

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

Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação contendo kaempferol para administração intranasal e oral

MARIANA COLOMBO

PORTO ALEGRE, 2019



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

Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação contendo kaempferol para administração intranasal e oral

Tese apresentada por **Mariana Colombo** para obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dr. Letícia Scherer Koester

PORTO ALEGRE, 2019

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.03.2019, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Elizandra Braganhol

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Profa. Dr. Karina Paese

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Tiago Caon

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

#### CIP - Catalogação na Publicação

Colombo, Mariana

Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação contendo kaempferol para administração intranasal e oral / Mariana Colombo. -- 2019.

249 f.

Orientadora: Letícia Scherer Koester.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. kaempferol. 2. nanoemulsão. 3. administração intranasal. 4. dispersão sólida. 5. administração oral. I. Scherer Koester, Letícia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Sinalização Purinérgica e Câncer, Departamento de Bioquímica da UFRGS. Agradecimentos a Capes e a FAPERGS, órgãos que financiaram a bolsa de estudos e o desenvolvimento deste trabalho, respectivamente.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, responsáveis por toda minha formação acadêmica.

À minha orientadora Prof. Dra. Letícia Koester pela oportunidade, incentivo e amizade desde a iniciação científica.

Ao laboratório 22 da Bioquímica, em especial ao Prof. Fabrício Figueiró, Prof., Ana Battastini e a bolsista Amanda por todo suporte nos experimentos.

Aos professores Helder, Valquíria e Ortega, pela amizade e conhecimento transmitido em todos esses quase 10 anos de LDG.

Aos queridos amigos e colegas de laboratório que alegraram todos os meus dias. À Gabi, no início como bolsista e logo depois como amiga e colega de pós-graduação. Em especial à Luana, Lucélia, Kleyton, Nessa e Tainá, pela amizade dentro e fora do laboratório. Ao pessoal do LDG do tempo da minha iniciação científica, meus primeiros incentivadores da vida acadêmica.

À minha família, em especial aos meus pais, irmão, avós, tios e dinda pelo amor e apoio durante toda minha trajetória.

Ao Fabrício pelo companheirismo, incentivo e amor durante todos esses anos. E principalmente por agora ser pai da nossa maior conquista que está a caminho, Caetano.





## APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, com encarte de publicações. Assim, este exemplar encontra-se estruturado da seguinte forma:

- **Introdução;**
- **Objetivo geral e objetivos específicos;**
- **Revisão da literatura;**
- **Capítulo I: Desenvolvimento de nanoemulsões contendo kaempferol para administração intranasal e avaliação da atividade citotóxica em glioma:**
  - Publicação I: "Validation of an HPLC-UV method for analysis of kaempferol-loaded nanoemulsion and its application to *in vitro* and *in vivo* tests".
  - Publicação II: "Kaempferol-loaded mucoadhesive nanoemulsion for intranasal administration reduces glioma growth *in vitro*".
- **Capítulo II: Desenvolvimento de dispersões sólidas contendo kaempferol para administração oral:**
  - Artigo científico a ser submetido: "Flavonoids delivery by solid dispersion: a systematic review".
  - Publicação II : "Solid dispersion of kaempferol: formulation development, characterization and oral bioavailability assessment".
- **Discussão geral;**
- **Conclusões;**
- **Referências.**



## RESUMO

Kaempferol (KPF) é um flavonoide com diversas propriedades farmacológicas, dentre elas, podemos destacar a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral. Entretanto, a baixa hidrossolubilidade e biodisponibilidade comprometem sua utilização terapêutica. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver estratégias farmacotécnicas para melhorar as características biofarmacêuticas do KPF, no caso, nanoemulsões para administração intranasal e dispersões sólidas para a via oral. Primeiramente, um método por cromatografia líquida de alta eficiência foi validado para a quantificação do KPF em diferentes matrizes (nanoemulsão, mucosa nasal, fluido receptor e cérebro de ratos). Duas formulações foram desenvolvidas: nanoemulsão (KPF-NE) e nanoemulsão mucoadesiva contendo quitosana (KPF-MNE). Ambas nanoemulsões apresentaram tamanho nanométrico inferior a 190 nm, baixo índice de polidispersão, potencial zeta negativo pra KPF-NE e positivo para KPF-MNE e teor superior a 96%. Uma maior força mucoadesiva foi observada para KPF-MNE, bem como maior permeação através da mucosa nasal. Ainda, foi verificado que a administração intranasal da KPF-MNE aumentou o teor de KPF no cérebro de ratos em relação a KPF-NE e KPF livre. Além disso, KPF-MNE apresentou atividade citotóxica em células de glioma superior a KPF-NE, com indução de apoptose. Dispersões sólidas contendo KPF e como carreador, Poloxamer 407 (1:5, p:p), foram desenvolvidas por dois métodos de preparo (fusão e evaporação do solvente) e ambas aumentaram significativamente a solubilidade aparente e apresentaram similar perfil de dissolução em meio ácido (aproximadamente 100% em 2h). Em contrapartida, KPF livre apresentou dissolução incompleta. Após a administração oral da dispersão sólida em ratos, houve aumento significativo (aproximadamente 2 vezes) na extensão de absorção (ASC) em comparação ao KPF livre. Portanto, KPF-MNE apresenta-se como um promissor sistema de liberação para KPF através da via intranasal para o tratamento de GBM, bem como dispersões sólidas são uma estratégia eficaz para aumentar a dissolução e biodisponibilidade oral do KPF.

**Palavras-chave:** Kaempferol, nanoemulsões, administração intranasal, glioma, dispersões sólidas, dissolução



## ABSTRACT

Kaempferol (KPF) is a flavonoid with several pharmacological properties, among them we can highlight the anti-inflammatory, antioxidant and anti-tumor activity. However, low water solubility and bioavailability compromise its therapeutic use. In this context, the objective of the study was to develop pharmacotechnical strategies to improve the biopharmaceutical characteristics of KPF. Nanoemulsions containing KPF were developed for intranasal administration and solid dispersions for the oral route. First, a high performance liquid chromatography method was validated for the quantification of KPF in different matrices (nanoemulsion, nasal mucosa, receptor fluid and murine brain). Two formulations were developed: nanoemulsion (KPF-NE) and mucoadhesive nanoemulsion containing chitosan (KPF-MNE). Both nanoemulsions had a nanometric size (less than 190 nm), low polydispersity index, negative zeta potential for KPF-NE and positive for chitosan-containing KPF-MNE, KPF content greater than 96% and compatible pH for intranasal administration. Higher mucoadhesive strength was observed for the formulation as well as increased permeation through the nasal mucosa. Intranasal administration of KPF-MNE has been shown to increase KPF content in the rat brain relative to KPF-NE and free KPF. In addition, KPF-MNE showed cytotoxic activity in glioma cells superior to KPF-NE, with induction of apoptosis. Solid dispersions containing the Poloxamer 407 as carrier (1: 5) were developed by two methods of preparation (solvent evaporation and melting method) and both significantly increased apparent solubility and showed similar dissolution profile (approximately 100% in 2h). In contrast, free KPF showed incomplete dissolution. After oral administration of the solid dispersion in rats, there was a significant (approximately 2-fold) increase in extent of absorption (ASC) compared to free KPF. Therefore, KPF-MNE presents as a promising delivery system for KPF through the intranasal route for the treatment of GBM, as well as solid dispersions are an effective strategy to increase the dissolution and oral bioavailability of KPF.

**Key-words:** Kaempferol, nanoemulsions, intranasal administration, glioma, solid dispersion, dissolution.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

**Figura 1.** Estrutura básica dos flavonoides (KUMAR e PANDEY, 2013).

**Figura 2.** Estrutura química do kaempferol (CHEN e CHEN, 2013).

**Figura 3.** Anatomia da cavidade nasal (MISRA e KHER, 2012).

**Figura 4.** Vias de direcionamento cerebral após administração nasal (COMFORT et al., 2015).

**Figura 5.** Estrutura de uma nanoemulsão (SINGH et al., 2017).

**Figura 6.** Estrutura química da quitosana (CASETTARI e ILLUM, 2014).

**Figura 7.** Composição e propriedades das quatro gerações de dispersões sólidas (VO et al., 2013).

### CAPÍTULO I

---

#### Publicação I

**Figure 1.** Representative HPLC chromatograms of KPF (kaempferol standard solution, 5.0 µg/mL), BR (murine brain), MC (porcine nasal mucosa), RM (receptor media), NE (blank nanoemulsion).

**Figure 2.** Pareto charts obtained from the Plackett–Burman robustness test. A, flow rate (mL/min); B, temperature (°C); C, detection wavelength (nm); D, methanol

content in the mobile phase (%); A<sub>1</sub>: blank nanoemulsion; A<sub>2</sub>: receptor media; A<sub>3</sub>: porcine nasal mucosa; A<sub>4</sub>: murine brain.

## Publicação II

**Figure 1.** TEM analysis from developed formulations A) KPF-NE, B) KPF-MNE.

**Figure 2.** Histopathological sections of porcine nasal mucosa treated with A) IPA, B) PBS pH 6.4, C) NE, D) MNE, D) KPF-NE, E) KPF-MNE.

**Figure 3.** Force (A) and work of mucoadhesion (B) of samples measured by the mucoadhesive strength test. Data were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's test. Significantly different from the control groups (\*\*p < 0.001, \*\*\*p < 0.0001).

**Figure 4.** KPF concentration (ng/g of tissue) in rat's brain after 1 h of nasal administration of formulations. Data were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's test. Significantly different from the control groups (\*\*p < 0.001).

**Figure 5.** A) Antiproliferative effect of free KPF, KPF-NE and KPF-MNE at 1 μM by Trypan blue exclusion assays. B) Effect of kaempferol on C6 glioma cell line. Cell viability is presented in relation to control. Vehicle control (DMSO) did not interfere significantly with cell viability. The data represent the mean of three independent experiments performed in triplicate ± SD. Data were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's test. Significantly different from the control groups (\*p < 0.05).

**Figure 6.** Representative histograms of the percentage of cells in the G1, S, G2/M and sub-G1 phase of the cell cycle after treatment with free KPF, MNE, MNE+ KPF and KPF-MNE at 1 μM for 72 h. Data were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's test. Significantly different from the control groups (\*p < 0.05).



**Figure 7.** A–D) Representative images containing the average relative number of cells after treatment with DMSO, free KPF, MNE, MNE+ KPF and KPF-MNE at 1  $\mu$ M for 72 h. E) Representative images containing the average relative number of cells after treatment with free KPF-MNE at 1  $\mu$ M for 72 h. The gate settings distinguish between viable cells (bottom left), necrotic cells (top left), early apoptotic cells (bottom right) and late apoptotic cells (top right). F) Quantitative analysis of total apoptosis in cells treated with free KPF, KPF+MNE and KPF-MNE at 1  $\mu$ M for 72 h. The values are presented as the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Data were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's test. Significantly different from the control groups (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

## CAPÍTULO II

---

### Artigo a ser submetido

**Figure 1.** Basic flavonoid structure.

**Figure 2.** Flowchart of systematic literature search.

**Figure 3.** Summary of records employing solid dispersion of flavonoids in terms of (A) drugs being formulated; (B) the methods of preparation (C) the carriers employed.

### Publicação II

**Figure 1.** Diagram of phase solubility for KPF in the presence of various carriers in distilled water (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ).

**Figure 2.** Solubility of KPF from solid dispersions composed of Poloxamer 407 at various drug: carrier weight ratio prepared by solvent method (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0.0001$ , compared to the other groups.

**Figure 3.** Fourier transform infrared spectroscopy spectra of KPF (A), Poloxamer 407 (B), physical mixture (C), SD<sub>MM</sub> (D), and SD<sub>SM</sub> (E).

**Figure 4.** Differential scanning calorimetry thermograms of KPF (A), Poloxamer 407 (B), physical mixture (C), SD<sub>MM</sub> (D), and SD<sub>SM</sub> (E).

**Figure 5.** X-ray diffraction patterns of KPF (A), Poloxamer 407 (B), physical mixture (C), SD<sub>MM</sub> (D), and SD<sub>SM</sub> (E).

**Figure 6.** Scanning electron microscopic images of KPF (A), Poloxamer 407 (B), physical mixture (C), SD<sub>MM</sub> (D), and SD<sub>SM</sub> (E).

**Figure 7.** Dissolution profiles from different preparations of kaempferol (mean  $\pm$  S.D.; n = 3).

**Figure 8.** KPF plasma concentration upon oral administration in rats (100 mg/kg) of pure KPF and SD<sub>MM</sub> (KPF: Poloxamer 407, 1:5) (mean  $\pm$  S.D., n= 4).

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

**Tabela 1.** Exemplos de dispersões sólidas disponíveis comercialmente.

### CAPÍTULO I

---

#### Publicação I

**Table 1.** Factors and their levels evaluated by four-factor Plackett–Burman robustness test.

**Table 2.** Linearity evaluation and sensitivity data from KPF detected in different matrices.

**Table 3.** Results of precision and accuracy of KPF recovered from different matrices.

**Table 4.** Recovery of KPF added in biological matrices

#### Publicação II

**Table 1.** Physicochemical properties of formulations.

**Table 2.** *Ex vivo* KPF permeation from different formulations in porcine nasal mucosa after 6 h (mean  $\pm$  SD, n=4).

**Table 3.** Antioxidant activity of KPF solution, KPF nanoemulsions, and blank formulations, calculated as the inhibition percentage of DPPH radical.

## CAPÍTULO II

---

### Artigo a ser submetido

**Table 1.** Summary of records that discussed solid dispersion formulations for the enhancement of the *in vitro* dissolution and/or oral bioavailability of flavonoids.

**Table 2.** Solid dispersion formulations of flavonoids from herbal extracts

### Publicação II

**Table 1.** Phase solubility of kaempferol ( $\mu\text{g/mL}$ ) at various concentrations of carriers (n=3).

**Table 2.** Pharmacokinetic parameters of KPF and SDMM after oral administration to rats at 100 mg/Kg (n=4; mean  $\pm$  S.D.).

## LISTA DE ABREVIATURAS

↑	aumento
↓	diminuição
API	do inglês, <i>active pharmaceutical ingredient</i>
AUC	do inglês, <i>area under the curve</i>
BCS	do inglês, <i>Biopharmaceutics Classification System</i>
BHE	barreira hemato-encefálica
CA	carreador amorfo
CC	carreador cristalino
C <sub>max</sub>	do inglês, <i>peak plasma concentration</i>
CSF	fluido cérebro espinal
DS	dispersão sólida
DSC	do inglês, <i>differential scanning calorimetry</i>
EMA	do inglês, <i>European Medicines Agency</i>
EUA	Estados Unidos
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	do inglês, <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GBM	glioblastoma multiforme
HPLC	do inglês, <i>high-performance liquid chromatography</i>
HPMC	hidroxipropilmetilcelulose
HPMCAS	succinato do acetato de hidroxipropilmetilcelulose
KPF	kaempferol
KPF+MNE	tratamento com a nanoemulsão branca MNE e KPF em solução
KPF+NE	tratamento com a nanoemulsão branca NE e KPF em solução
KPF-MNE	nanoemulsão mucoadesiva contendo KPF
KPF-NE	nanoemulsão contendo KPF
MEV	do inglês, <i>scanning electron microscopy</i>
MHRA	do inglês, <i>Medicines and Health Products Regulatory Agency</i>
MM	do inglês, <i>melting method</i>

MNE	nanoemulsão mucoadesiva
NE	nanoemulsão
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	polietilenoglicol
PI	polímero intumescente
PIA	polímero insolúvel em água
PS	polímero surfactante
PVP	polivinilpirrolidona
PVP-VA	polivinilpirrolidona vinil acetato
SD <sub>MM</sub>	dispersão sólida preparada por método de fusão
SD <sub>SM</sub>	dispersão sólida preparada por método de evaporação do solvente
SF	surfactante
SLS	lauril sulfato de sódio
SM	do inglês, <i>solvent method</i>
SNC	sistema nervoso central
TPGS	succinato de d- alfa tocoferol polietilenoglicol 1000
UE	União Europeia
XRD	do inglês, <i>X-ray diffractometry</i>

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
Objetivo Geral .....	33
Objetivos Específicos .....	33
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>35</b>
Kaempferol .....	37
Via nasal .....	42
Administração intranasal de nanoemulsões .....	46
Gliomas .....	51
Administração oral de dispersões sólidas .....	53
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>61</b>
Publicação I .....	65
Publicação II .....	89
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>127</b>
Artigo a ser submetido .....	131
Publicação II .....	177
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>207</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>221</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>225</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>243</b>









O flavonoide kaempferol (KPF) possui ação anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiprotozoária e neuroprotetora. KPF induz morte celular em diferentes tecidos neoplásicos (pulmão, mama, cólon, próstata, fígado, pâncreas, pele, esôfago, cérebro e ovário) principalmente por apoptose, e os mecanismos envolvidos neste processo ainda estão sendo elucidados (CALDERON-MONTANO *et al.*, 2011; CHEN e CHEN, 2013; DEVI *et al.*, 2015). Em gliomas, além de inibir a invasividade e migração das células, KPF induz apoptose celular através da geração de ROS e é capaz de sensibilizar células cancerígenas aos efeitos citotóxicos de fármacos como doxorrubicina (SHARMA *et al.*, 2007; SIEGELIN *et al.*, 2008; JEONG *et al.*, 2009; NAKATSUMA *et al.*, 2010; SEIBERT *et al.*, 2011).

