

Academia Oamenilor de Știință din România

RAPORT DE ACTIVITATE

Nr. 2

Materiale carbonice în medicină: riscuri și oportunități

Tema de cercetare Nr. 6/2018

Director proiect

Prof. univ. dr. Ecaterina ANDRONESCU

Cercetător

Doctorand Alexa-Maria Croitoru

Universitatea Politehnica din București

Septembrie 2018

MATERIALE CARBONICE ÎN MEDICINĂ: RISCURI ȘI OPORTUNITĂȚI

În ciuda avansărilor tehnologice în știința biomedicală, cancerul încă rămâne una dintre cele mai mari provocări pentru omenire. În această lucrare, ne dorim să obținem un sistem nanometric de eliberare controlată folosind grafenoxidul ca nanotransportor pentru mai mulți agenți activi cu proprietăți anticancerigene dar și antimicrobiene și antiinflamatorii [1]. Compuși activi utilizați sunt acidul galic, acidul cafeic, limonenul și două uleiuri esențiale, de nucșoară și pin cembra.

Structura amfifilă și planară a grafenoxidului, îi conferă acestuia posibilitatea de a încorpora biomolecule hidrofile și/sau hidrofobe în structură cu scopul de a-i îmbunătăți stabilitatea într-un anumit mediu și pentru a avea toxicitate minimă pentru aplicații biomedicale [2-4].

Grafenoxidul și derivații săi prezintă aplicații în diferite domenii rezumate în patru categorii principale, eliberare controlată și tratarea cancerului, biosenzori, bio-imagistică, și activitate antibacteriană [5]. Grafenoxidul și derivații săi sunt atractivi pentru aceste aplicații datorită proprietăților fizico-chimice excepționale și datorită structurii plane unice, în ciuda anumitor provocări existente precum funcționalizarea corectă și investigarea efectelor toxice pe termen lung [6, 7].

În urma studiilor legate de gradul de toxicitate a grafenoxidului, cercetătorii au demonstrat că funcționalizarea acestuia cu diferiți compuși activi cu proprietăți antioxidante, anticancerigene, antimicrobiene, îi oferă biocompatibilitate pe termen lung și prezintă citotoxicitate în doze scăzute, astfel, grafenoxidul devenind un candidat promițător pentru diferite aplicații biologice și medicale [8, 9].

Deoarece efectele secundare ale substanțelor sintetice asupra organismului sunt bine cunoscute, în ultimul timp s-a pus accent pe utilizarea substanțelor naturale și dezvoltarea de nanomateriale încărcate cu extracte naturale [10]. Este nevoie urgent pentru terapia în cancer de eliberare controlată țintă, iar sinteza în condiții ecologice este importantă pentru utilizarea biomedicală a sistemelor de eliberare controlată în organismal uman [11]. Efectele antimicrobiene, anticancerigene, antifungice ale compusilor naturali extrași din diferite plante împotriva diferitelor

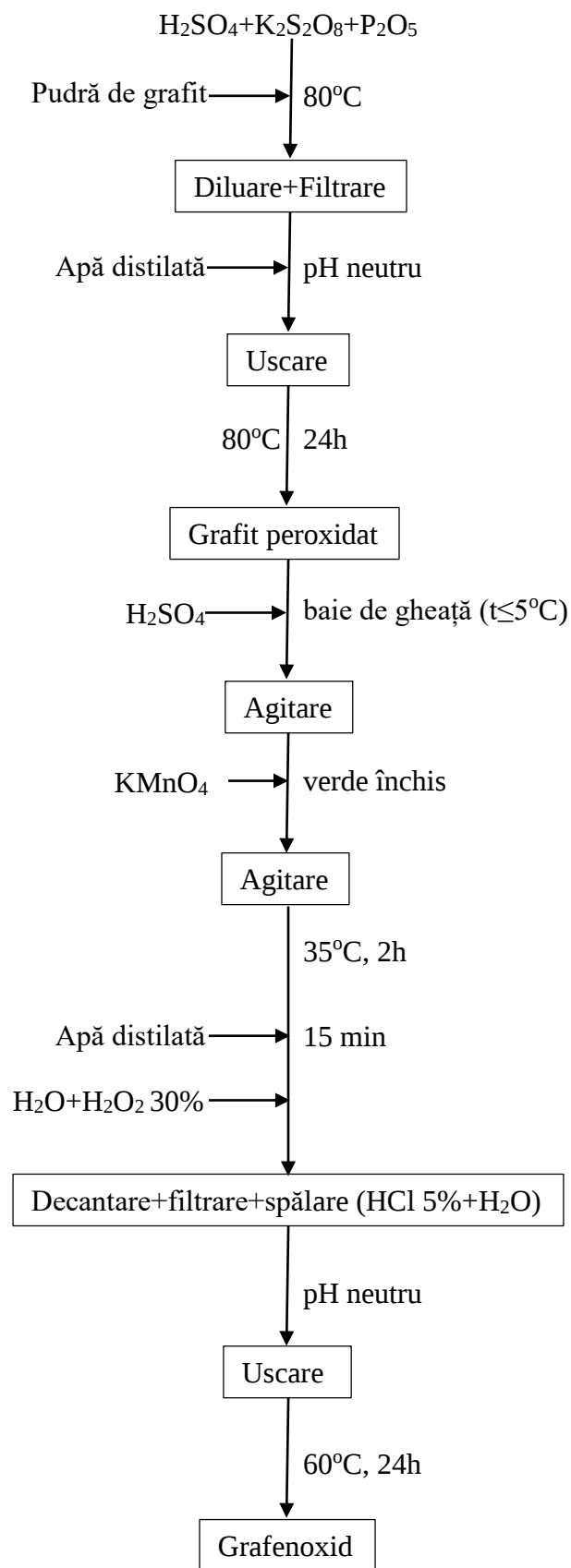
microorganisme, au fost demonstrate de-a lungul timpului de cercetători, lucru care ne încurajează să examinăm în continuare activitățile biologice ale substanțelor bioactive pentru utilizarea lor în medicină [12-16].

