRALHEIRO, M.L.M. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after *in vitro* gastrointestinal metabolism. *Food Chemistry*, v. 122, p. 179–187, 2010.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUSOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, v. 82, p. 513–523, 2011.

QIANG, Z.; YE, Z.; HAUCK, C.; MURPHY, P.A.; MCCOY, J.-A.; WIDRLECHNER, M.P.; REDDY, M.B.; HENDRICH, S. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 1107–1112, 2011.

RANJBAR, A.; KHORAMI, S.; SAFARABADI, M.; SHAHMORADI, A.; MALEKIRAD, A.A.; VAKILIAN, K.; MANDEGARY, A.; ABDOLLAHI, M. Antioxidant activity of Iranian *Echium amoenum* Fisch & C.A. Meyflower decoction in humans: A cross-sectional before/after clinical trial. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 3, p. 122–127, 2006.

ROCHA, J.; FIGUEIRA, M.E.; BARATEIRO, A.; FERNANDES, A.; BRITES, D.; BRONZE, R.; DUARTE, C.M.M.; SERRA, A.T.; PINTO, R.; FREITAS, M.; FERNANDES, E.; SILVA-LIMA, B.; MOTA-FILIFE, H.; SEPODES, B. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 116, p. 398–413, 2015.

ROJEK, B.; WESOLOWSKI, M. Fourier transform infrared spectroscopy supported by multivariate statistics in compatibility study of atenolol with excipients. *Vibrational Spectroscopy*, v. 86, p. 190–197, 2016.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; COOK, W.G.; FENTON, M.E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 7 ed. London: Pharmaceutical UK, 2012. 1064 p.

SALAMAT-MILLER, N.; JOHNSTON, T. Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, p. 201–216, 2005.

SÁNCHEZ-CAMPILLO, M.; GABALDON, J.A.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL BAÑO, M.J.; ALCARAZ, M.; VICENTE, V.; LOZANO, J.A. Rosmarinic acid, a



photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 386–392, 2009.

SANBONGI, C.; TAKANO, H.; OSAKAB, N.; SASA, N.; NATSUME, M.; YANAGISAWA, R.; INOUE, K-I.; KATO, Y.; OSAWA, T.; YOSHIKAWA, T. Rosmarinic acid inhibits lungs injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 34, n. 8, p. 1060–1069, 2003.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and the impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 56, p. 276–282, 2002.

SEVGI, K.; TEPE, B.; SARIKURKCU, C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, v. 77, p. 12–21, 2015.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in food, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHARMILA, R.; MANOHARAN, S.; Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 50, p. 187–194, 2012.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; AROUMA, O.I.; BAHORUN, T. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, v. 579, p. 200–213, 2005.

SOTNIKOVA, R.; OKRUHLICOVA, L.; VLKOVICOVA, J.; NAVAROVA, J.; GAJDACOVA, B.; PIVACKOVA, L.; FIALOVA, S.; KRENEK, P. Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aort. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, p. 713–723, 2013.

SOTO, M.L.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics*, v. 2, n. 3, p. 259–276, 2015.

STELLA V.J.; HE, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology*, 36, p. 30–42, 2008.

STENBERG, P.; BERGSTROM, C.A.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Theoretical predictions of drug absorption in drug discovery and development. *Clinical Pharmacokinetics*, v.41, p. 877–899, 2002.

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

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties and trends in development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 36, p. 17–28, 1999.

TALVANI, A.; BAHIA, M.T.; SÁ-BARRETO, L.C.; LIMA, E.M.; CUNHA-FILHO, M.S.S. Carvedilol: Decomposition kinetics and compatibility with pharmaceutical excipients. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 115, p. 2501–2506, 2014.

TAVAFI, M.; AHMADVAND, H. Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Tissue and Cell*, v. 43, p. 392–397, 2011.