Gliomas são os tumores primários mais comuns e malignos do Sistema Nervoso Central (SNC) em adultos (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2007). Dentro dos tumores astrocíticos, os tumores de alto grau são os mais comuns, destacando-se glioblastoma multiforme (GBM), astrocitoma de grau IV (VAN WOENSEL *et al.*, 2013). O prognóstico para GBM é péssimo, pois mesmo com o tratamento preconizado (recessão cirúrgica, radioterapia e tratamento farmacológico) a sobrevida do paciente é de em média 14,6 meses desde o diagnóstico (ROBINS *et al.*, 2009; VAN WOENSEL *et al.*, 2013). A falha na terapia se deve principalmente à natureza infiltrante, ausência de especificidade terapêutica, quimiorresistência intrínseca e a barreira hematoencefálica (BHE) que limita a entrada dos quimioterápicos no SNC (VAN MEIR *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2014).

Diversas estratégias são utilizadas para aumentar a entrada dos fármacos no SNC (ALAM *et al.*, 2010). Dentre elas, a via de administração intranasal tem se mostrado promissora por diversas razões: ser uma via não invasiva; promover entrega direta do fármaco ao cérebro, evitando a limitação imposta pela BHE; evitar o metabolismo de primeira passagem, o que poderia diminuir a fração de fármaco ativo; possibilitar a utilização de baixas doses, evitando possíveis efeitos adversos; possibilitar a autoadministração. O fármaco consegue alcançar o cérebro diretamente através da região olfatória e/ou ramificações do nervo trigêmeo, ou indiretamente através da porção de fármaco que atinja a circulação sistêmica e consiga transpor a BHE (ALAM *et al.*, 2010; ILLUM, 2012; KOZLOVSKAYA *et al.*, 2014). Entretanto,

a via nasal pode apresentar algumas desvantagens como o *clearance* mucociliar, degradação enzimática e baixa permeabilidade do epitélio nasal a determinados fármacos.

Neste contexto, nanoemulsões são alternativas para contornar tais obstáculos, pois apresentam o potencial de aumentar a absorção de fármacos e o tempo de retenção na cavidade nasal (VINOGRADOV *et al.*, 2002; SOOD *et al.*, 2014). Além disso, o uso de quitosana nas formulações, devido a sua capacidade de abrir as junções oclusivas, favorece a permeação dos ativos, bem como o aumento do tempo de permanência na cavidade nasal, devido às propriedades mucoadesivas (CASSETTARI e ILLUM, 2014).

A partir do exposto, considerando a atividade do KPF contra gliomas, a seletividade imposta pela BHE aos fármacos, a potencialidade da nanotecnologia e a via de administração intranasal em aumentar a distribuição no tecido cerebral, o presente trabalho propõe, o inédito desenvolvimento de nanoemulsões contendo kaempferol para aplicação intranasal visando ao aumento da penetração cerebral e, assim, ao tratamento de glioblastoma multiforme.

Apesar das diversas atividades farmacológicas já citadas, KPF possui baixa biodisponibilidade oral, atribuída principalmente a sua baixa hidrossolubilidade (log P 3,11), o que limita sua aplicação terapêutica por esta via de administração tão consagrada (ROTHWELL *et al.*, 2005; CALDERON-MONTANO *et al.*, 2011; CHEN e CHEN, 2013; DEVI *et al.*, 2015). KPF é classificado como classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, tendo sua absorção oral controlada pela etapa de dissolução (XIE *et al.*, 2014). Portanto, aumentar a solubilidade do KPF no trato gastrointestinal é uma etapa crucial para aumentar sua absorção oral, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, seus efeitos farmacológicos.

Diversas estratégias são utilizadas para aumentar a hidrossolubilidade e biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis, como redução do tamanho das partículas para aumentar a área de superfície, utilização de pró-fármacos, utilização de sais e dispersões sólidas, as quais são consideradas umas das mais efetivas pelo aumento da molhabilidade e porosidade, diminuição do tamanho de partícula e/ou transformação para o estado amorfo do fármaco (LEUNER, CHRISTIAN e

DRESSMAN, JENNIFER, 2000; VO *et al.*, 2013). O princípio da técnica consiste basicamente em dispersar o fármaco hidrofóbico em um carreador hidrofílico, onde o carreador pode ser tanto cristalino quanto amorfo, e o fármaco pode encontrar-se molecularmente disperso como partículas amorfas ou cristalinas (MENG *et al.*, 2015).

O preparo de dispersões sólidas tem contribuído para gerar resultados promissores na dissolução e biodisponibilidade de flavonoides (KANAZE *et al.*, 2006; KAKRAN *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2015). Mesmo sendo evidente a necessidade de melhorar a biodisponibilidade oral do kaempferol, pouco se tem investigado no que se refere ao desenvolvimento de formulações orais contendo kaempferol, e, até o momento, dispersões sólidas contendo kaempferol não foram exploradas. Assim, o desenvolvimento de dispersões sólidas contendo KPF é uma promissora e inédita estratégia com o objetivo de melhorar sua solubilidade aquosa e biodisponibilidade oral.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver diferentes estratégias farmacotécnicas, nanoemulsões e dispersões sólidas, a fim de melhorar as características biofarmacêuticas do kaempferol.



## **OBJETIVOS**

---





## **Objetivo Geral**

Desenvolver e caracterizar sistemas de liberação contendo kaempferol para administração intranasal e oral visando à melhoria de suas características biofarmacêuticas.

## **Objetivos específicos**

### **Capítulo I:**

- Desenvolver e validar métodos analítico e bioanalítico para a quantificação do KPF em nanoemulsões, em amostras de permeação/retenção através mucosa nasal e em cérebros de ratos;
- Desenvolver nanoemulsões contendo KPF e caracterizá-las quanto às propriedades físicas, químicas e físico-químicas;
- Estimar a distribuição cerebral do KPF após administração intranasal das nanoemulsões em ratos Wistar;
- Avaliar a atividade citotóxica do KPF incorporado nas nanoemulsões desenvolvidas em linhagem celular de glioblastoma multifome (C6);

### **Capítulo II:**

- Realizar uma revisão com análise descritiva e quantitativa da literatura existente que utilizou a abordagem de dispersões sólidas para a melhoria da dissolução e biodisponibilidade oral de flavonoides.
- Selecionar o melhor carreador e desenvolver dispersões sólidas para administração oral contendo KPF;
- Caracterizar as dispersões sólidas através de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar o perfil de dissolução das dispersões desenvolvidas;
- Realizar estudo de farmacocinética da formulação otimizada em comparação ao KPF.



**REVISÃO DA LITERATURA**

---



## KAEMPFEROL

Flavonoides são metabólitos secundários caracterizados pela estrutura difenilpropano, consistindo em dois anéis benzeno unidos por uma cadeia linear de três carbonos (C6-C3-C6). Na maioria dos casos, os três carbonos formam um anel pirano fechado, formando assim uma estrutura de 15 átomos de carbono, compondo três anéis, denominados A, B e C, representado na Figura 1. As classes de flavonóides diferem no grau de oxidação e no padrão de substituição do anel C, enquanto que os compostos dentro de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B. Dependendo das variações no anel heterocíclico C, os flavonóides podem ser divididos em subclasses: flavonas (apigenina, luteolina), flavonóis (quercetina, kaempferol, miricetina), flavanonas (naringenina, hesperitina), flavanonóis (taxifolin), flavanóis ou catequinas (catequina, epicatequina, epigallocatequina), isoflavonas (genisteína, daidzeína, glicetina), antocianinas e antocianidinas (cianidina, pelargonidina, petunidina) (YAO *et al.*, 2004; KUMAR e PANDEY, 2013).

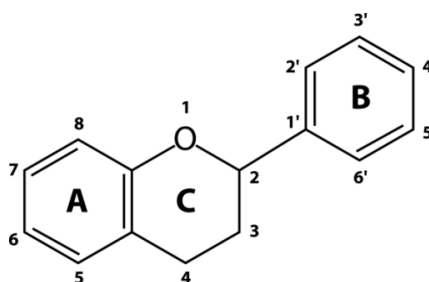


Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides (KUMAR e PANDEY, 2013).

Estes compostos polifenólicos são amplamente encontrados em plantas e constituem grande parte da dieta humana, como frutas e vegetais (AHERNE e O'BRIEN, 2002; ROSS e KASUM, 2002). Além de suas funções fisiológicas nas plantas, os flavonoides apresentam diversas atividades terapêuticas, como forte atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa, hepatoprotetora, antibacteriana, dentre outras (YAO *et al.*, 2004; KUMAR e PANDEY, 2013).

O flavonoide Kaempferol (KPF, *3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one*), Figura 2, é um composto de coloração amarela com baixo peso

molecular (PM 286,2 g/mol), encontrado em diversas espécies de plantas, abundantemente encontrado na dieta humana (brócolis, maçã, morango, feijão, uva, etc) e em plantas medicinais (por exemplo, *Aloe vera*, *Ginkgo biloba*, *Rosmarinus officinalis*, *Crocus sativus* L., *Hypericum perforatum* L., *Equisetum spp.*) (MIEAN e MOHAMED, 2001; SULTANA e ANWAR, 2008; YANG *et al.*, 2008; CALDERON-MONTANO *et al.*, 2011). Em plantas, açúcares, tais como rutinose, ramnose, glicose e galactose podem estar ligados ao kaempferol para produzir a forma glicosídica do kaempferol, como por exemplo, astragalina (kaempferol-3-O-glucoside), onde somente uma enzima é necessária ao final de sua biossíntese (flavonol 3-O-glucosyltransferase), sendo esta enzima amplamente encontrada no reino vegetal (CALDERON-MONTANO *et al.*, 2011).

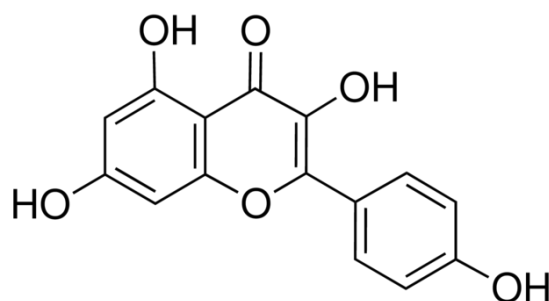


Figura 2. Estrutura química do kaempferol (CHEN e CHEN, 2013).

Após a administração oral de 100 e 250 mg/kg de KPF em ratos, o  $t_{\max}$  foi observado entre 1 e 1,5 horas seguido por um declínio constante até 6h. Observou-se baixa a moderada absorção, com baixa biodisponibilidade relativa (~2%) e extenso metabolismo de primeira passagem (BARVE *et al.*, 2009). Kaempferol é comumente metabolizado em formas metil, sulfato ou glicuronídeo (BARVE *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010). Em um estudo onde avaliaram a permeabilidade intestinal de flavonoides em modelo de células Caco-2, verificou-se que KPF possui boa permeabilidade intestinal e que a taxa de transporte é controlada por gradiente de concentração (YANG *et al.*, 2014).

Amidon et al. classificou insumos farmacêuticos ativos (APIs, do inglês, *active pharmaceutical ingredient*) em 4 grupos com base em sua solubilidade e permeabilidade, conhecido como Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS, do inglês, *Biopharmaceutics Classification System*), sendo uma ferramenta útil para a tomada de decisão no desenvolvimento de formulações do ponto de vista biofarmacêutico (AMIDON *et al.*, 1995). Este flavonoide é classificado como categoria II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, uma vez que possui baixa solubilidade e alta permeabilidade, tendo a biodisponibilidade oral limitada pela etapa de dissolução (AMIDON *et al.*, 1995; TIAN *et al.*, 2009; MERCADER-ROS *et al.*, 2010; XIE *et al.*, 2014). O log P (coeficiente de partição entre a solubilidade em octanol e água) do KPF foi calculado em aproximadamente 3,11 (ROTHWELL *et al.*, 2005).

Mesmo sendo evidente a necessidade de melhorar a biodisponibilidade oral do kaempferol, pouco se tem investigado no que se refere ao desenvolvimento de formulações orais contendo kaempferol. Na maioria dos estudos, foram desenvolvidas formulações sólidas contendo extratos vegetais, os quais apresentavam kaempferol em suas composições, como *Ginkgo biloba* (CHEN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2015), persimmon leaf (LI *et al.*, 2011), e *Hippophae rhamnoides* L. (ZHAO *et al.*, 2013; DUAN *et al.*, 2016). Tzeng et al. (TZENG *et al.*, 2011), com o desenvolvimento de nanopartículas, verificou aumento da dissolução e melhora na atividade antioxidante quando comparado ao kaempferol livre. Zhang et al. (ZHANG, K. *et al.*, 2015) e Telang et al. (TELANG *et al.*, 2016) realizaram a complexação do kaempferol com fosfolipídios e ambos demonstraram aumento na solubilidade, dissolução e biodisponibilidade oral em ratos.

Dados epidemiológicos sugerem que o alto consumo de alimentos contendo KPF pode reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diversos tipo de câncer, como câncer de pulmão, pâncreas e ovário (LIN *et al.*, 2007; NOTHLINGS *et al.*, 2007; CUI *et al.*, 2008; GATES *et al.*, 2009). Entretanto, o número relativamente baixo de estudos e a presença de outros compostos potencialmente bioativos presentes nos alimentos faz com que esses dados sejam insuficientes para se ter uma conclusão sobre a relação do consumo e efeito protetor do

KPF. Diversos estudos experimentais, no entanto, mostram que KPF possui amplas atividades biológicas, envolvendo tanto a prevenção quanto o tratamento dessas e outras doenças (CALDERON-MONTANO *et al.*, 2011; RAJENDRAN *et al.*, 2014).

Embora diversos estudos *in vitro* e pré-clínicos tenham sido realizados com o KPF, até o presente momento, não foram encontrados ensaios clínicos (fases I, II, III e IV) com o KPF livre. Ensaios clínicos foram desenvolvidos com plantas ou extratos vegetais que continham KPF ou seus glicosídeos em suas composições (VAN DONGEN *et al.*, 2000; HAUNS *et al.*, 2001; PICON *et al.*, 2010; ATTIA *et al.*, 2012; BARTON *et al.*, 2013; SALES *et al.*, 2014).

Tanto na sua forma aglicona quanto na de seus glicosídeos, o KPF apresenta atividade antioxidante não somente *in vitro*, mas também *in vivo*. Diversos mecanismos para sua ação antioxidante foram relatados, podendo reagir com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl, superóxido e óxido nítrico, prevenir peroxidação lipídica, inibir enzimas como xantina oxidase e aumentar a expressão ou atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e heme oxigenase-1 (CALDERON-MONTANO *et al.*, 2011; RAJENDRAN *et al.*, 2014; DEVI *et al.*, 2015).

Diversos mecanismos explicam o efeito anti-inflamatório do KPF, como a inibição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e expressão de IL-8. Além disso, KPF é potente inibidor das enzimas COX-1 e COX2 (LEE e KIM, 2010; LEE *et al.*, 2010; DEVI *et al.*, 2015).

O KPF induz morte celular em diferentes tecidos neoplásicos (pulmão, mama, cólon, próstata, fígado, pâncreas, pele, esôfago, cérebro e ovário) principalmente por apoptose, e os mecanismos envolvidos neste processo estão sendo elucidados (CALDERON-MONTANO *et al.*, 2011). KPF também possui ação antimetastática em linhagens de câncer de mama e é capaz de interromper a progressão do ciclo celular em células de câncer de colo (CHO e PARK, 2013; LEE *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015). Outro mecanismo que pode explicar sua ação antineoplásica é pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BARVE *et al.*, 2009; CALDERON-MONTANO *et al.*, 2011).

Em gliomas, além de inibir a invasividade e migração das células, o KPF induz apoptose celular através da geração de ROS, (SHARMA *et al.*, 2007) sensibiliza células ao TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*)



(SIEGELIN *et al.*, 2008), dentre outras vias (JEONG *et al.*, 2009; NAKATSUMA *et al.*, 2010; SEIBERT *et al.*, 2011).

Kaempferol é capaz de sensibilizar células cancerígenas aos efeitos citotóxicos de fármacos como doxorrubicina (SHARMA *et al.*, 2007), cisplatina (LUO *et al.*, 2010), 5-fluorouracil (ZHANG *et al.*, 2008), citarabina (NADOVA *et al.*, 2007), mitoxantrona e o metabolito ativo do irinotecano (SN-38) (IMAI *et al.*, 2004), podendo ter aplicações clínicas como adjuvante terapêutico no tratamento de neoplasias. Além disso, KPF causa menos efeitos adversos em comparação aos fármacos antineoplásicos disponíveis (CHEN e CHEN, 2013).

Este flavonoide também é capaz inibir a enzima CYP3A4 do citocromo p-450 e de inibir o efluxo de fármacos pela glicoproteína P (gp-P) (PATEL *et al.*, 2004). Estudos avaliaram a prévia administração de KPF a administração dos antineoplásicos tamoxifeno e etoposídeo e verificaram um aumento da biodisponibilidade destes, comprovando a inibição da gp-P e CYP3A4 pelo KPF (PIAO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009).