3,4,5-trihidroxibenzoic cunoscut și sub numele de acid galic [17], este un compus polihidroxifenolic, ce se găsește într-o diversitate mare de fructe, plante și legume având o mare varietate de aplicații biologice precum antibacteriene, antimutagenice, antivirale și antitumorale [1]. Este un bine-cunoscut antioxidant, raportat anterior ca având activitate anti-inflamatorie [12, 18].

3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoic (acid cafeic), se găsește de asemenea în multe fructe, legume, băuturi (vin, cafea) și uleiuri vegetale. Acidul cafeic are o mare activitate antibacteriană și antivirală. Este unul dintre componenții majori ai acidului hidroxicinamic ce se găsește în vin, având proprietăți antioxidante, controlând nivelul de lipide din sânge și este antimutagenic [19]. Pe baza rapoartelor de cercetare aferente, acidul cafeic are o varietate de efecte farmacologice, incluzând anti-mutageneza, anticancer, antibacterian, protecție cardiovasculară, anti-leucemic și imunomodulator [20].

4-izopropenil-1-metilciclohexan (D-limonen), o terpenă naturală cu miros asemănător lămâiei, este un constituent major ce se găsește în citrice, cireșe, ulei de măsline și diferite plante aromatice. Este larg utilizat în cosmetică, industria alimentară dar și în industria farmaceutică și în medicină. Are proprietăți antioxidante, antimicrobiene, antitumorale, precum și antidiabetice [21-23]. Studiile au demonstrat că limonenul a avut efect de inhibare a dezvoltării diferitelor specii de *Leishmania*. Cercetătorii de asemenea au raportat că tratamentul cu limonen reduce rata de infecție a macrofagelor infectate cu *Leishmania amazonensis* cu 78% [24]. Uleiurile esențiale au fost utilizate tradițional pentru infecții respiratorii și sunt utilizate în prezent ca medicamente pentru diverse afecțiuni precum boli cardiovasculare, diabet, Alzheimer și cancer. Este bine cunoscut faptul că uleiurile esențiale prezintă activitate antimicrobiană [25]. Efectul antimicrobian și componenții chimici ai uleiurilor esențiale au fost recunoscute de câțiva cercetători în trecut. Mai mult, studiile au demonstrat efectul sinergetic al ingredientelor din uleiurile esențiale împotriva diferiților agenți patogeni umani [26, 27].

Sinteza grafenoxidului. Schema 1



Grafenoxidul a fost sintetizat din pudră de grafit, urmărind metoda Hummer modificată. S-a realizat o soluție de H_2SO_4 concentrat (60 mL), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (10 g) și P_2O_5 (10 g) ce a fost încălzită și menținută la 80°C , peste care s-au adăugat 20 g de grafit sub agitare. Soluția astfel obținută a fost lasată să se racească la temperatura camerei după care a fost diluată cu o cantitate mare de apă, filtrată și spălată până când filtratul a ajuns la pH neutru. Produsul obținut a fost uscat timp de 24h la 80°C . Într-un pahar Berzelius aflat în baie de gheață ($t < 5^\circ\text{C}$) s-au adăugat 460 mL de H_2SO_4 concentrat și 20 g de grafit preoxidat sub agitare. 60 g de KMnO_4 au fost apoi adăugate încet în soluție și mixate până când soluția a devenit de culoare verde închis. Paharul apoi a fost mutat pe o plită cu agitare magnetică la temperatura de 35°C unde a fost ținut sub agitare timp de 2 ore. Peste amestec s-au adăugat 920 ml apă distilată și s-a lăsat sub agitare timp de 15 minute, după care s-au adăugat 2,8 L de apă distilată și 50 ml H_2O_2 de concentrație 30% pentru oprirea reacției. Amestecul obținut a fost decantat, filtrat la vid, și spălat cu HCl 5% și H_2O distilată până la obținerea unui pH-neutru. Pulberea obținută a fost uscată în aer la temperatura de 60°C timp de 24 h.

Pentru obținerea suportului grafenoxid încărcat cu acid galic (GOGA) s-a preparat o soluție de acid galic de 1% și s-a lucrat la balon cotat de 50 ml. S-au cântărit 0,1 g grafenoxid într-un balon cotat de 10 ml și s-a adus la semn cu soluția de acid galic 1%. S-au realizat astfel 3 probe. Soluțiile obținute au fost agitate timp de 16 ore după care au fost colectate prin filtrare la vid și uscate în etuvă la 40°C timp de 24 ore.

Același mod de lucru s-a utilizat și pentru obținerea celorlalte materiale: grafenoxid încărcat cu acid galic, limonen, ulei esențial de pin și nucșoară, preparându-se soluții de 1% de acid galic, limonen, ulei esențial de pin și respectiv nucșoară. S-au cântărit câte 0,1 g grafenoxid (x 3 probe din fiecare soluție) și s-au adus la semn cu soluțiile preparate la balon cotat de 10 ml.

Pentru a studia eliberarea controlată a substanțelor active încărcate în grafenoxid, o soluție tampon cu un pH de 7,4 a fost preparată. Diferite studii arată că anioni precum HPO_4^{2-} și H_2PO_4^- au efect în ceea ce privește eliberarea controlată [28, 29]. Viteza de eliberare controlată a fost monitorizată/măsurată prin adăugarea de 65 mg de compus în 25 ml soluție tampon fosfat (pH=7.4), din care s-au luat probe la 1, 4, 24, 48 și 123h, urmând să se analizeze în continuare probele până la eliberarea maximă ce poate avea loc. În tot acest timp, soluțiile au fost ținute la

etuvă la 37°C. Înainte de a fi analizate prin HPLC, probele au fost centrifugate timp de 10 minute la 8000 rpm.

Rezultate și discuții

În acest raport sunt prezentate analizele celor cinci probe obținute prin încărcarea grafenoxidului cu substanțele de interes.

Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR)

Grafenoxidul obținut este solubil în apă, de culoare neagră și dispersabil. Așa cum se poate vedea în figura 1(a), semnalul de la 1721 cm^{-1} este atribuit vibrației de întindere a legăturilor C=O prezente în grupările carbonil și carboxil. Prezența semnalului de la 1600 cm^{-1} , se datorează vibrației de întindere C=C și semnalele din zona 1224 cm^{-1} și 1029 cm^{-1} se datorează legăturilor COC (epoxi) respective COH (alcoxi). Semnalul de la 3122 cm^{-1} , corespunde vibrației de întindere a grupării hidroxil asociată [3, 9].

Figura 1(b) indică benzile caracteristice ale acidului galic pur, semnalul de la 1664 cm^{-1} indică prezența grupării fenolice, iar semnalul de la 1608 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere a dublelor legături C=C din inelul aromatic. Vibrația de întindere a grupărilor carboxilice apare la 1217 cm^{-1} , iar la 1021 cm^{-1} se găsește vibrația de întindere la legăturilor C-O din grupările carboxilice. Peak-ul de la 734 cm^{-1} corespunde vibrațiilor δ CC ale inelului benzenic. Semnalul de la 3269 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere a legăturii hidroxil asociată.

După încărcarea nanotransportorului (grafenoxid) cu acid galic, se observă că benzile caracteristice grafenoxidului de la 1715 cm^{-1} , respectiv 1580 cm^{-1} , din figura 1(c) cu intensitate scăzută, rămân. Semnalul ce se găsește în jurul valorii 3154 cm^{-1} , corespunde legăturii –OH din gruparea carboxil sau fenol. Prin scăderea dintre spectrul specific grafenoxidului încărcat cu acid galic și cel al grafenoxidului pur se poate observa o deplasare și o lărgire vizibilă a benzii din jurul valorii 1850 cm^{-1} dar și o creștere a intensității relative a peak-ului, ceea ce demonstrează interacția acidului galic cu suportul grafenoxidic. Același lucru se poate observa și în cazul peak-ului de la 1030 cm^{-1} . Spectrul infraroșu al suportului grafenoxid încărcat cu acid galic (GOGA) arată semnalele caracteristice atât ale grafenoxidului cât și ale acidului galic, ceea ce sugerează faptul că interacția suport-acid galic este o interacție puternică [1, 30].

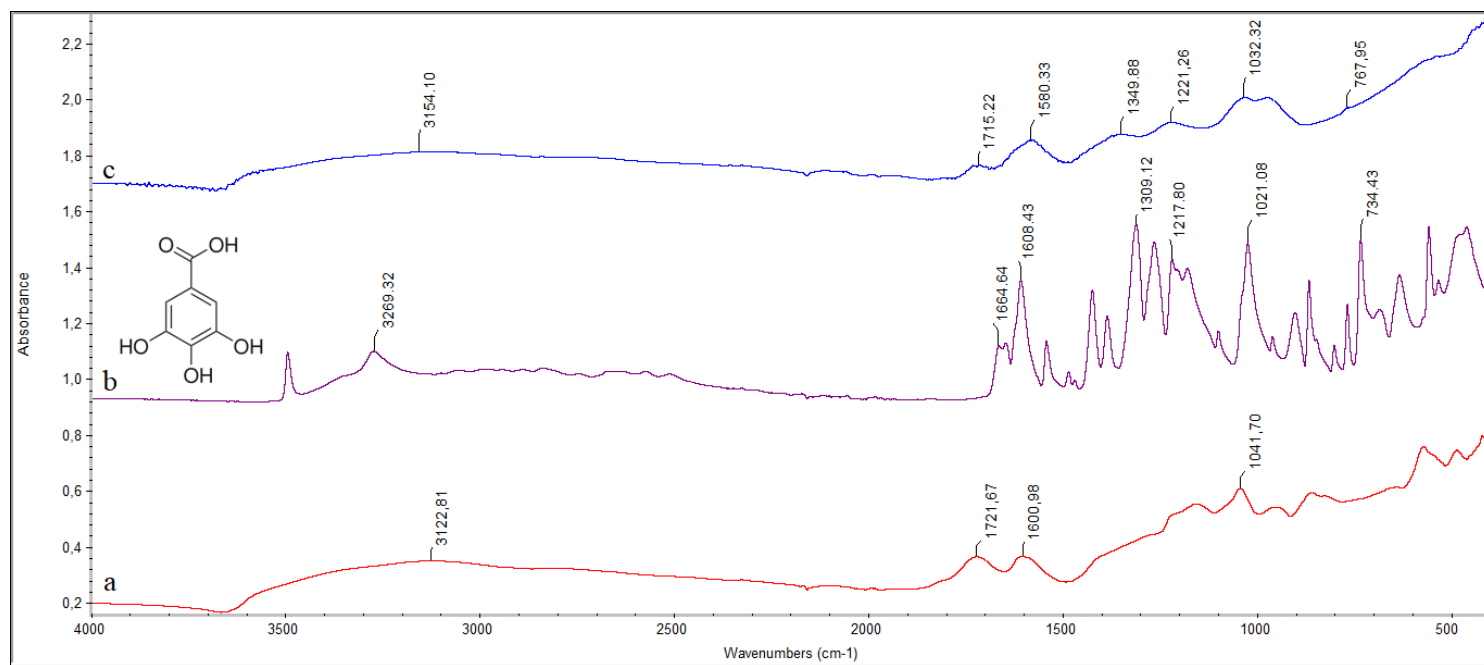


Figura 1. Spectrele FTIR caracteristice: a) grafenoxid (GO), b) acid galic (GA) și c) grafenoxid încărcat cu acid galic (GOGA)

În figura 2(b), vibrația de întindere a grupărilor –CH apare la lungimea de undă de 2979 cm^{-1} . Banda cu intensitate foarte puternică de la 1600 cm^{-1} este atribuită vibrației de întindere a legăturilor –CO prezente în grupările carboxyl și banda de intensitate de la 1448 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere CC din inelul aromatic. Semnalele de la 1214 cm^{-1} și 1071 cm^{-1} corespund vibrației de întindere al legăturii C-OH din inelul aromatic. Semnalele cuprinse între 3200 cm^{-1} și 3500 cm^{-1} corespund vibrației grupărilor hidroxil asociate [31]. Cele două spectre ale GO-lui și GOCA sunt asemănătoare, în cel din urmă regăsindu-se semnale caracteristice cu cele ale acidului cafeic. Ca și în figura 1, diferențele se văd în aceleași zone ale spectrului, 1580 cm^{-1} și 1041 cm^{-1} .