THOMAS, V.H.; BHATTACHAR, S.; HITCHINGHAM, L.; ZOCHARSKI, P.; NAATH, M.; SURENDRAN, N.; STONER, C.L.; EL-KATTAN, A. The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 2, p. 591–608, 2006.

UNGELL, A.L.; NYLANDER, S.; BERGSTRAND, S.; SJOBERG, A.; LENNERNAS, H. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 87, p. 360–366, 1998.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 44–84, 2007.

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

VENKAT RATMAN, D.; ANKOLA, D.D.; BHARWAJ, V.; SAHANA, D.K.; RAVI KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 189–207, 2006.

VERMA, R.K.; GARG, S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p. 633–644, 2005.

WANG, H.; CUI, Y.; FU, Q.; DENG, B.; LI, G.; YANG, J.; WU, T.; XIE, Y. A phospholipid complex to improve the oral bioavailability of flavonoids. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 41, n. 10, p. 1–11, 2015.

WU, B.; KULKARNI, K.; BASU, S.; ZHANG, S.; HU, M. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 100, n. 9, p. 3655–3681, 2011.

WU, J.; ZHU, Y.; LI, F.; ZHANG, G.; SHI, J.; OU, R.; TONG, Y.; LIU, Y.; LIU, L.; LU, L.; LIU, Z. *Spica prunellae* and its marker compound rosmarinic acid induced the expression of efflux transporters through activation of Nrf2-mediated signaling pathway in HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 193, p. 1–11, 2016.

YANG, J-H.; ZHANG, L.; LI, J-S.; CHEN, L-H.; ZHENG, Q.; CHEN, T.; CHEN, Z-P.; FU, T-M.; DI, L-Q. Enhanced oral bioavailability and prophylactic effects on oxidative stress and hepatic damage of an oil solution containing a rosmarinic acid-phospholipid complex. *Journal of Functional Foods*, v. 19, p. 63–73, 2015.

YEE, S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man – fact or myth. *Pharmaceutical Research*, v. 6, p. 763–766, 1997.

YUNOMAE, K.; ARIMA, H.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Involvement of cholesterol in inhibitory effect of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP-2 function in Caco-2 cell. *FEBS Letters*, v. 536, p. 225–231, 2003.

ZHANG, H.; DAVIES, K.J.A.; FORMAN, H.J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 88, p. 314–336, 2015b.

ZHANG, M.; AN, C.; GAO, Y.; LEAK, R.K.; CHEN, J.; ZHANG, F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, v. 100, p. 30–47, 2013.

ZHANG, Y.; CHEN, X.; YANG, L.; ZU, Y.; LU, Q. Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food & Function*, v. 6, p. 927–931, 2015a.

ZIBETTI, A. W.; AYDI, A.; LIVIA, M.A.; BOLZAN, A.; BARTH, D. Solvent extraction and purification of rosmarinic acid from supercritical fluid extraction fractionation waste: economic evaluation and scale-up. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, p. 133–145, 2013.

ZIBETTI, A.W.; AYDI, A.; CLAUMANN, C.A.; ELADEB, A.; ADBERRABA, M. Correlation of solubility and prediction of the mixing properties of rosmarinic acid in different pure solvents and in binary solvent mixtures of ethanol + water and methanol + water from (293,2 to 318,2) K. *Journal of Molecular Liquids*, v. 216, p. 370–376, 2016.

ZIDOVETZKI, R.; LEVITAN, I. Use of cyclodextrin to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1768, p. 1311–1324, 2007.

ZORIC, Z.; MARKIC, J.; PEDISIC, S.; BUCEVIC-POPOVIC, V.; GENERALIC-MEKINIC, I.; GREBENAR, K.; KULISIC-BILUSIC, T. Stability of rosmarinic acid in aqueous extracts from different Laminaceae species after in vitro digestion with human gastrointestinal enzymes. *Food Technology and Biotechnology*, v. 54, p. 97–102, 2016.