Ao atingir a circulação sistêmica, os compostos que atuam como moduladores da função cerebral precisam atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) para atingir o SNC (ALAM *et al.*, 2010). No entanto, a distribuição sistêmica e a penetração cerebral de flavonoides e seus metabólitos ainda não são bem compreendidas. Apenas um número limitado de estudos sobre a permeabilidade intestinal e cerebral do KPF foram publicados. Barrington *et al.* (2009) mostraram que, nas células Caco-2, o KPF sofre extenso metabolismo de fase 2, formando conjugados de sulfato e glicuronídeo, e que apenas uma pequena fração de KPF não conjugada penetra nas monocamadas de células Caco-2 (BARRINGTON *et al.*, 2009). Rangel-Ordóñez *et al.*, (2010) relataram a distribuição cerebral em ratos após a administração oral de extrato de *Ginkgo biloba*, demonstrando que o KPF é capaz de atravessar a BHE (RANGEL-ORDONEZ *et al.*, 2010). Recentemente, Yang *et al.* (2014) e Moradi-Afrapoli *et al.* (2016) relataram a permeação do KPF em modelo de BHE e em células Caco-2 (YANG *et al.*, 2014; MORADI-AFRAPOLI *et al.*, 2016). Contudo, pouco se sabe sobre os perfis farmacocinéticos do KPF no cérebro, o que é provavelmente devido à baixa

quantidade cerebral acumulada de KPF, tendo em vista o efeito protetor da BHE, que limita a entrada de KPF no tecido cerebral (ZHANG, Q. *et al.*, 2015).

Portanto, é de suma importância a elaboração de estratégias para aumentar a biodisponibilidade oral, bem como facilitar a entrada do KPF ao SNC.

## VIA NASAL

Tradicionalmente, os produtos nasais comercializados são para o tratamento local de doenças das vias respiratórias, como infecções, congestão e alergias na cavidade nasal. Entretanto, nas últimas décadas, um grande interesse nessa via de administração surgiu devido à possibilidade de veiculação de fármacos com problemas de aplicação pelas vias usuais (oral, tópica ou parenteral), e ao potencial desta via para o transporte de fármacos da cavidade nasal diretamente ao SNC, contornando a BHE. Isto é especialmente de interesse, não só para tratamento de doenças crônicas neurodegenerativas do SNC, tais como doença de Parkinson e doença de Alzheimer, câncer, psicose, depressão, mas também para o tratamento mais rápido de enxaqueca e dores de cabeça (ROMEO *et al.*, 1998; ILLUM, 2012).

A cavidade nasal humana, representada na Figura 3, é dividida verticalmente, em quase toda a sua extensão, pelo septo nasal, sendo cada cavidade nasal dividida em três regiões: o vestíbulo nasal, a região respiratória e a região olfatória (ILLUM, 2000). O vestíbulo nasal corresponde à porção anterior e é constituída por uma área de  $0,6 \text{ cm}^2$ , epitélio escamoso e rico em pelos, com a finalidade de filtração do ar durante a inalação. A região respiratória é a maior área superficial com cerca de  $130 \text{ cm}^2$ , maior grau de vascularização e é a principal região responsável pela absorção sistêmica através da mucosa nasal. A região respiratória inclui três estruturas: o corneto superior, médio e inferior. Essas estruturas são revestidas com epitélio respiratório, composto por células colunares ciliadas e não ciliadas, células basais e células globulares, responsáveis pela produção de muco (células de globet). A mucosa respiratória também é rica em células dendríticas importantes para a resposta imune local. Por fim, a região olfatória, com uma área de aproximadamente  $10 \text{ cm}^2$ , localiza-se na porção superior medial, logo abaixo da placa cribiforme do osso etmóide que

separa as duas cavidades nasais do cérebro. A camada epitelial olfativa contém predominantemente três tipos de células: células neurais olfativas, células de sustentação e células basais. As células basais são as células progenitoras que também proporcionam suporte mecânico aderindo às outras células. As células neurais olfativas ou os axônios são desmielinizados e intercalam-se entre as células de suporte. Eles se originam no bulbo olfatório no SNC e terminam na superfície apical do epitélio olfatório. Abaixo das camadas epiteliais olfatórias, encontra-se a lâmina própria, que contém vasos sanguíneos, glândulas secretoras de muco (glândulas de Bowman) e um suprimento neuronal constituído por feixes de axônios olfativos, fibras nervosas autonômicas e o ramo maxilar do nervo trigêmeo. Estes nervos são responsáveis pelo transporte de fármacos da cavidade nasal para o SNC ao longo da via neural. A vascularização sanguínea é essencialmente arterial a partir das ramificações da carótida, evitando, assim, o metabolismo de primeira passagem (ROMEIO *et al.*, 1998; ILLUM, 2000; VYAS *et al.*, 2005; MISRA e KHER, 2012). O "neuroepitélio" olfativo é a única parte do SNC que está em contato direto com o ambiente externo (PARDESHI e BELGAMWAR, 2013).

Tanto o epitélio olfatório quanto o respiratório na cavidade nasal são fortemente ligados por junções intercelulares que circundam as células epiteliais. O diâmetro das *tight junction*, das células epiteliais nasais possuem entre 3,9 e 8,4 Å e, mesmo com o uso de promotores de absorção, o diâmetro máximo alcançado quando aberto é de 15 nm (COSTANTINO *et al.*, 2007). Assim, obviamente, mesmo que uma *tight junction* esteja aberta, não será permitida a passagem paracelular de nanopartículas, geralmente utilizadas na administração nasal, com diâmetro entre 50 e 500 nm (CASETTARI e ILLUM, 2014).

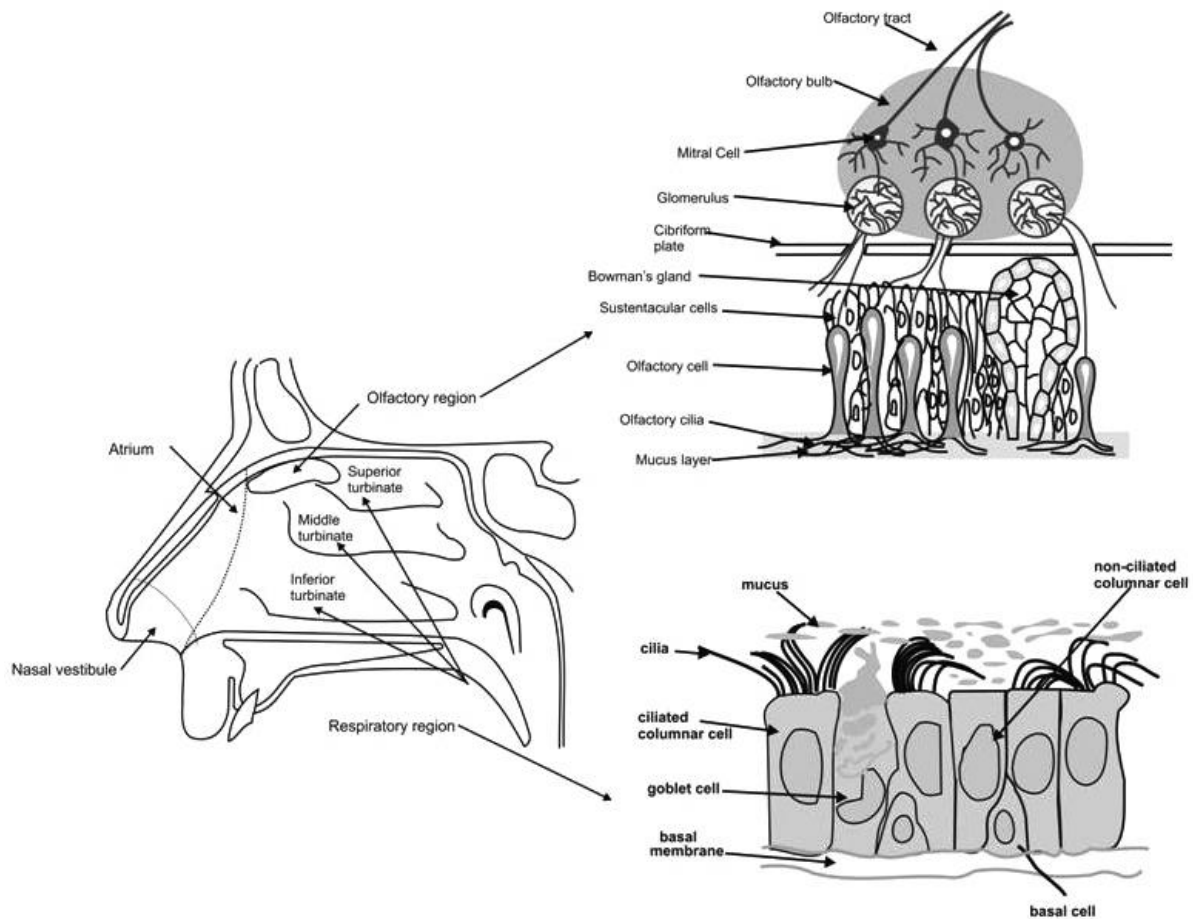


Figura 3. Anatomia da cavidade nasal (MISRA e KHER, 2012).

Assim, a via de administração nasal vem se mostrando uma importante alternativa às demais vias de administração por diversas razões: via não invasiva; entrega direta do fármaco ao cérebro de agentes terapêuticos com baixa ou nenhuma absorção cerebral após administração sistêmica, evitando a limitação imposta pela BHE; evita o metabolismo de primeira passagem, que poderia diminuir a porção de fármaco ativo; possibilidade da utilização de baixas doses com a diminuição dos possíveis efeitos adversos; possibilidade de autoadministração. O fármaco consegue alcançar o cérebro diretamente através da região olfatória e/ou ramificações do nervo trigêmeo, ou indiretamente, onde a porção de fármaco absorvido que atingir a circulação sistêmica pode alcançar a região cerebral se conseguir transpor à BHE (Figura 4) (ALAM *et al.*, 2010; KOZLOVSKAYA *et al.*, 2014; COMFORT *et al.*, 2015).

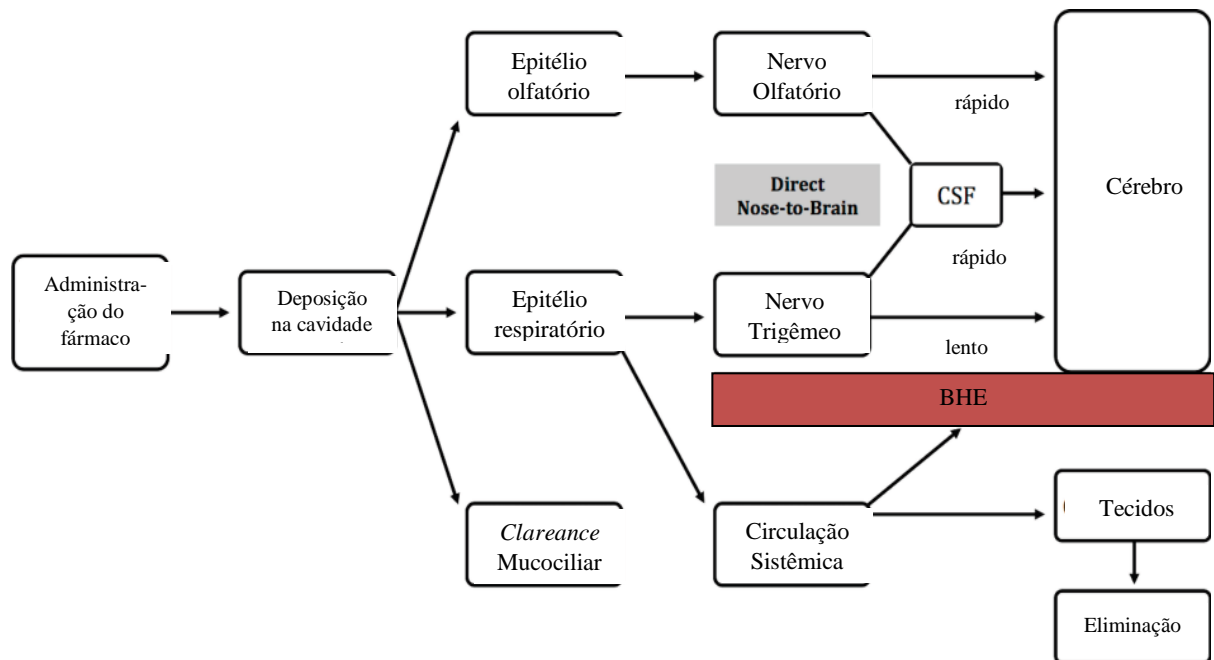


Figura 4. Vias de direcionamento cerebral após administração nasal. CSF: fluido cérebro espinhal. Adaptado de (COMFORT *et al.*, 2015).

Apesar das vantagens já apresentadas da via nasal, há algumas barreiras que limitam a absorção de fármacos, como o *clearance* mucociliar, que pode remover o ativo da cavidade nasal. O muco é uma secreção com papel de lubrificação e proteção, constituída por aproximadamente 95% de água, 2% de mucina, 1% de sais, 1% de outras proteínas, tais como albumina, imunoglobulinas, lisozimas e lactoferrina, e menos de 1% de lipídios. O pH das secreções mucosas varia de 5,5 a 6,5 em adultos e 5,0 e 6,7 em crianças. Em geral, a camada de muco da cavidade nasal é continuamente propelida com taxa de fluxo na faixa de 5 a 6 mm/min, sendo totalmente renovada a cada 15 – 20 min (ILLUM, 2003; MISRA e KHER, 2012; CASETTARI e ILLUM, 2014).

Também existe a possibilidade de degradação enzimática do fármaco pelas enzimas presentes na cavidade nasal, como isoformas da enzima citocromo P450 (CYP1A, CYP2A e CYP2E), carboxilesterases e glutionas S-transferases. Tal ocorrência é descrita como sendo um pseudo efeito de primeira passagem (MISRA e KHER, 2012).

Ainda, a transposição de dados experimentais de animais para seres humanos deve ser tratada com cautela, visto que há grandes diferenças anatômicas entre eles. Os roedores são respiradores nasais obrigatórios, enquanto os primatas são respiradores oronasais. A cavidade nasal em ratos é mais complexa do que em seres humanos e possui maior relação superfície-volume. Cavidades nasais em camundongos, ratos e humanos apresentam um volume de 0,032, 0,26 e 25 cm<sup>3</sup>, respectivamente (VAN WOENSEL *et al.*, 2013). Kozlovskaya e colaboradores realizaram uma revisão com publicações entre 1970–2014, que abordavam o tema de liberação cerebral através da administração intranasal, e verificaram que a maioria dos estudos foram realizados em ratos (78,4%) ou camundongos (16,2%), seguido por coelhos (4,1%) e humanos (1,4%) (KOZLOVSKAYA *et al.*, 2014).

Pelas limitações apresentadas, para aumentar a eficácia e o potencial de transporte de fármacos aplicados na cavidade nasal ao cérebro, o desenvolvimento de formulações, como nanoemulsões, torna-se interessante, visto que elas podem aumentar a estabilidade do composto ativo frente à possível degradação e até mesmo oferecer maior especificidade ao tecido alvo.

## **ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE NANOEMULSÕES**

Diversas estratégias vêm sendo estudadas para reduzir as limitações impostas pela mucosa nasal e fundamentam-se em aumentar o tempo de permanência do fármaco na cavidade nasal, aumentar sua absorção ou modificar sua estrutura para produzir propriedades físico-químicas mais favoráveis para a absorção nasal. As principais técnicas incluem inibição enzimática nasal, utilização de promotores de permeação, utilização de pró-fármacos e sistemas de liberação, como micropartículas, nanopartículas e nanoemulsões (ALAGUSUNDARAM *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas, a utilização de nanocarreadores oportunizou a incorporação de diversos agentes terapêuticos com limitações biofarmacêuticas, como baixa solubilidade ou alta degradabilidade, e também possibilitou a permeação através de barreiras biológicas, mostrando, assim, a potencialidade do emprego da

nanotecnologia para a liberação de fármacos ao cérebro (MODI *et al.*, 2010; KOZLOVSKAYA e STEPENSKY, 2013).

A absorção de fármacos pela mucosa nasal incorporados a nanossistemas pode ser decorrente da permeação do fármaco pela camada de células que compõem a cavidade nasal, bem como pela entrada das próprias nanopartículas. O tipo de revestimento da nanoestrutura também pode influenciar na absorção, o uso de quitosana, por exemplo, devido a sua capacidade de abrir as junções oclusivas, favorece a permeação dos ativos, bem como aumenta o tempo de permanência na cavidade nasal, devido às propriedades mucoadesivas (CASSETTARI e ILLUM, 2014).

Nesse sentido, as nanoemulsões tem se destacado, pois tem o potencial de aumentar a absorção de fármacos, aumentar a estabilidade da formulação e o tempo de retenção na cavidade nasal (SOOD *et al.*, 2014).

Nanoemulsões são sistemas heterogêneos compostos por gotículas de óleo de tamanho submicrométrico dispersas em um meio aquoso estabilizadas por tensoativos (Figura 5). O diâmetro de gotícula geralmente encontra-se entre 50 e 500 nm. Substâncias de reduzida hidrossolubilidade encontram-se dissolvidas no interior do núcleo oleoso e/ou adsorvidas na interface óleo/água das nanoemulsões. Possuem maior capacidade de solubilização do que dispersões micelares simples e maior estabilidade cinética do que as emulsões grosseiras (COMFORT *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2017).