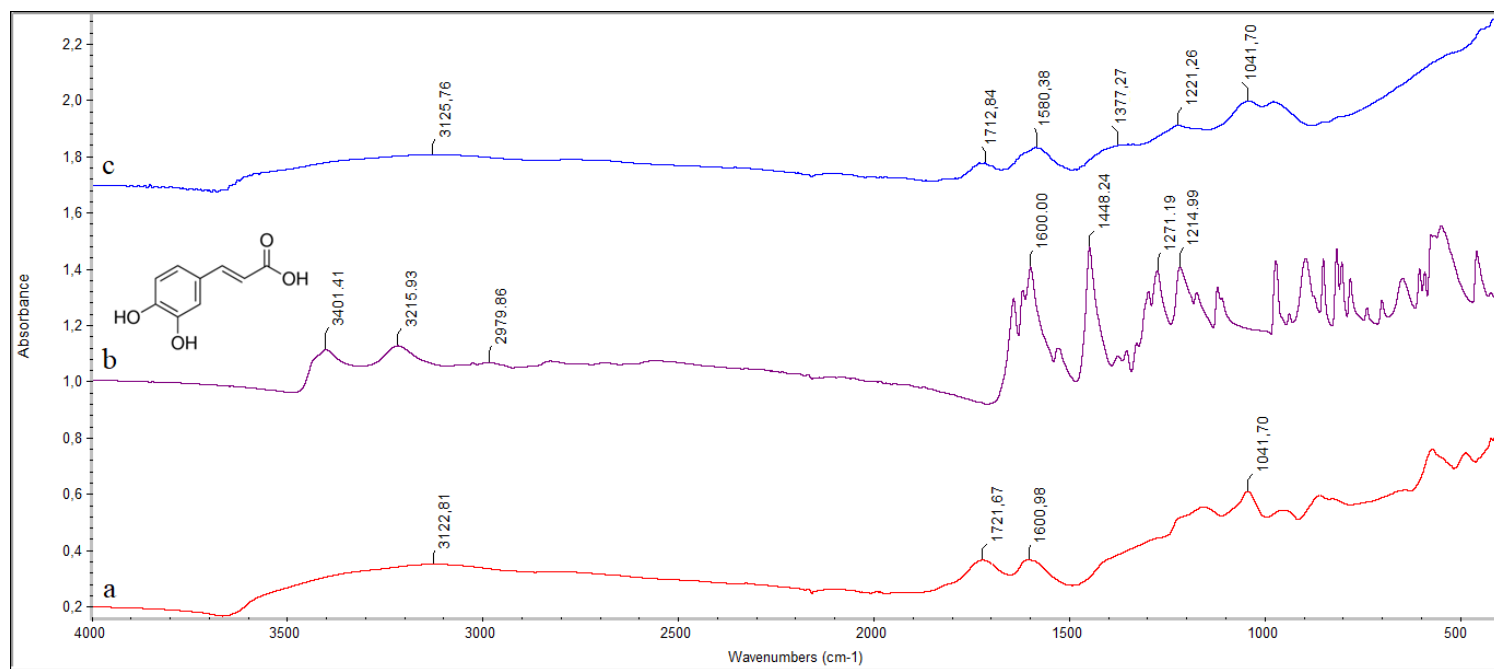


Figura 2. Spectrele FTIR caracteristice: a) grafenoxid (GO), b) acid cafeic (CA) și c) grafenoxid încărcat cu acid cafeic (GOCA)

Spectrul din figura 3(b) prezintă benzile caracteristice la 1647-1677 cm⁻¹ ce corespund vibrației de întindere a dublelor legături C=C din inelul aromatic respectiv din gruparea vinilică. Semnalele cuprinse între 3010 cm⁻¹ și 3081 cm⁻¹ corespund vibrației de întindere a legăturilor C-H. Semnalele de absorbție sub 3000 cm⁻¹ sunt în general asociate cu grupările nesaturate. Cele două semnale de la 1377 cm⁻¹ și 1437 cm⁻¹ sunt atribuite legăturilor CH₃/CH₂, în timp ce semnalul intens de la 885 cm⁻¹ poate corespunde vibrației de întindere a grupării -CH=CH₂. În figura 3(c) se pot observa semnale caracteristice limonenului prin deplasarea și lărgirea benzii de la 1583 cm⁻¹. De asemenea se poate observa o diferență de intensitate relativă între cele două peak-uri de la 1583 cm⁻¹ și 1721 cm⁻¹ din figura 1(c) și peak-urile din spectrul grafenoxidului din aceeași zonă [32].