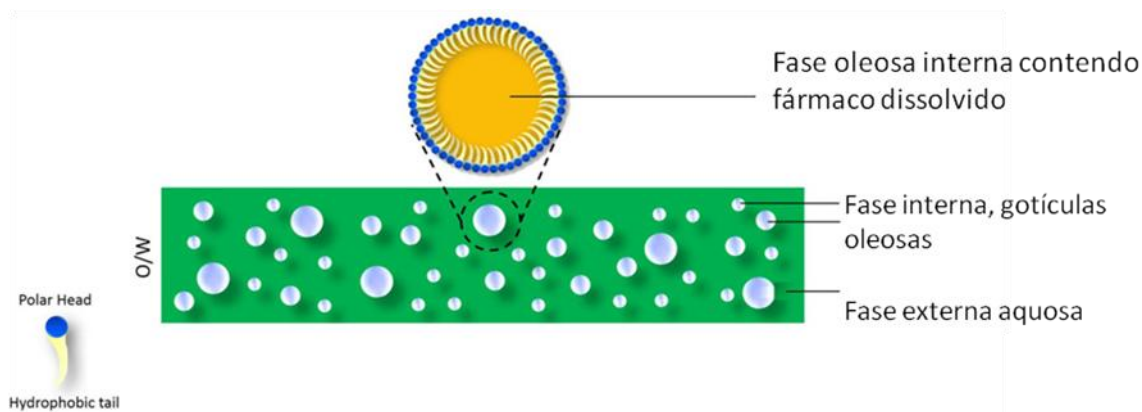


Figura 5. Estrutura de uma nanoemulsão. Adaptado de (SINGH *et al.*, 2017).

Alguns aspectos físico-químicos das nanoemulsões são essenciais para a sua estabilidade superior quando comparados com emulsões grosseiras. O tamanho das gotículas da fase dispersa permite que os movimentos brownianos e a taxa de difusão superem o efeito da força gravitacional que atua sobre o sistema, conduzindo a uma redução significativa de fenômenos tais como cremação, sedimentação e floculação durante o armazenamento. As propriedades do sistema também impedem a separação de fases por coalescência, uma vez que as gotículas não são facilmente deformáveis e a espessura significativa do tensoativo na superfície das gotas impede a instabilidade ou a ruptura do filme superficial que as separa. Embora as nanoemulsões tenham alta estabilidade, estão sujeitas a um aumento do tamanho das gotículas ao longo do tempo e, eventualmente, à sua ruptura, através do processo de maturação de Ostwald (TADROS *et al.*, 2004; SOLANS *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2017).

Nanoemulsões são sistemas de “não-equilíbrio” e, portanto, não podem ser formadas espontaneamente. Dois métodos principais são descritos para sua produção: os métodos de baixa energia e os de alta energia. Métodos de baixa energia utilizam as propriedades físico-químicas intrínsecas aos componentes, como auto-emulsificação (emulsificação espontânea), inversão de fase e temperatura de inversão de fase. Já os métodos por alta energia requerem equipamentos específicos para gerar intensas forças disruptivas, capazes de dispersar a fase oleosa e formar gotículas de tamanho nanométrico, como ultrassons, microfluidizadores e homogeneizadores de alta pressão, que são industrialmente escalonáveis (TADROS *et al.*, 2004; SOLANS *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2017).

Portanto, é importante otimizar as condições de emulsificação e homogeneização necessárias para a obtenção de nanoemulsões com estabilidade física. A seleção adequada dos componentes e do método de preparação é uma etapa crítica para o desenvolvimento de uma formulação estável e eficiente, devendo-se levar em consideração a via de utilização, solubilidade do fármaco, toxicidade e estabilidade.

Ainda, as nanoemulsões têm recebido crescente atenção para novas aplicações, como sistemas de administração para a liberação controlada de fármacos, administração dirigida de agentes antitumorais e vacinação através da mucosa (LOVELYN e ATTAMA, 2011). Elas podem ser utilizadas para administrar fármacos



hidrofílicos e lipofílicos, e são geralmente formulações não tóxicas e não irritantes. De fato, as nanoemulsões são geralmente fabricadas com baixas concentrações de tensoativos que são reconhecidos como seguro (*Generally Recognized As Safe*, GRAS) para consumo humano pelo FDA (*Food and Drug Administration*), tornando-os seguros para a administração enteral e através das mucosas (COMFORT *et al.*, 2015).

Além disso, as nanoemulsões apresentam grande área superficial e elevada energia livre, assegurando maior e mais rápida permeação de fármacos através das barreiras de absorção (epitélio intestinal, pele e superfícies mucosas). Conseqüentemente, há aumento da biodisponibilidade, não somente para fármacos pouco solúveis em água, mas também de peptídeos e proteínas. Outra vantagem das nanoemulsões é a proteção contra a hidrólise e a oxidação proporcionada pela encapsulação do fármaco nas gotículas dispersas (LU *et al.*, 2012; COMFORT *et al.*, 2015).

Diversos estudos descrevem a utilização de nanoemulsões para uso intranasal com objetivo de tratamento em distúrbios cerebrais, como nanoemulsões contendo risperidona, onde obteve-se um maior transporte e maior alcance do fármaco ao cérebro pela via de administração intranasal em ratos quando comparada a via intravenosa (KUMAR, MISRA, BABBAR, *et al.*, 2008). Resultados promissores também foram observados em estudos com tramadol (LALANI *et al.*, 2014), nitrendipino (JAIN e PATRAVALE, 2009), curcumina (SOOD *et al.*, 2014), sumatriptano (VYAS *et al.*, 2006), olanzapina (KUMAR, MISRA, MISHRA, *et al.*, 2008), saquinavir (MAHAJAN *et al.*, 2014), amilorida (JAIN *et al.*, 2011), tacrina (JOGANI *et al.*, 2008), zaleplon (HOSNY e BANJAR, 2013) e zidrasidona (BAHADUR e PATHAK, 2012). Notadamente, na maioria destes estudos, utilizou-se algum agente mucoadesivo, como a quitosana, e verificou-se que estes eram mais eficazes que as nanoemulsões simples para a liberação no SNC.

Apesar das vantagens da via nasal, há algumas barreiras que limitam a absorção de fármacos, como o mecanismo de depuração mucociliar que pode remover imediatamente a formulação da cavidade nasal, além da baixa permeabilidade do seu epitélio que dificulta a absorção de fármacos polares ou de alto peso molecular

(ILLUM, 2003; MAINARDES et al., 2006). Uma estratégia para vencer estas barreiras é o emprego de sistemas mucoadesivos.

Quitosana é um polissacarídeo derivado da desacetilação da quitina, originária em sua maioria de conchas de crustáceos. Compreende unidades ordenadas aleatoriamente de 2-acetamida-2-desoxi-p-D-glicopiranosose (GlcNac) e 2-amino-2-desoxi-p-D-glicopiranosose (GlcN) (Figura 6) (CASETTARI e ILLUM, 2014).

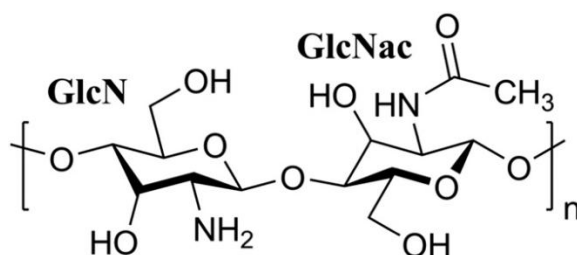


Figura 6. Estrutura química da quitosana (CASETTARI e ILLUM, 2014).

Esta substância contém aminas primárias, as quais se encontram positivamente carregadas na maioria dos fluidos fisiológico, sendo um dos polímeros mais estudados no campo da administração de fármaco através das mucosas (BERNKOP-SCHNURCH e DUNNHAUPT, 2012).

Quitosana é biocompatível, biodegradável (reconhecida como uma substância segura, GRAS) e apresenta propriedades mucoadesivas. Na administração intranasal, a utilização de quitosana na formulação aumenta o tempo de permanência na cavidade nasal. Além disso, tem a propriedade de abrir transientemente as *tight junctions* do epitélio, aumentando assim a permeabilidade de fármacos pela mucosa. (VAN WOENSEL *et al.*, 2013; CASETTARI e ILLUM, 2014). No pH fisiológico, a quitosana é capaz de interagir eletrostaticamente através dos seus grupos amino positivamente carregados, com ácido siálico e ésteres sulfatados, que apresentam carga negativa, presentes na camada de muco da mucosa nasal (KHUTORYANSKIY, 2011).

Sood e colaboradores (2014) relataram a utilização de quitosana em nanoemulsões contendo curcumina para administração intranasal. As formulações

desenvolvidas não apresentaram toxicidade e a adição de quitosana à nanoemulsão acarretou maior fluxo e permeação através da mucosa nasal (SOOD *et al.*, 2014).

Kumar e colaboradores (2008) demonstraram que os níveis de risperidona no cérebro de ratos foram significativamente maiores em todos os tempos de análise após administração intranasal de nanoemulsão contendo quitosana, em comparação a nanoemulsão sem agente mucoadesivo (KUMAR, MISRA, BABBAR, *et al.*, 2008). Resultados similares também foram encontrados pelo mesmo grupo de pesquisa com nanoemulsões contendo olanzapina (KUMAR, MISRA, MISHRA, *et al.*, 2008).

## **GLIOMAS**

Os gliomas são os tumores primários mais comuns e devastadores do sistema nervoso central (SNC) em adultos, correspondendo a cerca de 80% de todos os tumores desse sistema (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2007). Gliomas foram descritos pela primeira vez por Virchow (1863-1865) como um enorme tumor cerebral, normalmente com lenta evolução clínica e sem limitação em relação ao tecido não tumoral (SCHERER, 1940). Sua incidência é maior em homens caucasianos com idade superior a 40 anos (PREUSSER *et al.*, 2006; OSTROM *et al.*, 2014). Em estudo analisado entre 2005 e 2009 nos Estados Unidos, os gliomas apresentaram incidência anual de 5,26 para cada 100.000 habitantes (DOLECEK *et al.*, 2012).

Historicamente, os gliomas foram classificados pela semelhança morfológica em relação às células gliais, sugerindo que astrocitomas, por exemplo, tenham se originado de astrócitos ou de precursores astrocíticos. Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os gliomas em astrocitomas (grau I a IV), oligodendrogliomas (grau II e III), e oligoastrocitomas (grau II e III), sendo os gliomas de origem astrocítica classificados em quatro graus de malignidade (LOUIS *et al.*, 2007):

- Grau I: astrocitoma pilocítico, acometem principalmente crianças entre 5 e 15 anos, apresentam baixa capacidade invasiva e são facilmente removidos por ressecção cirúrgica;

- Grau II: astrocitoma de baixo grau, crescem de forma lenta, podendo ou não invadir o tecido cerebral normal adjacente;
- Grau III: astrocitoma anaplásico, são tumores recorrentes de neoplasias de baixo grau, apresentando uma taxa de crescimento maior e capacidade de invasão do tecido cerebral normal adjacente. Apresentam alta probabilidade de recorrência após o tratamento;
- Grau IV: glioblastoma multiforme (GBM), forma mais agressiva dos gliomas, alto grau de malignidade e alta capacidade de invasão.

O padrão atual de tratamento para pacientes com diagnóstico de GBM é tratamento com corticosteroides, ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e quimioterapia com o agente alquilante temozolomida (Temodal®). O prognóstico é péssimo, pois mesmo com o tratamento preconizado, a sobrevida do paciente é de 14,6 meses desde o diagnóstico (ROBINS *et al.*, 2009; VAN WOENSEL *et al.*, 2013). Estas estatísticas fazem com que os gliomas estejam entre as formas mais mortais de câncer. A baixa sobrevida dos pacientes com esse tipo de tumor, altamente invasivo, está relacionada, principalmente a alta taxa de recorrência, ainda inevitável quando emprega-se terapias convencionais (LOUIS *et al.*, 2007). Apesar de pesquisa intensiva e uma variedade de quimioterapias, radioterapias e abordagens cirúrgicas, o prognóstico para os pacientes com estes tumores não mudou significativamente nas últimas décadas.

A falha na terapia quimioterápica se deve principalmente à natureza infiltrante, heterogeneidade celular e molecular, ausência de especificidade terapêutica de fármacos citotóxicos, quimiorresistência intrínseca e à barreira hematoencefálica (BHE), que limita a entrada dos quimioterápicos no SNC (VAN MEIR *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2014). A BHE é normalmente apenas permeável a moléculas lipofílicas, com um peso molecular (Mw) inferior a 600 Dalton (Da) e o LogP, estimado em 1,5-2,7 para um transporte eficiente sobre a BHE (ILLUM, 2000; PAJOUHESH e LENZ, 2005).

Além da limitação imposta pela BHE, mecanismos de resistência a multidrogas estão presentes como, por exemplo, a glicoproteína-P, que reduz a passagem de

fármacos pelas células endoteliais que compõem a BHE, diminuindo também o acúmulo de fármacos nas células tumorais pelo efluxo para o meio extracelular, limitando assim a eficácia terapêutica (SZAKACS *et al.*, 2006).

Tendo em vista o péssimo prognóstico para os pacientes com glioblastoma e os poucos avanços significativos da terapêutica nas últimas décadas, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A administração de fármacos ao SNC através da via intranasal proporciona uma alternativa promissora aos métodos tradicionais e invasivos, permitindo que os fármacos contornem a BHE, proporcionando uma distribuição direta e rápida ao cérebro e redução dos efeitos secundários sistêmicos (DHURIA *et al.*, 2010).

Considerando as vantagens da administração intranasal para a entrega de fármacos ao cérebro, diversos estudos foram feitos com vistas ao tratamento de glioblastoma, utilizando substâncias como metotrexato (SHINGAKI *et al.*, 2010), temozolamida (LI *et al.*, 2014), curcumina (SHINDE e DEVARAJAN, 2017), inibidor da telomerase GRN163 (HASHIZUME *et al.*, 2008), parvovírus H-1 (KIPRIANOVA *et al.*, 2011), células tronco neurais (REITZ *et al.*, 2012), álcool perfílico (DA FONSECA *et al.*, 2011), dentre outros.

Nesse contexto, o desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo quitosana para uso intranasal visando à liberação de fármacos no SNC torna-se interessante. A veiculação inédita de KPF nesse sistema mostra-se promissora para o avanço do estado da arte no que se refere ao tratamento de glioblastoma multiforme.

## **ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DISPERSÕES SÓLIDAS**

A administração de fármacos por via oral é a via mais utilizada devido à facilidade de administração e alta adesão ao tratamento pelo paciente. Devido à maior estabilidade, menor volume, dosagem precisa e fácil produção, as formas farmacêuticas orais sólidas apresentam muitas vantagens em relação a outros tipos de formas de dosagem oral (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Quando um fármaco é administrado por via oral, ele deve atravessar certos pontos de controle, o que varia de fármaco para fármaco, dentro do sistema biológico, incluindo dissolução em fluidos gastrointestinais, permeação através da membrana do intestino, metabolismo de

primeira passagem, para então finalmente chegar ao seu local de ação via circulação sistêmica (CHARMAN e CHARMAN, 2002).

A baixa taxa de dissolução e solubilidade aquosa de moléculas farmacologicamente ativas é um de desafios no desenvolvimento farmacêutico e está se tornando mais comum entre os novos candidatos a fármacos nas últimas décadas devido ao uso de ferramentas de triagem de alto rendimento e combinação durante a descoberta e fase de seleção (LIPINSKI, 2000; LIPINSKI *et al.*, 2001).

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica um composto é pouco solúvel se a dosagem mais alta não for solúvel em 250 mL de meio aquoso nas faixas de pH 1-7,5 a 37°C (FDA, 2000). Estes compostos pertencem principalmente à Classe II, que são pouco solúveis e altamente permeáveis de acordo com o pH do fluido gastrointestinal, e tendem a apresentar absorção limitada pela dissolução (KAWABATA *et al.*, 2011). Apesar de sua alta permeabilidade, esses fármacos frequentemente apresentam baixa biodisponibilidade oral devido a sua lenta e limitada liberação no líquido gastrintestinal (VO *et al.*, 2013).

Neste contexto, várias abordagens (físicas, químicas e farmacotécnicas) para superar a baixa solubilidade aquosa de fármacos ou de candidatos a fármacos são empregadas (VASCONCELOS *et al.*, 2016). Abordagens químicas compreendem modificação molecular na estrutura do fármaco, como a inclusão de grupos polares ou ionizáveis, resultando na formação de um pró-fármaco e que podem apresentar diferente potência e perfil farmacocinético (VASCONCELOS *et al.*, 2007; SEO *et al.*, 2015). Outros exemplos incluem a formação de sais e co-cristais, mas sua aplicação é muito restrita. Os sais são viáveis apenas para ácidos fracos ou bases, e co-cristais geralmente não aumentam suficientemente a solubilidade do fármaco *in vivo* (SARKAR e ROHANI, 2015). O princípio básico por trás de todas as abordagens físicas é aumentar a área de superfície de contato através da redução do tamanho das partículas, resultando em cristais de tamanho micro ou nanométricos. A viabilidade desta abordagem nem sempre é adequada, uma vez que a redução tamanho do partícula acontece em torno de 2-5  $\mu\text{m}$ , o que frequentemente não é o suficiente para melhorar consideravelmente a solubilidade da fármaco. Além disso, apresenta limitações técnicas quanto ao controle granulométrico (VASCONCELOS *et al.*, 2007;

GOUTHAMI *et al.*, 2015). Por fim, estratégias farmacotécnicas consistem na produção de sistemas líquidos ou sólidos baseados em veículos lipídicos, poliméricos e/ou tensoativos (VASCONCELOS *et al.*, 2016). Neste contexto, diversas formulações são empregadas, como complexação com ciclodextrinas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas e dispersões sólidas (DS). Dentre essas, DS são consideradas uma das estratégias mais bem sucedidas para melhorar o perfil de dissolução de moléculas pouco solúveis (VO *et al.*, 2013).