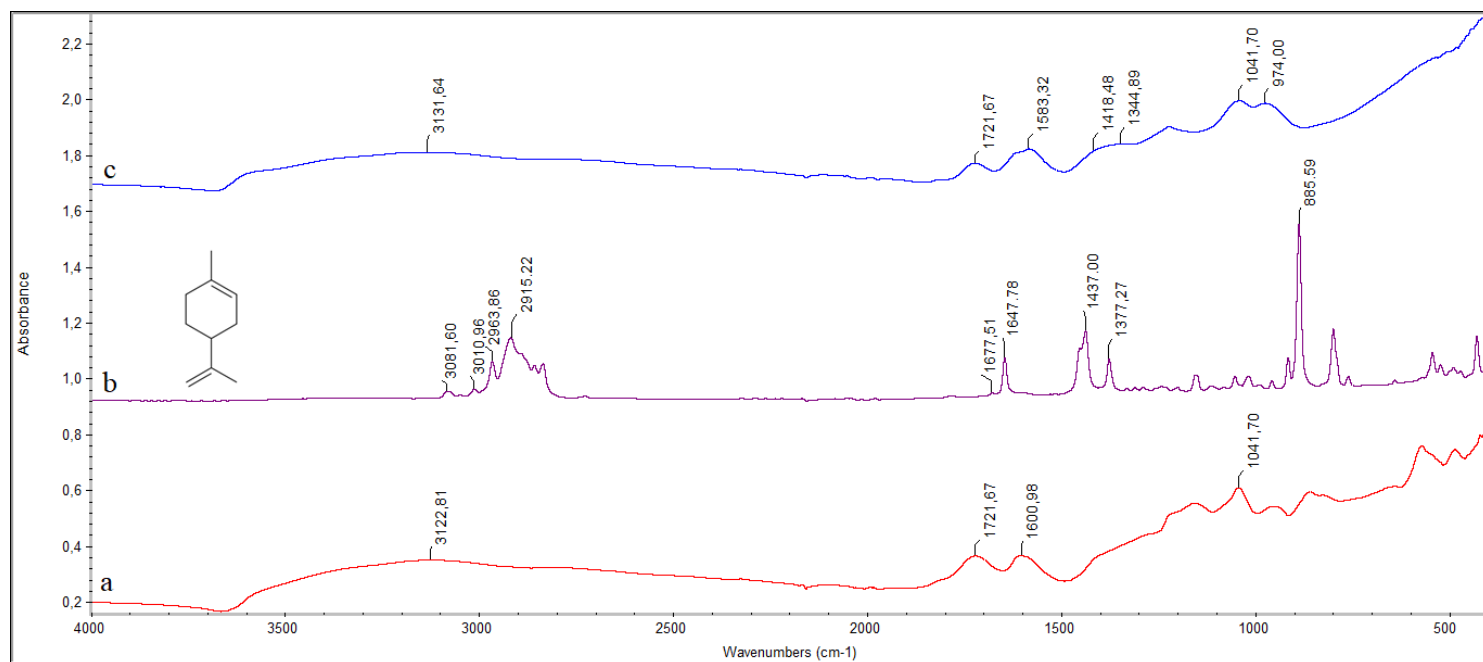


Figura 3. Spectrele FTIR caracteristice: a) grafenoxid (GO), b) limonen și c) grafenoxid încărcat cu limonene

În uleiul esențial de nucșoară principalii compuși chimici sunt sabinen, α -pinen și miristicin [33]. Figura 4(b) arată semnale asemănătoare cu cele identificate de alți cercetători, cum ar fi cele de la 941 cm^{-1} (corespunzător vibrației de întindere -CH) și cel de la 1197 cm^{-1} (corespunzător vibrației -CO). Vibrația de întindere a grupărilor CH_3/CH_2 apare la 1433 cm^{-1} . De asemenea, semnalul de la 3511 cm^{-1} corespunde grupării hidroxil asociată, iar cel de la 2919 cm^{-1} este atribuit vibrației de întindere a legăturilor -CH. După cum se poate observa în figura 3(c), în material se regăsesc semnale caracteristice uleiului esențial de nucșoară ceea ce demonstrează încărcarea anumitor compuși pe grafenoxid [34, 35].

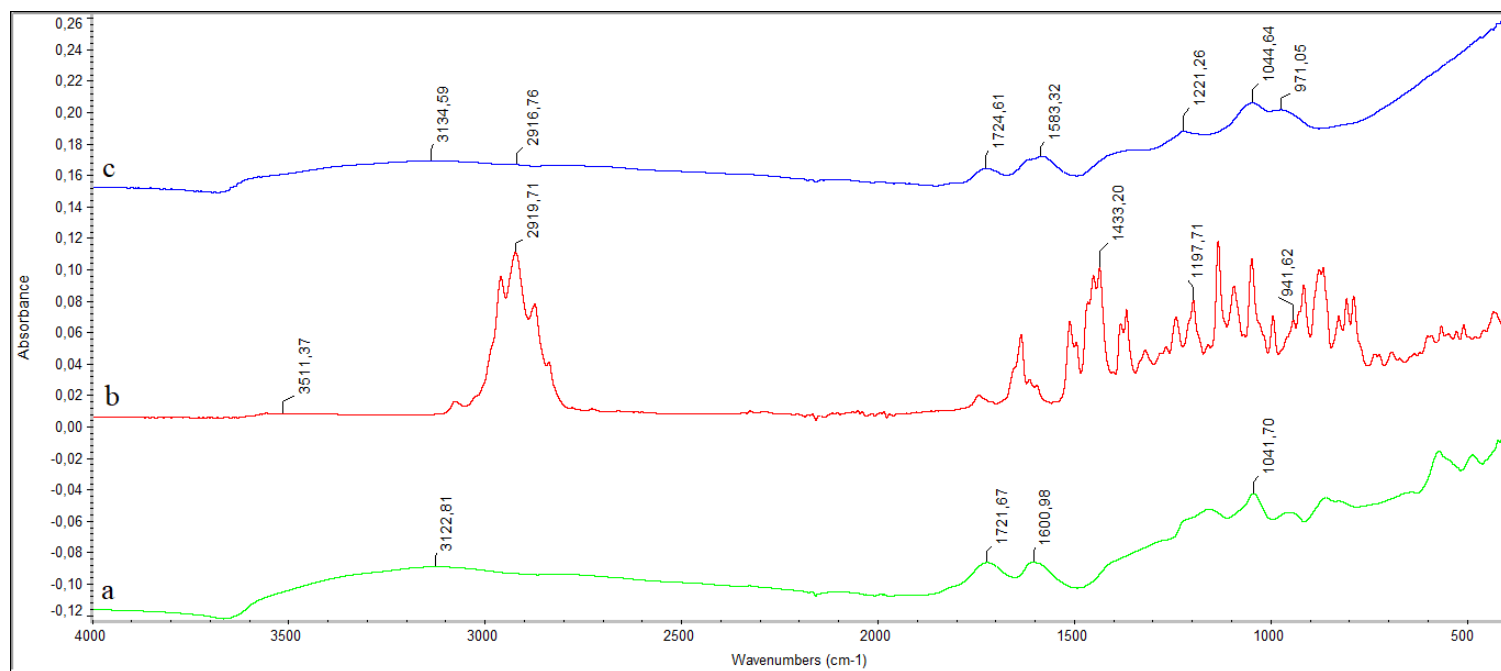


Figura 4. Spectrele FTIR caracteristice: a) grafenoxid (GO), b) ulei esențial de nucșoară și c) grafenoxid încărcat cu ulei esențial de nucșoară

După cum se poate observa, ultimele două spectre FTIR sunt asemănătoare din punct de vedere al încărcării substanței active pe nanotransportorul grafenoxid, rezultând formarea cu succes a complexului [36].