O conceito de "dispersões sólidas" foi proposto pela primeira vez por Sekiguchie Obi, onde foi observado que misturas eutéticas melhoraram a taxa de liberação de fármacos pouco solúveis em água (SEKIGUCHI *et al.*, 1964). Desde então, diferentes técnicas e carreadores vem sendo estudados. Convencionalmente, DS são definidas como "dispersão de um ou mais insumo farmacêutico ativo (API) dispersos em uma matriz inerte". O princípio desta técnica consiste em dispersar o API hidrofóbico em um carreador hidrofílico, resultando no aumento da molhabilidade, diminuição do tamanho de partícula e/ou geração de forma amorfa do API com alta solubilidade aquosa aparente. Carreadores usados em dispersões sólidas normalmente são farmacologicamente inertes e podem interagir com o API por ligações físicas fracas, como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas para formar um complexo mais solúvel e, portanto, melhorar a solubilidade aquosa e, desse modo, a dissolução e biodisponibilidade oral do API (MENG *et al.*, 2015).

Dispersões sólidas foram pela primeira vez classificadas por Chiou e Riegelman que classificaram-nas em seis grupos: misturas eutéticas simples, soluções sólidas, soluções vítreas, suspensões vítreas, precipitações amorfas em carreador cristalino, formação de complexa e combinações dos cinco tipos anteriores (CHIOU e RIEGELMAN, 1971). Vasconcelos *et al.* (2007) classificaram-nas em três gerações (VASCONCELOS *et al.*, 2007), e, posteriormente, Vo *et al.* (2013), acrescentaram a esta classificação, dispersões sólidas de liberação controlada, sendo a quarta geração (VO *et al.*, 2013). A figura 7 ilustra a classificação das dispersões sólidas nas quatro gerações.

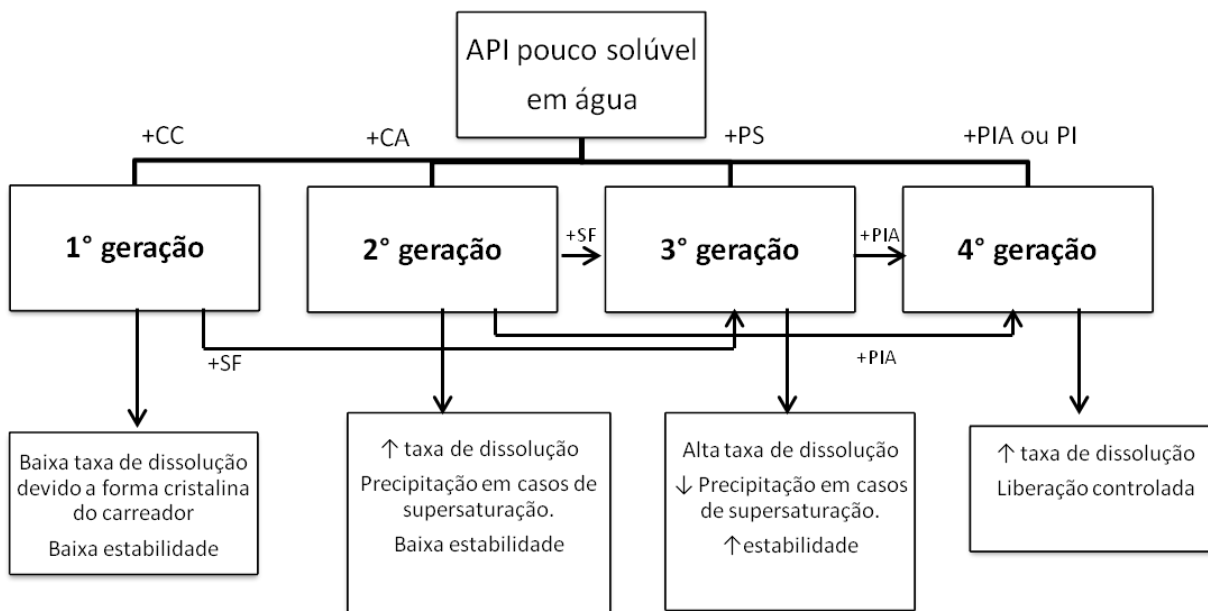


Figura 7. Composição e propriedades das quatro gerações de dispersões sólidas. CC: carreador cristalino; CA: carreador amorfo; PS: polímero surfactante; PIA: polímero insolúvel em água; PI: polímero intumescente; SF: surfactante. ↓: diminuição; ↑: aumento. Adaptado de VO *et al.* (2013).

A primeira geração é composta por dispersões sólidas cristalinas, onde o fármaco no estado cristalino é disperso em carreador também no estado cristalino, formando uma mistura eutética ou monotética. Em sistemas eutéticos, o fármaco e o carreador são completamente miscíveis no estado fundido e, após resfriamento, formam uma mistura com ponto de fusão inferior aquele do fármaco ou carreador. Já em sistemas monotéticos, o ponto de fusão do carreador e do fármaco são constantes (VO *et al.*, 2013). Os carreadores cristalinos incluem ureia e açúcares, como manitol, que foram os primeiros carreadores a serem empregados em dispersões sólidas. Eles têm a desvantagem de formar dispersões sólidas cristalinas, mais estáveis termodinamicamente, e assim, não liberaram o fármaco tão rapidamente quanto os carreadores amorfos (VASCONCELOS *et al.*, 2007; MISHRA *et al.*, 2015).

A segunda geração contém carreadores amorfos, geralmente polímeros, e formam dispersões sólidas amorfas. As dispersões sólidas amorfas podem ser classificadas em soluções sólidas amorfas (soluções vítreas) e suspensões sólidas amorfas de acordo com o estado físico do fármaco. Na solução sólida amorfa, o



fármaco e o carreador amorfo são completamente miscíveis para formar uma mistura molecularmente homogênea, enquanto que a suspensão sólida amorfa consiste em duas fases separadas. Suspensões sólidas amorfas são formadas quando o fármaco tem solubilidade limitada no carreador ou um ponto de fusão extremamente alto. Os principais polímeros utilizados nessa classe são polímeros totalmente sintéticos, como povidona (PVP), polietilenoglicóis (PEG) e polimetacrilatos; polímeros naturais como os derivados de celulose, como hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e hidroxipropilcelulose (HPC) (VO *et al.*, 2013; MISHRA *et al.*, 2015). Na DS de segunda geração, o fármaco está finamente disperso (a nível molecular, estado amorfo ou em pequenos cristais), e está no estado supersaturado devido à solubilização forçada no carreador, aumentando, assim, a molhabilidade e dispersibilidade do fármaco. Estas propriedades, juntamente com a taxa de dissolução rápida do carreador (baixa estabilidade termodinâmica), aumentam a solubilidade e a taxa de liberação do fármaco (VO *et al.*, 2013).

A dispersões sólidas de terceira geração são compostas por uma combinação de carreadores amorfos e, preferencialmente, por uma combinação de carreadores amorfos e tensoativos. A introdução de tensoativos ou emulsionantes em dispersões sólidas melhora não apenas o perfil de dissolução, mas também a estabilidade física e química do fármaco. Os tensoativos com estrutura anfifílica podem aumentar a miscibilidade dos fármacos e carreadores e, assim, reduzir a taxa de recristalização do fármaco. Além disso, são capazes de melhorar a molhabilidade dos fármacos e prevenir a precipitação do fármaco devido à supersaturação, absorvendo a camada externa das partículas do fármaco ou formando micelas para encapsular os fármacos. Os carreadores mais utilizados incluem poloxamer, gelucire 44/14, compritol 888 ATO e Soluplus®. Tensoativos, como o lauril sulfato de sódio (SLS), Tween 80 são utilizados como aditivos em dispersões sólidas (VO *et al.*, 2013; MISHRA *et al.*, 2015).

Por fim, a dispersão sólida de quarta geração é uma dispersão sólida de liberação controlada contendo fármacos pouco solúveis em água com uma meia-vida curta. Este tipo de dispersão possui dois alvos, aumento da solubilidade e liberação prolongada de maneira controlada, a qual é oferecida pelo emprego de polímeros

insolúveis ou que dissolvem lentamente em água ou polímeros intumescíveis, como Eudragit® (RS, RL), óxido de polietileno (PEO) e polímero carboxivinílico (Carbopol) (VO *et al.*, 2013).

As duas principais técnicas empregadas para preparar dispersões sólidas atualmente são os métodos de fusão e de evaporação do solvente. No método de fusão, o fármaco e o carreador são fundidos em uma temperatura acima do ponto de fusão e, em seguida, resfriado. Um pré-requisito importante para este método é que o fármaco e o carreador devem ser miscíveis e termoestáveis (LEUNER, C. e DRESSMAN, J., 2000). Tachibana e Nakamura (1965) foram os primeiros a dissolver o fármaco e o carreador num solvente comum e depois evaporar o solvente para produzir uma dispersão sólida (TACHIBANA e NAKAMURA, 1965). O principal pré-requisito é que tanto o carreador quanto o fármaco devem ser solúveis no solvente empregado. Nesse método, a decomposição de fármacos termolábeis pode ser evitada, pois a evaporação do solvente orgânico ocorre em baixas temperaturas. Contudo, possui a desvantagem de empregar solventes orgânicos (VASCONCELOS *et al.*, 2016).

Apesar do alto interesse na pesquisa, o número de dispersões sólidas comercializadas ainda é baixo. Este baixo número deve-se principalmente ao escalonamento para escala industrial, problemas e instabilidade físico-química durante a produção e armazenamento, como separação de fases e recristalização (VO *et al.*, 2013). Na tabela 1 estão apresentados alguns exemplos de dispersões sólidas disponíveis no mercado atualmente.

Tabela 1. Exemplos de dispersões sólidas disponíveis comercialmente.

<b>Nome</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Carreador</b>	<b>Ano de aprovação</b>
Cesamet®	Nabilone	PVP	1985 (FDA)
Sporanox®	Itraconazol	HPMC	1992 (FDA)
Prograf®	Tacrolimus	HPMC	1994 (FDA/MHRA)
Gris-PEG®	Griseofulvina	PEG	2000 (FDA)
Crestor®	Rosuvastatina	HPMC	2004 (EMA) 2002 (FDA)
Cymbalta®	Duloxetine	HPMCAS	2004 (EMA/FDA)
Kaletra®	Lopinavir/ Ritonavir	PVP-VA	2005 (FDA) 2001(EMA)
Fenoglide®	Fenofibrato	PEG/Polaxamer188	2010 (FDA)
Novir®	Ritonavir	PVP-VA	2010 (FDA) 2009 (EMA)
Zelboraf®	Vemurafenib	HPMCAS	2012 (EMA) 2011 (FDA)
Viekira® (EUA)/ Viekirax® (UE)	Ombitasvir/ Paritaprevir/ Ritonavir	PVP-VA/TPGS	2014 (EMA/FDA)
Orkambi®	Lumacaftor/Ivacaftor	HPMCAS/SLS	2015 (EMA/FDA)

HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; HPMCAS: succinato do acetato de hidroxipropilmetilcelulose; PEG: polietilenoglicol; PVP: polivinilpirrolidona; PVP-VA: polivinilpirrolidona vinil acetato; SLS: Lauril sulfato de sódio; TPGS: succinato de d- alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 EUA: Estados Unidos; UE: União Europeia; EMA: European Medicines Agency; FDA: Food and Drug Administration; MHRA: Medicines and Health Products Regulatory Agency.

Fonte: VASCONCELOS et al (2016).

A utilização de formulações a base de dispersões sólidas de flavonoides vem sendo empregada a fim de aumentar a solubilidade, dissolução e/ou biodisponibilidade

destas moléculas. Khan et. al (2015) desenvolveram dispersões sólidas contendo naringenina e Soluplus® e demonstraram aumento significativo da solubilidade do flavonoide, bem como melhora no perfil de dissolução e aumento significativo da ASC (área sob a curva) em estudos farmacocinéticos em comparação a naringenina livre (KHAN *et al.*, 2015). Kakran. e Sahoo (2011) realizaram a comparação de diferentes estratégias (complexação com ciclodextrinas, nanopartículas e dispersões sólidas) para melhorar a dissolução da quercetina e verificaram que na menor concentração de carreadores, as dispersões sólidas apresentaram melhor dissolução do que as demais estratégias, entretanto em maior concentração, não houve diferença significativa no perfil de dissolução das três formulações (KAKRAN *et al.*, 2011). Kanaze et al. (2006) desenvolveram dispersões sólidas de polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG) com os glicosídeos naringina e hesperidina, e suas agliconas, naringenina e hesperetina, pelo método de evaporação por solvente e a dissolução destes atingiu 100% após 2 h usando PVP como carreador, enquanto no caso do PEG, o valor foi um pouco menor. Além disso, verificaram através de espectros de FTIR, presença de ligações de hidrogênio entre grupos carbonila do PVP com grupos hidroxila de ambas agliconas, as quais impedem a cristalização, já com o emprego do PEG, tanto glicosídeos quanto agliconas permaneceram principalmente na forma cristalina (KANAZE et al., 2006).

Uma revisão completa sobre a utilização de dispersões contendo flavonoides encontra-se no capítulo II, artigo I, da presente tese.

Uma vez que o preparo de dispersões sólidas tem contribuído para gerar resultados promissores na biodisponibilidade de muitos flavonoides, torna-se interessante o desenvolvimento de dispersões sólidas contendo kaempferol, tendo-se em vista sua baixa hidrossolubilidade e baixa biodisponibilidade oral.

## **CAPÍTULO I**

---

**Desenvolvimento de nanoemulsões contendo kaempferol para administração intranasal e avaliação da atividade citotóxica em glioma**



O Capítulo I é constituído por dois artigos científicos publicados, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 65 – 125.

Colombo, M., de Lima Melchiades, G., Figueiró, F., Battastini, A. M. O., Teixeira, H. F., & Koester, L. S. (2017). Validation of an HPLC-UV method for analysis of Kaempferol-loaded nanoemulsion and its application to in vitro and in vivo tests. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 145, 831-837. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.046>

Colombo, M., Figueiró, F., de Fraga Dias, A., Teixeira, H. F., Battastini, A. M. O., & Koester, L. S. (2018). Kaempferol-loaded mucoadhesive nanoemulsion for intranasal administration reduces glioma growth in vitro. *International journal of pharmaceutics*, 543(1-2), 214-223. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.055>















































































































































## **CAPÍTULO II**

---

**Desenvolvimento de dispersões sólidas contendo kaempferol para administração oral**





O texto completo do capítulo II, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 131 – 205, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico, onde uma revisão sistemática foi realizada sobre a utilização de dispersões sólidas como estratégia para melhorar o perfil de dissolução e biodisponibilidade de flavonoides; e de um artigo científico publicado, conforme referência abaixo.

Colombo, M., de Lima Melchiades, G., Michels, L.R. Figueiró, F., Bassani, V.L., Teixeira, H. F., & Koester, L. S. (2017). *Solid Dispersion of Kaempferol: Formulation Development, Characterization, and Oral Bioavailability Assessment*. *AAPS PharmSciTech* (2019) 20: 106. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1318-y>  
solubility, dissolution, bioavailability.













































































































































































**DISCUSSÃO GERAL**

---





A baixa expectativa de vida dos pacientes diagnosticados com GBM está diretamente relacionada à falha da quimioterapia convencional (ALIFIERIS e TRAFALIS, 2015). A baixa resposta a terapia se deve principalmente à natureza infiltrante, ausência de especificidade terapêutica e a presença da BHE, que limita a entrada dos quimioterápicos no SNC (VAN MEIR *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2014). Ainda, existem mecanismos de resistência a multidrogas como, por exemplo, a ação da glicoproteína-P que reduz a passagem de fármacos pelas células endoteliais que compõe a BHE e também diminui o acúmulo de fármacos dentro das células tumorais pelo efluxo para o meio extracelular, com consequente diminuição da eficácia terapêutica (SZAKACS *et al.*, 2006).

Neste contexto, buscam-se estratégias capazes de aumentar a biodisponibilidade dos quimioterápicos no SNC, onde se destaca a via de administração intranasal, bem como a utilização sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos.

O capítulo I da presente tese teve como premissa o fato de o KPF ter atividade contra linhagens celulares de glioma já descrita na literatura (SHARMA *et al.*, 2007; JEONG *et al.*, 2009; NAKATSUMA *et al.*, 2010; SEIBERT *et al.*, 2011). Entretanto, as baixas hidrossolubilidade e biodisponibilidade do KPF limitam sua utilização terapêutica (BARVE *et al.*, 2009). O desenvolvimento de formas farmacêuticas para melhorar tais características torna-se fundamental para que este flavonoide possa ser um candidato quimioterápico para o tratamento de glioblastoma. Assim, buscou-se investigar o efeito de sua veiculação em nanoemulsões, já que sistemas nanoestruturados estão atraindo cada vez mais atenção para tratamento de neoplasias, bem como sua administração intranasal.

Os métodos analíticos, empregados para a determinação quantitativa de fármacos em amostras biológicas e em formas farmacêuticas, podem influenciar a avaliação e interpretação dos resultados do desenvolvimento e controle de qualidade da forma farmacêutica, bem como dos dados farmacocinéticos. Portanto, é essencial empregar métodos analíticos validados, seguindo os guias de validação internacionais, para a obtenção de resultados confiáveis (FDA, 1994; ICH, 2005; EMA, 2011; FDA, 2013).

Neste contexto, o primeiro passo para a elaboração dessa tese foi a validação da metodologia analítica e bioanalítica. No capítulo I, artigo I, desenvolveu-se um método de cromatografia líquida de alta eficiência, que requer apenas um sistema de solvente binário, contendo água acidificada e metanol, além de fornecer um rápido tempo de análise. Inicialmente, realizou-se a validação analítica em cada tipo de amostra onde o KPF seria quantificado, ou seja, nanoemulsão, mucosa nasal suína e fluido receptor nos experimentos de permeação/retenção, e cérebros de ratos para o estudo preliminar de biodistribuição cerebral. Como pode ser observado nos cromatogramas da Figura 1 (Capítulo I, artigo I), os componentes das matrizes não afetaram a quantificação do KPF. Além disso, o método demonstrou ser linear, preciso, exato e robusto, obteve-se baixos limites de quantificação (0,1 a 0,2 µg/mL), demonstrando a sensibilidade do método. Por fim, verificou-se a aplicabilidade do método nos experimentos de permeação/retenção bem como de quantificação do KPF em cérebros de ratos após administração intranasal. Assim, garante-se que o método cumpriu todos os requisitos de validação analítica e bioanalítica do guias internacionais já citados e se mostrou adequado para a consecução para os estudos subsequentes.

O interesse da veiculação de polifenóis em nanopartículas para a liberação cerebral após administração intranasal é recente e crescente, como em estudos com rutina (AHMAD *et al.*, 2016), quercetina (AHMAD *et al.*, 2017), curcumina (WANG *et al.*, 2012; SOOD *et al.*, 2014; SHINDE e DEVARAJAN, 2017), resveratrol (PANGENI *et al.*, 2014), associação de curcumina e resveratrol (NASR, 2016), própolis (RASSU *et al.*, 2015) e ácido rosmarínico (BHATT *et al.*, 2015). Entretanto, até o início do desenvolvimento da presente tese, não haviam sido descritos na literatura estudos que avaliassem a liberação de KPF pela via intranasal, seja livre ou veiculado em um nanocarreador.

Em sequência, foram desenvolvidas duas nanoemulsões, uma sem agente mucoadesivo (KPF-NE) e outra contendo quitosana (KPF-MNE). Para a escolha da composição da nanoemulsão de partida, um planejamento Box-Behnken com três fatores e três níveis foi realizado através do Software Minitab® 16. As variáveis de entrada (independentes) foram: concentração de lecitina de ovo (2, 3,5 e 5%), triglicerídeos de cadeia média (8, 14 e 20%) e polissorbato 80 (1, 2 e 3%) (Tabela 1

em Anexo). As variáveis de resposta analisadas (dependentes) foram tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de KPF. Na totalidade, quinze formulações foram desenvolvidas e analisadas (Tabela 2 em Anexo). Por meio da otimização da formulação dada pelo software, a composição final da formulação foi 5% de lecitina de ovo, 14,88% de triglicerídeos de cadeia média e 1% de polissorbato 80 (Figura 1 em Anexo). Entretanto, optou-se por não adicionar essa etapa de otimização do trabalho ao artigo II do Capítulo I, pois ao realizarmos a análise estatística dos resultados, somente a variável polissorbato 80 em relação ao índice de polidispersão foi significativa (Figura 1 em Anexo). A partir disso, conclui-se que dentre as variações que testamos, todas levaram ao mesmo resultado estatisticamente. Após a escolha da composição da nanoemulsão, realizou-se a adição da quitosana e assim obteve-se a nanoemulsão mucoadesiva (KPF-MNE).

Devido às características versáteis, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades bioadesivas e aumento da permeabilidade da membrana celular tanto *in vitro* e *in vivo*, a quitosana é um polímero mucoadesivo amplamente utilizado em formulações intranasais (CASETTARI e ILLUM, 2014).

Ambas as formulações apresentaram tamanho de gotícula nanométrico e população monodispersa. Como esperado, a adição de quitosana a NE, possibilitou reverter o potencial zeta, tornando-o positivo ( $+26,09 \pm 2,67$ ), bem como foi observado um aumento do diâmetro de gotícula em cerca de 35 nm, podendo-se inferir que houve adsorção da quitosana a superfície da gotícula (Capítulo I, artigo II, Tabela 1). Além disso, ambas as formulações preservaram o potencial antioxidante quando comparado ao KPF em solução.

Os demais resultados de caracterização mostraram a superioridade da formulação mucoadesiva com vistas à administração intranasal. Nos estudos de permeação/retenção, observou-se maior permeação e retenção do KPF ( $p < 0,0001$ ) na mucosa quando veiculado a MNE em comparação ao KPF livre ou veiculado a NE (Tabela 2, Capítulo I, artigo II). Esse aumento de KPF permeado foi de aproximadamente 5 e 10 vezes em relação a KPF-NE e KPF livre, respectivamente. Já para o KPF retido na mucosa, o aumento de KPF quando veiculado por MNE foi de aproximadamente 2 vezes tanto para NE quanto para KPF livre, podendo, portanto,

exercer função de reservatório. O aumento da permeação devido à adição de quitosana na formulação também foi observado em outros trabalhos ao comparar com a nanoemulsão correspondente sem adição de quitosana (KUMAR *et al.*, 2009; SOOD *et al.*, 2014).

Quitosana já é sabidamente conhecida por ser promotora de permeação e de mucoadesão (CASSETTARI e ILLUM, 2014). Entretanto, em experimentos de células do tipo Franz, fica evidente somente a promoção de permeação. Neste aparato, a questão da mucoadesão torna-se irrelevante, uma vez que as formulações ficam em contato com a mucosa durante todo experimento ou até toda formulação passar ao compartimento receptor e/ou ficar retida na própria mucosa, sem a ação do *clereance* mucociliar.

Como parâmetro preditor da mucoadesividade do nanocarreador proposto, foram determinados a força e o trabalho de mucoadesão, ou seja, a força máxima requerida para separar a formulação da superfície da mucosa e o trabalho (força total aplicada) necessário, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2010). Ao se observar a Figura 3 (Capítulo I, artigo II), nota-se que a presença de quitosana na nanoemulsão aumentou significativamente ( $p < 0,0001$ ) o comportamento mucoadesivo, ou seja, maior força e maior trabalho de mucoadesão em comparação a KPF-NE e ao controle negativo PBS. A quitosana exibe fortes propriedades mucoadesivas devido à formação de ligações de hidrogênio entre suas cargas positivas dos grupos amino e cargas carregadas negativamente de resíduos de ácido siálico da mucina. Assim, com uma maior força mucoadesiva, infere-se que a KPF-MNE ficaria mais tempo na cavidade nasal, resistindo mais ao *clereance* mucociliar, sendo, portanto, o KPF mais absorvido pelo epitélio nasal. Resultados similares foram observados em outros trabalhos que também utilizaram esta técnica (CARVALHO *et al.*, 2013; BARBI MDA *et al.*, 2015; SHAH *et al.*, 2016).

No estudo preliminar de distribuição cerebral, após administração intranasal de KPF-MNE, observou-se um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) do teor de KPF quantificado nos cérebros dos animais em comparação ao KPF livre e a KPF-NE, com um incremento de aproximadamente 5 vezes em relação a ambos. Este resultado

corroborar com os demais resultados obtidos de viscosidade, resistência mucoadesiva e de permeação/retenção, em que a formulação com viscosidade adequada à administração nasal, maior força mucoadesiva, apresentou maior permeação e maior liberação do KPF ao cérebro.

No capítulo I, artigo II, também foi demonstrado que o KPF carregado pela nanoemulsão mucoadesiva (KPF-MNE) diminuiu significativamente ( $p < 0,0001$ ) a viabilidade das células de GBM *in vitro* na concentração de  $1\mu\text{M}$  após 72h de tratamento, quando comparadas ao grupo veículo (MNE) e KPF em solução (Figura 5A, Capítulo I, artigo II). Nessa mesma figura, nota-se que KPF-MNE diminuiu significativamente ( $p < 0,0001$ ) a viabilidade celular em relação a KPF-NE. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que nanopartículas positivamente carregadas exibem melhor associação com as membranas celulares, levando assim a maior internalização e, conseqüentemente, maior efeito citotóxico (HILLAIREAU e COUVREUR, 2009; FROHLICH, 2012). Nanopartículas contendo quitosana têm sido amplamente estudadas para o tratamento de neoplasias (TAHARA *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2009; ANITHA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; CHUAH *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015).

A maior atividade nos experimentos *in vitro* pode ser explicada pela maior captação do KPF veiculado na nanoemulsão mucoadesiva em comparação ao KPF livre e também ao rápido metabolismo das células cancerígenas, que aumentam a eficiência da captação (BHATTACHARJEE *et al.*, 2010). Além disso, uma vez internalizadas, uma única nanopartícula pode carrear várias moléculas de KPF, aumentando a concentração intracelular efetiva.

Resultados similares, da diferença da toxicidade entre KPF livre e KPF carregado, já haviam sido demonstrados com nanopartículas poliméricas constituídas por poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) ou poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) em células de câncer de ovário após 24h de tratamento a 10 e  $25\mu\text{M}$ , justificando o aprofundamento de estudos com essa molécula em nanossistemas (LUO *et al.*, 2012).

Ainda a partir da Figura 5A (Capítulo I, artigo II), verificou-se que o tratamento com as formulações brancas (NE e MNE) também levou a uma importante redução na

viabilidade celular,  $63,49 \pm 12,74\%$  e  $50,70 \pm 6,99\%$ , respectivamente. Sabe-se que os principais fatores de influência para a citotoxicidade são a composição, tamanho, forma, carga superficial e hidrofobicidade superficial das nanopartículas (FROHLICH, 2012). Embora não seja significativa a diferença de citotoxicidade entre elas, é visível a maior citotoxicidade da formulação positiva em relação a negativa. Essa observação pode ser devido às cargas positivas disponíveis, que podem interagir diretamente com as membranas celulares carregadas negativamente e causar possíveis danos celulares (ROMØREN *et al.*, 2004; FROHLICH, 2012). Além das características das nanopartículas, como tamanho, forma e revestimento, poderem alterar a absorção celular, Cho e colaboradores (2011) mostraram a importância do efeito de sedimentação em experimentos *in vitro*. Após a adição das nanopartículas ao meio de cultura, elas podem agregar e alterar suas características físicas. Além disso, nanopartículas grandes e pesadas podem sedimentar rapidamente, fazendo com que a dose de nanopartículas na superfície da célula possa variar (CHO *et al.*, 2011). Essa questão foi inclusive um dos pontos questionados por um dos revisores desse artigo. Seguindo sua sugestão, incubou-se KPF-MNE no meio de cultura (sem células) e avaliou-se durante todo período de tratamento (Figura S3, material suplementar do artigo II, Capítulo I). As gotículas permaneceram estáveis em relação ao tamanho de gotícula durante a incubação (72h).

Importante salientar que só foi observada diferença na viabilidade celular entre os grupos testados após 72h de tratamento. Esse achado reforça a necessidade de tempo de incubação para a internalização e atividade citotóxica do KPF-MNE.

Interessantemente, quando ao mesmo poço de tratamento foi adicionado formulação branca MNE e KPF em solução a  $1\mu\text{M}$ , não foi observado o mesmo comportamento quando comparado a KPF carregado pela nanoemulsão, evidenciando a importância da veiculação do KPF para a interação com a célula e liberação do composto citotóxico.

Aliado ao fato da necessidade da veiculação do KPF para atividade, observou-se que o tratamento por 72h com KPF-MNE levou à morte celular apoptótica ao contrário do KPF em solução, que não causou o mesmo efeito (Figura 7, Capítulo I, artigo II). Os resultados encontrados corroboram com os dados da literatura que

mostram apoptose em células de glioma após tratamento com KPF em solução, porém com concentração 50 vezes maior (50  $\mu$ M) à concentração veiculada por MNE (1  $\mu$ M) (SHARMA *et al.*, 2007; SIEGELIN *et al.*, 2008; JEONG *et al.*, 2009). Ainda, após o tratamento com KPF-MNE e KPF livre por 48h, só foi possível realizar a quantificação do KPF internalizado pelas células quando tratadas com KPF-MNE ( $4.40 \pm 1.5$  nmol/mg proteína). O KPF internalizado pela célula após o tratamento com KPF livre foi abaixo do limite de quantificação por HPLC.

Mesmo com diminuição da viabilidade das células tratadas com MNE sem KPF ( $50,70 \pm 6,99\%$ ), não foi constatada morte por apoptose, necrose ou parada no ciclo celular, ou seja, o mecanismo pelo qual as células morreram é outro. Experimentalmente, foi observado que as células tratadas com ambas nanoemulsões (MNE e NE) com ou sem KPF, soltavam-se da placa, provavelmente por perda da adesão celular. Em nossos experimentos preliminares, verificou-se que, quando menores volumes de formulação eram adicionados ao poço, menor variação na viabilidade celular era observado, ou seja, a perda de adesão celular pode estar relacionada ao número de partículas em contato com as células (dados não mostrados).

A adesão celular é a capacidade de uma célula aderir uma a outra célula ou a uma matriz extracelular e está envolvida na regulação da diferenciação celular, ciclo celular, migração e sobrevivência celular (KHALILI e AHMAD, 2015). O desprendimento das células ou a perda de ancoragem nas células adesivas é um marcador comum de morte celular, que pode ser monitorado como um sinal de citotoxicidade (YANG *et al.*, 2017). O desprendimento de células da matriz extracelular induz a uma variedade de fenótipos de morte celular: anoikis, entosis, autofagia e transdiferenciação escamosa (ISHIKAWA *et al.*, 2015). A análise por citometria de fluxo demonstrou que KPF-MNE não alterou a progressão do ciclo celular, bem como para os demais tratamentos (Figura 6).

Srinivas Raghavan e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas de ouro contendo KPF e verificaram que, após o tratamento com 14,5  $\mu$ g / mL por 24 e 48h, houve redução na viabilidade de células de câncer de mama de  $50,6 \pm 2,4$  e  $37,1 \pm 5,8$  %, respectivamente. Já a viabilidade das células quando tratadas com KPF livre (7,2  $\mu$ g/mL) foi maior de 80%. Os autores verificaram indução de apoptose ( $16,9 \pm$

1,2% no tratamento com 2,4 µg/mL após 24h, bem como inibição da angiogênese com 7,2 µg/mL (SRINIVAS RAGHAVAN *et al.*, 2015). Em nossos resultados, com concentração cerca de 8 vezes inferior, já foi verificada indução a apoptose, embora com tempo de tratamento superior (72h).

O conjunto dos resultados obtidos indica que a nanoemulsão mucoadesiva desenvolvida (KPF-MNE) é um eficiente sistema de liberação do KPF ao sistema nervoso central, além de diminuir a viabilidade das células de GBM. Além disso, o primeiro e o segundo artigo deste capítulo foram os primeiros trabalhos que verificaram a liberação de KPF pela via intranasal, livre ou veiculado em um nanocarreador.

O capítulo II da presente tese apresenta uma revisão sistemática sobre a utilização de dispersões sólidas (DS) como estratégia para melhorar a dissolução e biodisponibilidade oral de flavonoides, bem como o desenvolvimento e caracterização de DS contendo KPF.

Com o intuito de melhorar a dissolução e biodisponibilidade oral do KPF, pensou-se em utilizar DS para veicular este flavonoide, visto o sucesso dessa estratégia para diversos fármacos pouco solúveis. Entretanto, ao realizarmos uma profunda busca na literatura para nos situarmos no contexto atual deste tema, nada foi encontrado sobre a utilização de DS contendo KPF. Assim, surgiu a ideia de realizar uma revisão sistemática, ampliando para a classe flavonoides, já que também não havia nenhum trabalho que abordasse esta temática.

O sucesso das dispersões sólidas em aumentar a dissolução e biodisponibilidade oral de flavonoides foi amplamente discutida no artigo I do Capítulo II. Neste trabalho, verificou-se que o método mais utilizado para a preparação de DS contendo flavonoides é a técnica de evaporação do solvente e o polímero mais empregado como carreador foi o PVP. Aproximadamente 70% dos trabalhos utilizaram o flavonoide livre, enquanto cerca de 30% investigaram extratos vegetais contendo flavonoides. Importante ressaltar que não foi possível estabelecer se determinado polímero, proporção ou método de preparação são as melhores opções para a classe de flavonoides. A literatura ainda está carente de trabalhos no tema para que se possa



chegar a tais conclusões. Verificou-se que todos os trabalhos encontraram resultados promissores, onde observaram um aumento na solubilidade em água, melhor perfil de dissolução e aumento da biodisponibilidade oral em relação ao flavonoide livre. Dos 56 trabalhos analisados, somente um deles demonstrou que a DS desenvolvida apresentou biodisponibilidade oral inferior a outra formulação, neste caso fosfolipídica, mas ainda assim, a DS apresentou ASC superior aos flavonoides livres (CHEN *et al.*, 2010).

Concomitantemente a realização da revisão sistemática, realizou-se o desenvolvimento de DS contendo KPF, gerando a publicação II do Capítulo II.

Com o objetivo de selecionar o carreador mais adequado para o preparo de dispersões sólidas contendo KPF, foram inicialmente realizados testes de solubilidade com os principais carreadores utilizados: Gelucire 44/14, Poloxamer 188, Poloxamer 407 e Soluplus®. Verificou-se que o Poloxamer 407 foi o carreador que mais aumentou a solubilidade do KPF em água. Por esse motivo, este foi o polímero escolhido para o desenvolvimento das dispersões. Poloxâmeros (comumente conhecidos por seus nomes comerciais Pluronic® ou Lutrol®) são copolímeros tribloco não-iônicos de polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno que apresentam propriedades tensoativas (ALI *et al.*, 2010).