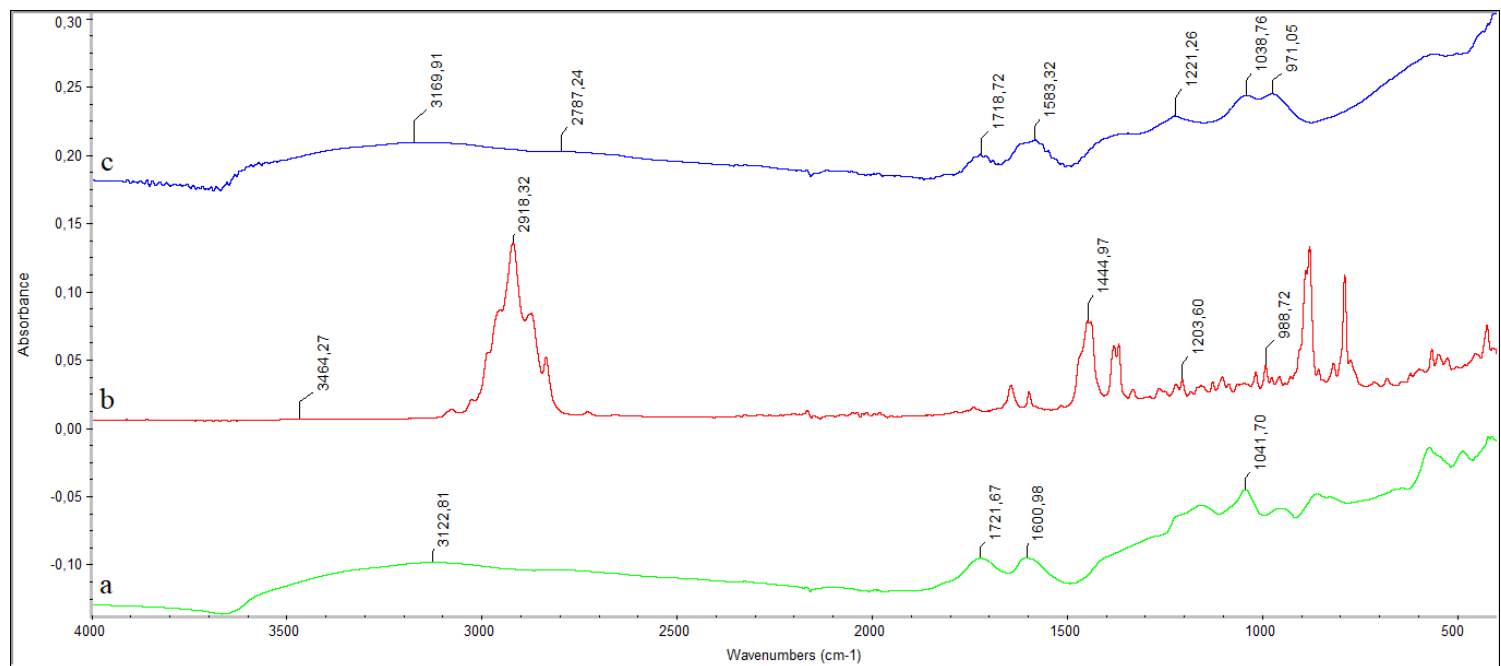
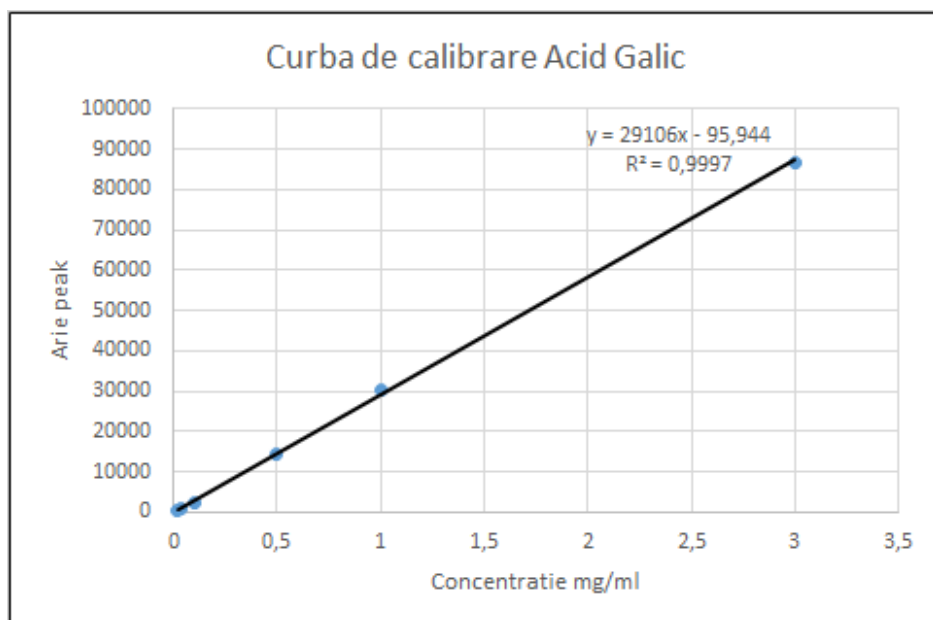


Figura 5. Spectrele FTIR corespunzatoare: a) grafenoxid (GO), b) ulei esențial de pin cembra și c) grafenoxid încărcat cu ulei esențial de pin cembra

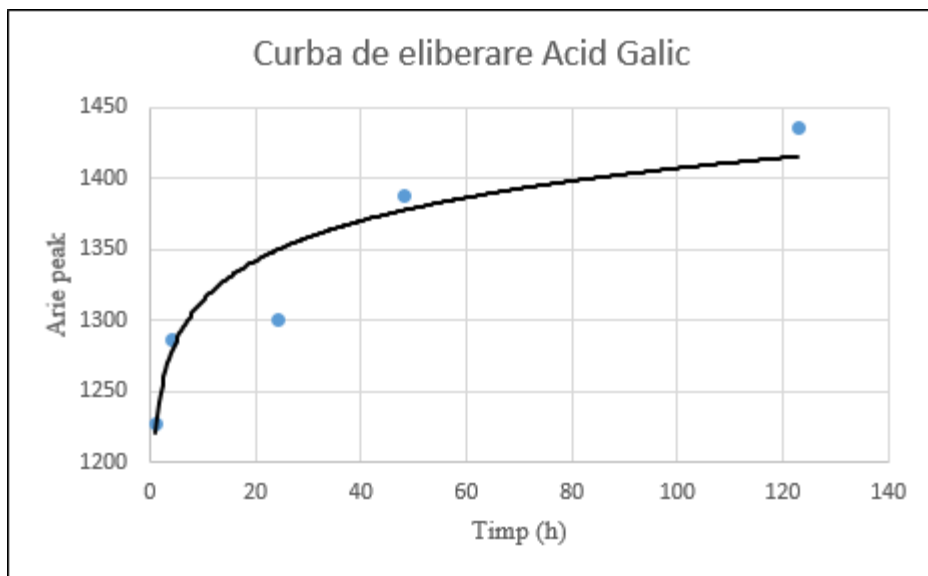
Încărcarea și gradul de eliberare al compușilor activi

Curba de calibrare pentru substanța de interes (acid galic) a fost obținută la o lungime de undă de 280 nm utilizând o serie de soluții standard de concentrații cunoscute cuprinse între 0,02 și 3 mg/ml. Așa cum se poate observa în figura 6, curba de calibrare este liniară având coeficientul de corelație mai mare de 0,995 [18, 37]. Profilul de eliberare al acidului galic din complexul GOGA în soluție tampon fosfat la pH 7.4 este arătat de asemenea în figura 6. Din figură se poate observa că viteza de eliberare în soluția tampon este lentă ceea ce se datorează procesului de schimb anionic ce are loc între anionii acidului galic și anionii din soluția tampon [1, 38].

Figura 6. Curbele de calibrare și eliberare ale acidului galic



Concentratie (mg/ml)	Arie peak
0,02	458
0,04	954
0,1	2353
0,5	14268
1	30126
3	86897



Timp (h)	Arie peak
1	1228
4	1287
24	1301
48	1389
123	1436

Aceste rezultate prezintă potențial pentru suportul grafenoxidic încărcat cu acid galic (GOGA) pentru a fi utilizat ca sistem cu eliberare a substanței de interes, având proprietatea de eliberare controlată și susținută. În urma rezultatelor finale putem determina procentul de eliberare al acidului galic în nanotransportor. Urmează să analizăm și restul compușilor pentru a putea determina biocompatibilitatea și utilizarea acestor materiale în aplicații medicale.

Concluzii și perspective

Aplicațiile grafenoxidului în domeniul biomedicinii au fost demonstrate pe baza lucrărilor raportate în ultimii ani. În acest raport am prezentat sinteza unor sisteme de eliberare controlată bazate pe grafenoxid ca suport de încărcare cu diferite substanțe active. Prin analizele efectuate dorim să demonstrăm biocompatibilitatea și proprietățile anticancerigene și antimicrobiene ale complexelor obținute. Din rezultatele obținute până în momentul de față, s-a demonstrat încărcarea cu succes a compușilor de interes pe suportul grafenoxidic. De asemenea s-a observat eliberarea lentă și continuă a acidului galic, ceea ce duce la creșterea viabilității substanței ducând la o eficiență terapeutică mai bună, scăzând astfel frecvența de dozare a medicamentului.

Vom investiga în continuare compușii pentru a determina capacitatea de adsorbție și eliberare de substanțe biologic active prin analize specifice, astfel încât să prezinte proprietăți benefice organismului. Studii viitoare *in vitro* și *in vivo* sunt necesare pentru demonstrarea acestor proprietăți.