Após esta triagem inicial para a seleção do carreador, foram desenvolvidas dispersões em diferentes proporções KPF:polímero (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:7 e 1:9) pelo método de evaporação do solvente. Quanto maior a proporção de poloxamer, maior foi a solubilidade do KPF em água. Entretanto, o tamanho da forma farmacêutica final também tem papel importante na escolha da melhor proporção, descartando-se, assim, as proporções 1:7 e 1:9. Diferentemente da abordagem convencional utilizada no processo de desenvolvimento farmacotécnico, onde a dissolução é realizada posteriormente a caracterização físico-química, decidiu-se realizar um ensaio preliminar de dissolução. Verificou-se que a proporção 1:5 apresentou melhor perfil de dissolução em meio ácido em comparação as demais proporções (dados não apresentados) e foi a escolhida para a continuidade dos estudos.

Dois principais métodos são usados para produzir dispersões sólidas: evaporação do solvente e fusão. Ambos são úteis nas escalas laboratorial e industrial

(VASCONCELOS *et al.*, 2016). A escolha do método de preparo das dispersões da primeira etapa presente capítulo foi o método de evaporação do solvente, uma vez que DS preparadas pelo método de evaporação do solvente podem apresentar estrutura porosa com alguns canais na estrutura sólida, aumentando assim a porosidade, a área de superfície e, assim, a taxa de dissolução do fármaco (VO *et al.*, 2013).

Nas etapas seguintes deste estudo, ao compararmos com a dispersão sólida (1:5, KPF:poloxamer, p:p) preparada pelo método de fusão, esperávamos um comportamento superior das dispersões preparadas pelo método de evaporação do solvente pelo motivo apresentado acima. Entretanto, ambos os métodos apresentaram comportamento muito semelhante em relação a solubilidade, perfil de dissolução, bem como na caracterização por difração de raio X, FTIR, DSC e MEV. Como o método por fusão apresenta reduzido custo de produção, simplicidade operacional e não emprega solventes orgânicos, esse foi o método escolhido para os estudos de farmacocinética.

Através da análise de FTIR, foi observado uma possível interação por ligações de hidrogênio entre o KPF e o poloxamer, visto que o flavonoide apresenta quatro OH e o carreador duas OH para tal interação. Resultado semelhante também foi encontrado por Khan e colaboradores, onde eles sugerem ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do flavonoide naringenina e do carreador, onde também observaram alteração na banda característica de hidroxila (KHAN *et al.*, 2015). Através das análises de difração de raio X, foi verificada uma diminuição da cristalinidade do KPF nas dispersões, visto que somente alguns picos característicos do KPF não foram observados. Já através das análises de DSC, as dispersões apresentaram o mesmo perfil que a mistura física, onde não foi observado o pico relativo ao ponto de fusão do KPF. Essa observação pode ser devido a solubilização do KPF no polímero fundido ou pela baixa proporção de KPF na mistura física e dispersões, fato também observado por Eloy e Marchetti (ELOY e MARCHETTI, 2014). Nas análises por MEV também não foi observada nenhuma diferença visual entre as dispersões. Ambas dispersões apresentaram uma superfície rugosa e irregular e a ausência de cristais de KPF visíveis, indicando que a KPF está dissolvido no transportador polimérico ou que

ocorreu conversão parcial em uma forma amorfa. Por outro lado, as imagens da mistura física mostraram cristais de KPF sob a massa de poloxamer.

Nos ensaios de dissolução, ambos os métodos de preparação testados, método de fusão e de evaporação do solvente, levaram ao mesmo perfil de dissolução das dispersões, comprovadas pelo valor de  $f1$  e  $f2$  das curvas. Já a dissolução do KPF a partir da mistura física não se mostrou tão eficiente quanto a partir das dispersões, evidenciando a necessidade da dispersão sólida como estratégia farmacotécnica para melhorar a dissolução do KPF. Após a administração da dispersão sólida (100 mg/kg de KPF) em ratos, o  $C_{max}$  foi significativamente maior (2,2 vezes,  $p < 0,05$ ) e o valor de  $ASC_{0-24h}$  de KPF foi 1,85 maior que o KPF livre, indicando que a dispersão sólida melhorou significativamente a exposição do KPF.

Importante ressaltar que o aumento observado, tanto nos valores de  $ASC_{0 \rightarrow t}$  quanto de  $C_{max}$ , para a dispersão sólida desenvolvida (aproximadamente 2 vezes para ambos parâmetros) estão compreendidos dentro da faixa de valores encontrados na revisão sistemática realizada (Artigo I, Capítulo II). Nestes trabalhos, em geral, as dispersões sólidas aumentaram em média  $3,39 \pm 1,48$  vezes a  $AUC_{0 \rightarrow t}$  em relação ao flavonoide livre. Já para o  $C_{max}$  este aumento foi em média foi de  $5,59 \pm 3,74$ .

Mesmo com um grande aumento na solubilidade em água a partir da DS (aproximadamente de 4 mil vezes) e melhora significativa no perfil de dissolução, ambos em relação ao KPF livre, o aumento na ASC não foi tão grande quanto o esperado. Conclui-se que, por mais que o KPF seja classificado como classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (XIE *et al.*, 2014), a extensão de absorção dele depende de fatores que não foram avaliados em nosso estudo, como metabolização, permeabilidade e mecanismos de absorção e efluxo (BARVE *et al.*, 2009). Barve e colaboradores demonstraram que o KPF apresenta baixa a moderada absorção, com biodisponibilidade oral de aproximadamente 2%. Os autores atribuem esse baixo valor em parte ao extenso metabolismo de primeira passagem pela fase I (metabolismo oxidativo) e fase II (glicuronidação no intestino e fígado) (BARVE *et al.*, 2009).

Conforme dito anteriormente, ao realizarmos o planejamento e desenvolvimento da revisão (artigo I, Capítulo II) nenhum trabalho na literatura foi

encontrado no que tange a dispersões sólidas contendo KPF isolado, ou seja, sem o KPF estar em um extrato vegetal. Entretanto, em setembro de 2018, Xu e colaboradores desenvolveram complexos intermoleculares com o polissacarídeo arabinogalactano (AG) e glicirrizinato dissódico ( $\text{Na}_2\text{GA}$ ) pela técnica "mecanoquímica" de moinhos de bolas. Os autores não atribuem o nome de "dispersão sólida" a formulação, embora afirmem que a redução do tamanho das partículas e a destruição das formas cristalinas revelaram a formação de uma dispersão sólida (XU *et al.*, 2018). Portanto, de forma inédita, pode-se considerar que, nesta tese, foram desenvolvidas dispersões sólidas contendo KPF por métodos consolidados com resultados promissores.

**CONCLUSÕES**

---



Por meio do trabalho realizado pode-se concluir que:

- O método desenvolvido e validado por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de kaempferol em nanoemulsões, mucosa nasal suína, fluido receptor e cérebro de rato apresentou-se específico, linear, preciso, exato, sensível e robusto;
- O método por homogeneização a alta pressão mostrou-se adequado para a obtenção de nanoemulsões contendo KPF com elevado teor e taxa de associação, preservando sua atividade antioxidante;
- Foram obtidas nanoemulsões monodispersas contendo KPF com reduzido tamanho de gotícula e elevado potencial zeta;
- A adição de quitosana a nanoemulsão KPF-NE para a obtenção da nanoemulsão mucoadesiva KPM-MNE aumentou a força mucoadesiva bem como promoveu maior permeação e retenção do KPF na mucosa nasal suína no estudo de permeação *ex vivo*;
- A administração intranasal da nanoemulsão KPF-MNE aumentou o teor de KPF no cérebro de ratos quando comparado a KPF livre e a nanoemulsão sem agente mucoadesivo;
- O tratamento com KPF+MNE resultou em atividade citotóxica inferior quando comparada a KPF-MNE, demonstrando a importância da internalização do KPF no nanossistema;
- KPF-MNE aumentou a resposta contra glioma *in vitro* por apoptose em comparação a KPF-NE e ao composto livre, sugerindo um aumento da biodisponibilidade intracelular;

- Através da revisão sistemática, verificou-se grande interesse e sucesso na utilização de dispersões sólidas como estratégia para melhorar a dissolução e biodisponibilidade oral de flavonoides;
- A dispersão sólida  $SD_{MM}$  contendo KPF com o carreador Poloxamer 407 mostrou-se uma adequada estratégia farmacotécnica para a promoção da solubilidade, dissolução e biodisponibilidade oral do KPF;
- Observou-se perda da cristalinidade do KPF nas dispersões sólidas ( $SD_{MM}$  e  $SD_{SM}$ ) indicada por análises de raios X e possível ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila do KPF e Poloxamer por FTIR.



## **REFERÊNCIAS**

---



AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, Jan 2002.

AHMAD, N.; AHMAD, R.; NAQVI, A. A.; ALAM, M. A.; ASHAFAQ, M.; ABDUR RUB, R.; AHMAD, F. J. Intranasal delivery of quercetin-loaded mucoadhesive nanoemulsion for treatment of cerebral ischaemia. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 12, p. 1-13, 2017.

AHMAD, N.; AHMAD, R.; NAQVI, A. A.; ALAM, M. A.; ASHAFAQ, M.; SAMIM, M.; IQBAL, Z.; AHMAD, F. J. Rutin-encapsulated chitosan nanoparticles targeted to the brain in the treatment of Cerebral Ischemia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 640-55, 2016.

ALAGUSUNDARAM, M.; CHENGAI AH, B.; GNANAPRAKASH, K.; RAMKANTH, S.; CHETTY, C. M.; DHACHINAMOORTHY, D. Nasal drug delivery system-an overview. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 454-465, 2010.

ALAM, M. I.; BEG, S.; SAMAD, A.; BABOOTA, S.; KOHLI, K.; ALI, J.; AHUJA, A.; AKBAR, M. Strategy for effective brain drug delivery. **European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 385-403, Aug 11 2010.

ALI, W.; WILLIAMS, A. C.; RAWLINSON, C. F. Stoichiometrically governed molecular interactions in drug: poloxamer solid dispersions. **Int J Pharm**, v. 391, n. 1-2, p. 162-8, 2010.

ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 152, p. 63-82, 2015.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-20, Mar 1995.

ANITHA, A.; MAYA, S.; DEEPA, N.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. Curcumin-loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for cancer drug delivery. **Journal of biomaterials science. Polymer edition.**, v. 23, n. 11, p. 1381-400, 2012.

ATTIA, A.; RAPP, S. R.; CASE, L. D.; D'AGOSTINO, R.; LESSER, G.; NAUGHTON, M.; MCMULLEN, K.; ROSDHAL, R.; SHAW, E. G. Phase II study of Ginkgo biloba in irradiated brain tumor patients: effect on cognitive function, quality of life, and mood. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 109, n. 2, p. 357-63, 2012.

BAHADUR, S.; PATHAK, K. Buffered nanoemulsion for nose to brain delivery of ziprasidone hydrochloride: preformulation and pharmacodynamic evaluation. **Current Drug Delivery**, v. 9, n. 6, p. 596-607, 2012.

BARBI MDA, S.; CARVALHO, F. C.; KIILL, C. P.; BARUD HDA, S.; SANTAGNELI, S. H.; RIBEIRO, S. J.; GREMIAO, M. P. Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles for Zidovudine Nasal Delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 865-74, 2015.

BARRINGTON, R.; WILLIAMSON, G.; BENNETT, R. N.; DAVIS, B. D.; BRODBELT, J. S.; KROON, P. A. Absorption, Conjugation and Efflux of the Flavonoids, Kaempferol and Galangin, Using the Intestinal CACO-2/TC7 Cell Model. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 1, p. 74-87, 2009.

BARTON, D. L.; BURGER, K.; NOVOTNY, P. J.; FITCH, T. R.; KOHLI, S.; SOORI, G.; WILWERDING, M. B.; SLOAN, J. A.; KOTTSCHADE, L. A.; ROWLAND, K. M., JR.; DAKHIL, S. R.; NIKCEVICH, D. A.; LOPRINZI, C. L. The use of Ginkgo biloba for the prevention of chemotherapy-related cognitive dysfunction in women receiving adjuvant treatment for breast cancer, N00C9. **Support Care Cancer**, v. 21, n. 4, p. 1185-92, 2013.

BARVE, A.; CHEN, C.; HEBBAR, V.; DESIDERIO, J.; SAW, C. L.; KONG, A. N. Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 30, n. 7, p. 356-65, Oct 2009.

BERNKOP-SCHNURCH, A.; DUNNHaupt, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 463-9, 2012.

BHATT, R.; SINGH, D.; PRAKASH, A.; MISHRA, N. Development, characterization and nasal delivery of rosmarinic acid-loaded solid lipid nanoparticles for the effective management of Huntington's disease. **Drug delivery**, v. 22, n. 7, p. 931-9, 2015.

BHATTACHARJEE, H.; BALABATHULA, P.; WOOD, G. C. Targeted nanoparticulate drug-delivery systems for treatment of solid tumors: a review. **Therapeutic Delivery**, v. 1, n. 5, p. 713-34, 2010.

CALDERON-MONTANO, J. M.; BURGOS-MORON, E.; PEREZ-GUERRERO, C.; LOPEZ-LAZARO, M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298-344, Apr 2011.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2010.

CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G.; GREMIAO, M. P. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 219-27, 2013.

CASSETTARI, L.; ILLUM, L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 189-200, 2014.

CHARMAN, W. N.; CHARMAN, S. A. Oral Modified-Release Delivery Systems. In: (Ed.). **Modified-release drug delivery technology**: CRC Press, 2002. p.25-34.

CHEN, A. Y.; CHEN, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2099-107, Jun 15 2013.

CHEN, Z. P.; SUN, J.; CHEN, H. X.; XIAO, Y. Y.; LIU, D.; CHEN, J.; CAI, H.; CAI, B. C. Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of Ginkgo biloba extracts, Ginkgo biloba extract phospholipid complexes and Ginkgo biloba extract solid dispersions in rats. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1045-52, 2010.

CHIOU, W. L.; RIEGELMAN, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 9, p. 1281-1302, 1971.

CHO, E. C.; ZHANG, Q.; XIA, Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 385-391, 2011.

CHO, H. J.; PARK, J. H. Kaempferol Induces Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 3, p. 257-63, Sep 2013.

CHUAH, L. H.; ROBERTS, C. J.; BILLA, N.; ABDULLAH, S.; ROSLI, R. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 228-36, 2014.

COMFORT, C.; GARRASTAZU, G.; POZZOLI, M.; SONVICO, F. Opportunities and challenges for the nasal administration of nanoemulsions. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 356-68, 2015.

COSTANTINO, H. R.; ILLUM, L.; BRANDT, G.; JOHNSON, P. H.; QUAY, S. C. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 1-24, 2007.

CUI, Y.; MORGENSTERN, H.; GREENLAND, S.; TASHKIN, D. P.; MAO, J. T.; CAI, L.; COZEN, W.; MACK, T. M.; LU, Q. Y.; ZHANG, Z. F. Dietary flavonoid

intake and lung cancer--a population-based case-control study. **Cancer**, v. 112, n. 10, p. 2241-8, 2008.

DA FONSECA, C. O.; SIMAO, M.; LINS, I. R.; CAETANO, R. O.; FUTURO, D.; QUIRICO-SANTOS, T. Efficacy of monoterpene perillyl alcohol upon survival rate of patients with recurrent glioblastoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 2, p. 287-93, 2011.

DEVI, K. P.; MALAR, D. S.; NABAVI, S. F.; SUREDA, A.; XIAO, J.; NABAVI, S. M.; DAGLIA, M. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 1-10, 2015.

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY, W. H., 2ND. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1654-73, 2010.

DOLECEK, T. A.; PROPP, J. M.; STROUP, N. E.; KRUCHKO, C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. **Neuro Oncol**, v. 14 Suppl 5, p. v1-49, Nov 2012.

DUAN, J.; DANG, Y.; MENG, H.; WANG, H.; MA, P.; LI, G.; WU, T.; XIE, Y. A comparison of the pharmacokinetics of three different preparations of total flavones of Hippophae rhamnoides in beagle dogs after oral administration. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v. 41, n. 3, p. 239-49, 2016.

ELOY, J. O.; MARCHETTI, J. M. Solid dispersions containing ursolic acid in Poloxamer 407 and PEG 6000: A comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology**, v. 253, p. 98-106, 2014/02/01/ 2014.

EMA. European Medicines Agency, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, Guideline on bioanalytical method validation. p. 1-22, 2011.

FDA. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. p. 1-30, 1994.

FDA. **Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System (CDER, FDA)**. 2000.

FDA. Food and Drug Administration, Center for drug evaluation and research, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. p. 1-34, 2013.

FROHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5577-91, 2012.

GATES, M. A.; VITONIS, A. F.; TWOROGER, S. S.; ROSNER, B.; TITUS-ERNSTOFF, L.; HANKINSON, S. E.; CRAMER, D. W. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 8, p. 1918-25, 2009.

GOUTHAMI, K. S.; KUMAR, D.; THIPPARABOINA, R.; CHAVAN, R. B.; SHASTRI, N. R. Can crystal engineering be as beneficial as micronisation and overcome its pitfalls?: A case study with cilostazol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1-2, p. 26-34, 2015.