Bibliografie

- [1] Dorniani D, Saifullah B, Barahuie F, Arulselvan P, Hussein MZ, Fakurazi S, et al. Graphene Oxide-Gallic Acid Nanodelivery System for Cancer Therapy. *Nanoscale research letters*. 2016;11:491.
- [2] Wu SY, An SS, Hulme J. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. *International journal of nanomedicine*. 2015;10 Spec Iss:9-24.
- [3] Wang K, Ruan J, Song H, Zhang J, Wo Y, Guo S, et al. Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale research letters*. 2011;6:8.
- [4] Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev*. 2010;39:228-40.
- [5] Kumar KS, Das Modac M, Paik P. Graphene Oxide for Biomedical Applications. *Journal of Nanomedicine Research*. 2017;5:1-6.
- [6] Pan Y, Sahoo NG, Li L. The application of graphene oxide in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*. 2012;9:1365-76.
- [7] Chung C, Kim YK, Shin D, Ryoo SR, Hong BH, Min DH. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Accounts of chemical research*. 2013;46:2211-24.
- [8] Wu S, Zhao X, Cui Z, Zhao C, Wang Y, Du L, et al. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene oxide loaded with doxorubicin on human multiple myeloma cells. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:1413-21.
- [9] Han W, Niu WY, Sun B, Shi GC, Cui XQ. Biofabrication of polyphenols stabilized reduced graphene oxide and its anti-tuberculosis activity. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2016;165:305-9.
- [10] Sebe I, Kallai-Szabo B, Zelko R, Szabo D. Polymers and Formulation Strategies of Nanofibrous Systems for Drug Delivery Application and Tissue Engineering. *Current medicinal chemistry*. 2015;22:604-17.
- [11] Wang XQ, Hao LY, Zhang CL, Chen J, Zhang P. High efficient anti-cancer drug delivery systems using tea polyphenols reduced and functionalized graphene oxide. *J Biomater Appl*. 2017;31:1108-22.
- [12] Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn JD, Rakariyatham N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food chemistry*. 2007;100:1044-8.
- [13] Santos A, Barros L, Calhella RC, Duenas M, Carvalho AM, Santos-Buelga C, et al. Leaves and decoction of *Juglans regia* L.: Different performances regarding bioactive compounds and in vitro antioxidant and antitumor effects. *Ind Crop Prod*. 2013;51:430-6.
- [14] Cosmulescu S, Trandafir I, Nour V. Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia*) leaves. *Pharm Biol*. 2014;52:575-80.
- [15] Fernandez-Agullo A, Pereira E, Freire MS, Valentao P, Andrade PB, Gonzalez-Alvarez J, et al. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind Crop Prod*. 2013;42:126-32.
- [16] Zhang XB, Zou CL, Duan YX, Wu F, Li G. Activity guided isolation and modification of juglone from *Juglans regia* as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines. *Bmc Complement Altern M*. 2015;15.
- [17] Weng YP, Hung PF, Ku WY, Chang CY, Wu BH, Wu MH, et al. The inhibitory activity of gallic acid against DNA methylation: application of gallic acid on epigenetic therapy of human cancers. *Oncotarget*. 2018;9:361-74.
- [18] Zuo YG, Chen H, Deng YW. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*. 2002;57:307-16.
- [19] Mota FL, Queimada AJ, Pinho SP, Macedo EA. Aqueous solubility of some natural phenolic compounds. *Ind Eng Chem Res*. 2008;47:5182-9.

- [20] Ji WQ, Meng QQ, Ding L, Wang F, Dong JJ, Zhou GY, et al. Measurement and correlation of the solubility of caffeic acid in eight mono and water plus ethanol mixed solvents at temperatures from (293.15 to 333.15) K. *J Mol Liq.* 2016;224:1275-81.
- [21] Zahi MR, Liang H, Yuan QP. Improving the antimicrobial activity of D-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion. *Food Control.* 2015;50:554-9.
- [22] Yang C, Chen H, Chen HL, Zhong BL, Luo XZ, Chun J. Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel. *Molecules.* 2017;22.
- [23] de Doz MBG, Cases AM, Solimo HN. (Liquid plus liquid) equilibria of (water plus linalool plus limonene) ternary system at T = (298.15, 308.15, and 318.15) K. *J Chem Thermodyn.* 2008;40:1575-9.
- [24] Mendanha SA, Marquezin CA, Ito AS, Alonso A. Effects of nerolidol and limonene on stratum corneum membranes: A probe EPR and fluorescence spectroscopy study. *Int J Pharmaceut.* 2017;532:547-54.
- [25] Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemoth.* 2001;47:565-73.
- [26] Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evid-Based Compl Alt.* 2016.
- [27] Al-Rawi SS, Ibrahim AH, Ab Rahman NNN, Ben Nama MM, Majid AMSA, Ab Kadir MO. The effect of supercritical fluid extraction parameters on the nutmeg oil extraction and its cytotoxic and antiangiogenic properties. *Proc Food Sci.* 2011;1:1946-52.
- [28] Saifullah B, Hussein MZ, Hussein-Al-Ali SH, Arulselvan P, Fakurazi S. Sustained release formulation of an anti-tuberculosis drug based on para-amino salicylic acid-zinc layered hydroxide nanocomposite. *Chem Cent J.* 2013;7.
- [29] Dorniani D, Kura AU, Bin Hussein MZ, Fakurazi S, Shaari AH, Ahmad Z. Controlled-release formulation of perindopril erbumine loaded PEG-coated magnetite nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Sci.* 2014;49:8487-97.
- [30] Mohammed-Ziegler I, Billes F. Vibrational spectroscopic calculations on pyrogallol and gallic acid. *J Mol Struct-Theochem.* 2002;618:259-65.
- [31] Dimitric-Markovic JM, Mioc UB, Baranac JM, Nedic ZP. A study of the IR spectra of the copigments of malvin chloride with organic acids. *J Serb Chem Soc.* 2001;66:451-62.
- [32] Urena FP, Moreno JRA, Gonzalez JLL. Conformational study of (R)-(+)-limonene in the liquid phase using vibrational spectroscopy (IR, Raman, and VCD) and DFT calculations. *Tetrahedron-Asymmetr.* 2009;20:89-97.
- [33] Jukic M, Politeo O, Milos M. Chemical composition and antioxidant effect of free volatile aglycones from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) compared to its essential oil. *Croat Chem Acta.* 2006;79:209-14.
- [34] Muchtaridi, Subarnas A, Apriyantono A, Mustarichie R. Identification of Compounds in the Essential Oil of Nutmeg Seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) That Inhibit Locomotor Activity in Mice. *Int J Mol Sci.* 2010;11:4771-81.
- [35] Shafiq MI, Ahmed M, Rasul A, Samra ZQ, Qadir MA, Mazhar S, et al. Chemical Composition of the Essential Oils of Nutmeg and Mace by GC-FID/MS Indigenous to Pakistan and Evaluation of their Biological Activities. *Lat Am J Pharm.* 2016;35:2176-84.
- [36] Salem MZM, Ali HM, Basalah MO. Essential Oils from Wood, Bark, and Needles of *Pinus roxburghii* Sarg. from Alexandria, Egypt: Antibacterial and Antioxidant Activities. *Bioresources.* 2014;9:7454-66.
- [37] Peng L, Song XH, Shi XG, Li JX, Ye CX. An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in *Camellia* species. *J Food Compos Anal.* 2008;21:559-63.
- [38] Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J Control Release.* 2001;73:121-36.