HASHIZUME, R.; OZAWA, T.; GRYAZNOV, S. M.; BOLLEN, A. W.; LAMBORN, K. R.; FREY, W. H., 2ND; DEEN, D. F. New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163. **Neuro-Oncology**, v. 10, n. 2, p. 112-20, 2008.

HAUNS, B.; HARING, B.; KOHLER, S.; MROSS, K.; UNGER, C. Phase II study of combined 5-fluorouracil/ Ginkgo biloba extract (GBE 761 ONC) therapy in 5-fluorouracil pretreated patients with advanced colorectal cancer. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 1, p. 34-8, 2001.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2873-96, 2009.

HOSNY, K. M.; BANJAR, Z. M. The formulation of a nasal nanoemulsion zaleplon in situ gel for the treatment of insomnia. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 10, n. 8, p. 1033-41, 2013.

ICH. International Conference on Harmonization, Technical requirements for the registration of pharmaceutical for human use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). p. 1-13, 2005.

ILLUM, L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2000.

ILLUM, L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 87, n. 1-3, p. 187-98, 2003.

ILLUM, L. Nasal drug delivery - recent developments and future prospects. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 254-63, 2012.

IMAI, Y.; TSUKAHARA, S.; ASADA, S.; SUGIMOTO, Y. Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. **Cancer Research**, v. 64, n. 12, p. 4346-52, 2004.

ISHIKAWA, F.; USHIDA, K.; MORI, K.; SHIBANUMA, M. Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line

under atypical focal adhesion kinase signaling. **Cell Death & Disease**, v. 6, p. e1619, 2015.

JAIN, N.; AKHTER, S.; JAIN, G. K.; KHAN, Z. I.; KHAR, R. K.; AHMAD, F. J. Antiepileptic intranasal Amiloride loaded mucoadhesive nanoemulsion: development and safety assessment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 142-3, 2011.

JAIN, R.; PATRAVALE, V. B. Development and evaluation of nitrendipine nanoemulsion for intranasal delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 62-8, 2009.

JEONG, J. C.; KIM, M. S.; KIM, T. H.; KIM, Y. K. Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 5, p. 991-1001, May 2009.

JOGANI, V. V.; SHAH, P. J.; MISHRA, P.; MISHRA, A. K.; MISRA, A. R. Intranasal mucoadhesive microemulsion of tacrine to improve brain targeting. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 22, n. 2, p. 116-24, Apr-Jun 2008.

KAKRAN, M.; SAHOO, N.; LI, L. Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation, and solid dispersion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 121-130, 2011.

KANAZE, F.; KOKKALOU, E.; NIOPAS, I.; GEORGARAKIS, M.; STERGIYOU, A.; BIKIARIS, D. Dissolution enhancement of flavonoids by solid dispersion in PVP and PEG matrixes: A comparative study. **Journal of applied polymer science**, v. 102, n. 1, p. 460-471, 2006.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1-10, 2011/11/25/ 2011.

KHALILI, A. A.; AHMAD, M. R. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 8, p. 18149-18184, 2015.

KHAN, A. W.; KOTTA, S.; ANSARI, S. H.; SHARMA, R. K.; ALI, J. Enhanced dissolution and bioavailability of grapefruit flavonoid Naringenin by solid dispersion utilizing fourth generation carrier. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 5, p. 772-779, 2015.

KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 6, p. 748-64, 2011.



KIPRIANOVA, I.; THOMAS, N.; AYACHE, A.; FISCHER, M.; LEUCHS, B.; KLEIN, M.; ROMMELAERE, J.; SCHLEHOFER, J. R. Regression of glioma in rat models by intranasal application of parvovirus h-1. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 16, p. 5333-42, 2011.

KOZLOVSKAYA, L.; ABOU-KAOUD, M.; STEPENSKY, D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 133-40, Sep 10 2014.

KOZLOVSKAYA, L.; STEPENSKY, D. Quantitative analysis of the brain-targeted delivery of drugs and model compounds using nano-delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 171, n. 1, p. 17-23, 2013.

KUMAR, M.; MISRA, A.; BABBAR, A. K.; MISHRA, A. K.; MISHRA, P.; PATHAK, K. Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, n. 1-2, p. 285-91, Jun 24 2008.

KUMAR, M.; MISRA, A.; MISHRA, A. K.; MISHRA, P.; PATHAK, K. Mucoadhesive nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of olanzapine for brain targeting. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 10, p. 806-14, Dec 2008.

KUMAR, M.; PATHAK, K.; MISRA, A. Formulation and characterization of nanoemulsion-based drug delivery system of risperidone. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 4, p. 387-95, 2009.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 29, n. 162750, 2013.

LALANI, J.; BARADIA, D.; LALANI, R.; MISRA, A. Brain targeted intranasal delivery of tramadol: comparative study of microemulsion and nanoemulsion. **Pharmaceutical Development and Technology**, p. 1-10, Sep 17 2014.

LEE, H. S.; CHO, H. J.; KWON, G. T.; PARK, J. H. Kaempferol Downregulates Insulin-like Growth Factor-I Receptor and ErbB3 Signaling in HT-29 Human Colon Cancer Cells. **Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 3, p. 161-9, Sep 2014.

LEE, J. H.; KIM, G. H. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 1750-3841, 2010.

LEE, K. M.; LEE, K. W.; JUNG, S. K.; LEE, E. J.; HEO, Y. S.; BODE, A. M.; LUBET, R. A.; LEE, H. J.; DONG, Z. Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 2042-9, 2010.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 50, n. 1, p. 47-60, 2000.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 47-60, 2000/07/03/ 2000.

LI, C.; LI, X.; CHOI, J. S. Enhanced bioavailability of etoposide after oral or intravenous administration of etoposide with kaempferol in rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 1, p. 133-8, Jan 2009.

LI, C.; ZHAO, Y.; YANG, D.; YU, Y.; GUO, H.; ZHAO, Z.; ZHANG, B.; YIN, X. Inhibitory effects of kaempferol on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-9. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 93, n. 1, p. 16-27, Feb 2015.

LI, W.; YI, S.; WANG, Z.; CHEN, S.; XIN, S.; XIE, J.; ZHAO, C. Self-nanoemulsifying drug delivery system of persimmon leaf extract: Optimization and bioavailability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 161-71, Nov 25 2011.

LI, Y.; GAO, Y.; LIU, G.; ZHOU, X.; WANG, Y.; MA, L. [Intranasal administration of temozolomide for brain-targeting delivery: therapeutic effect on glioma in rats]. **Journal of Southern Medical University**, v. 34, n. 5, p. 631-5, 2014.

LIN, J.; REXRODE, K. M.; HU, F.; ALBERT, C. M.; CHAE, C. U.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, n. 11, p. 1305-13, 2007.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 44, n. 1, p. 235-249, 2000.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LIU, J.; XU, L.; LIU, C.; ZHANG, D.; WANG, S.; DENG, Z.; LOU, W.; XU, H.; BAI, Q.; MA, J. Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 16-22, 2012.

LIU, L.; ZHANG, X.; LOU, Y.; RAO, Y. Cerebral microdialysis in glioma studies, from theory to application. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 96, p. 77-89, Aug 5 2014.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current state of nanoemulsions in drug delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 05, p. 626, 2011.

LU, Y.; QI, J.; WU, W. Absorption, disposition and pharmacokinetics of nanoemulsions. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 396-417, 2012.

LUO, H.; DADDYSMAN, M. K.; RANKIN, G. O.; JIANG, B. H.; CHEN, Y. C. Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc. **Cancer Cell International**, v. 10, n. 16, p. 1475-2867, 2010.

LUO, H.; JIANG, B.; LI, B.; LI, Z.; JIANG, B. H.; CHEN, Y. C. Kaempferol nanoparticles achieve strong and selective inhibition of ovarian cancer cell viability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3951-9, 2012.

MAHAJAN, H. S.; MAHAJAN, M. S.; NERKAR, P. P.; AGRAWAL, A. Nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of saquinavir mesylate for brain targeting. **Drug delivery**, v. 21, n. 2, p. 148-54, 2014.

MENG, F.; GALA, U.; CHAUHAN, H. Classification of solid dispersions: correlation to (i) stability and solubility (ii) preparation and characterization techniques. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 41, n. 9, p. 1401-15, 2015.

MERCADER-ROS, M. T.; LUCAS-ABELLAN, C.; GABALDON, J. A.; FORTEA, M. I.; MARTINEZ-CACHA, A.; NUNEZ-DELICADO, E. Kaempferol complexation in cyclodextrins at basic pH. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4675-80, Apr 28 2010.

MIEAN, K. H.; MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3106-12, 2001.

MISHRA, D. K.; DHOTE, V.; BHARGAVA, A.; JAIN, D. K.; MISHRA, P. K. Amorphous solid dispersion technique for improved drug delivery: basics to clinical applications. **Drug delivery and translational research**, v. 5, n. 6, p. 552-565, 2015.

MISRA, A.; KHER, G. Drug delivery systems from nose to brain. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 12, p. 2355-79, 2012.

MODI, G.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2010.

MORADI-AFRAPOLI, F.; OUFIR, M.; WALTER, F. R.; DELI, M. A.; SMIESKO, M.; ZABELA, V.; BUTTERWECK, V.; HAMBURGER, M. Validation of UHPLC-MS/MS methods for the determination of kaempferol and its metabolite 4-hydroxyphenyl acetic acid, and application to in vitro blood-brain barrier and intestinal drug permeability studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 128, p. 264-274, 2016.

NADOVA, S.; MIADOKOVA, E.; CIPAK, L. Flavonoids potentiate the efficacy of cytarabine through modulation of drug-induced apoptosis. **Neoplasma**, v. 54, n. 3, p. 202-6, 2007.

NAKATSUMA, A.; FUKAMI, T.; SUZUKI, T.; FURUISHI, T.; TOMONO, K.; HIDAKA, S. Effects of kaempferol on the mechanisms of drug resistance in the human glioblastoma cell line T98G. **Pharmazie**, v. 65, n. 5, p. 379-83, 2010.

NASR, M. Development of an optimized hyaluronic acid-based lipidic nanoemulsion co-encapsulating two polyphenols for nose to brain delivery. **Drug delivery**, v. 23, n. 4, p. 1444-52, 2016.

NOTHLINGS, U.; MURPHY, S. P.; WILKENS, L. R.; HENDERSON, B. E.; KOLONEL, L. N. Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, n. 8, p. 924-31, 2007.

OSTROM, Q. T.; BAUCHET, L.; DAVIS, F. G.; DELTOUR, I.; FISHER, J. L.; LANGER, C. E.; PEKMEZCI, M.; SCHWARTZBAUM, J. A.; TURNER, M. C.; WALSH, K. M.; WRENSCH, M. R.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. **Neuro-Oncology**, v. 16, n. 7, p. 896-913, 2014.

PAJOUHESH, H.; LENZ, G. R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. **NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.**, v. 2, n. 4, p. 541-53, 2005.

PANGENI, R.; SHARMA, S.; MUSTAFA, G.; ALI, J.; BABOOTA, S. Vitamin E loaded resveratrol nanoemulsion for brain targeting for the treatment of Parkinson's disease by reducing oxidative stress. **Nanotechnology**, v. 25, n. 48, p. 0957-4484, 2014.

PARDESHI, C. V.; BELGAMWAR, V. S. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 7, p. 957-72, 2013.

PATEL, J.; BUDDHA, B.; DEY, S.; PAL, D.; MITRA, A. K. In vitro interaction of the HIV protease inhibitor ritonavir with herbal constituents: changes in P-gp and CYP3A4 activity. **American Journal of Therapeutics**, v. 11, n. 4, p. 262-77, Jul-Aug 2004.

PIAO, Y.; SHIN, S. C.; CHOI, J. S. Effects of oral kaempferol on the pharmacokinetics of tamoxifen and one of its metabolites, 4-hydroxytamoxifen, after oral administration of tamoxifen to rats. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 29, n. 4, p. 245-9, May 2008.

PICON, P. D.; PICON, R. V.; COSTA, A. F.; SANDER, G. B.; AMARAL, K. M.; ABOY, A. L.; HENRIQUES, A. T. Randomized clinical trial of a phytotherapeutic compound containing *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Sambucus nigra*, and *Cassia augustifolia* for chronic constipation. **BMC Complement Altern Med**, v. 10, n. 17, p. 1472-6882, 2010.

PREUSSER, M.; HABERLER, C.; HAINFELLNER, J. A. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. **Wiener medizinische Wochenschrift.**, v. 156, n. 11-12, p. 332-7, 2006.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; NANDAKUMAR, N.; PALANISWAMI, R.; NISHIGAKI, Y.; NISHIGAKI, I. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 103-12, 2014.

RANGEL-ORDONEZ, L.; NOLDNER, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WURGLICS, M. Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized Ginkgo biloba extract EGb 761(R). **Planta Med**, v. 76, n. 15, p. 1683-90, 2010.

RASSU, G.; COSSU, M.; LANGASCO, R.; CARTA, A.; CAVALLI, R.; GIUNCHEDI, P.; GAVINI, E. Propolis as lipid bioactive nano-carrier for topical nasal drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 908-17, 2015.

REITZ, M.; DEMESTRE, M.; SEDLACIK, J.; MEISSNER, H.; FIEHLER, J.; KIM, S. U.; WESTPHAL, M.; SCHMIDT, N. O. Intranasal delivery of neural stem/progenitor cells: a noninvasive passage to target intracerebral glioma. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 12, p. 866-73, 2012.

ROBINS, H. I.; LASSMAN, A. B.; KHUNTIA, D. Therapeutic advances in malignant glioma: current status and future prospects. **Neuroimaging clinics of North America**, v. 19, n. 4, p. 647-56, Nov 2009.

ROMEO, V. D.; DEMEIRELES, J.; SILENO, A. P.; PIMPLASKAR, H. K.; BEHL, C. R. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 29, n. 1-2, p. 89-116, 1998.

ROMØREN, K.; THU, B. J.; BOLS, N. C.; EVENSEN, Ø. Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1663, n. 1-2, p. 127-134, 2004.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual review of nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

ROTHWELL, J. A.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 11, p. 4355-60, 2005.

SALES, D. S.; CARMONA, F.; DE AZEVEDO, B. C.; TALEB-CONTINI, S. H.; BARTOLOMEU, A. C.; HONORATO, F. B.; MARTINEZ, E. Z.; PEREIRA, A. M. Eugenia punicifolia (Kunth) DC. as an adjuvant treatment for type-2 diabetes mellitus: a non-controlled, pilot study. **Phytother Res**, v. 28, n. 12, p. 1816-21, 2014.

SARKAR, A.; ROHANI, S. Molecular salts and co-crystals of mirtazapine with promising physicochemical properties. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 110, p. 93-99, 2015.

SATHORNSUMETEE, S.; REARDON, D. A.; DESJARDINS, A.; QUINN, J. A.; VREDENBURGH, J. J.; RICH, J. N. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. **Cancer**, v. 110, n. 1, p. 13-24, Jul 1 2007.

SCHERER, H. J. A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas. **Journal of neurology and psychiatry**, v. 3, n. 2, p. 147-77, 1940.

SEIBERT, H.; MASER, E.; SCHWEDA, K.; SEIBERT, S.; GULDEN, M. Cytoprotective activity against peroxide-induced oxidative damage and cytotoxicity of flavonoids in C6 rat glioma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2398-407, 2011.

SEKIGUCHI, K.; OBI, N.; UEDA, Y. Studies on Absorption of Eutectic Mixture. II. Absorption of fused Conglomerates of Chloramphenicol and Urea in Rabbits. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 12, n. 2, p. 134-144, 1964.

SEO, J. H.; PARK, J. B.; CHOI, W.-K.; PARK, S.; SUNG, Y. J.; OH, E.; BAE, S. K. Improved oral absorption of cilostazol via sulfonate salt formation with mesylate and besylate. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 3961, 2015.

SHAH, B.; KHUNT, D.; MISRA, M.; PADH, H. Non-invasive intranasal delivery of quetiapine fumarate loaded microemulsion for brain targeting: Formulation, physicochemical and pharmacokinetic consideration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 196-207, 2016.

SHARMA, V.; JOSEPH, C.; GHOSH, S.; AGARWAL, A.; MISHRA, M. K.; SEN, E. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 9, p. 2544-53, Sep 2007.

SHINDE, R. L.; DEVARAJAN, P. V. Docosahexaenoic acid-mediated, targeted and sustained brain delivery of curcumin microemulsion. **Drug delivery**, v. 24, n. 1, p. 152-161, 2017.

SHINGAKI, T.; INOUE, D.; FURUBAYASHI, T.; SAKANE, T.; KATSUMI, H.; YAMAMOTO, A.; YAMASHITA, S. Transnasal delivery of methotrexate to brain tumors in rats: a new strategy for brain tumor chemotherapy. **Molecular pharmaceuticals**, v. 7, n. 5, p. 1561-8, 2010.

SIEGELIN, M. D.; REUSS, D. E.; HABEL, A.; HEROLD-MENDE, C.; VON DEIMLING, A. The flavonoid kaempferol sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by proteasomal degradation of survivin. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 11, p. 3566-74, 2008.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.

SOOD, S.; JAIN, K.; GOWTHAMARAJAN, K. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 113, p. 330-7, Jan 1 2014.

SRINIVAS RAGHAVAN, B.; KONDATH, S.; ANANTANARAYANAN, R.; RAJARAM, R. Kaempferol mediated synthesis of gold nanoparticles and their cytotoxic effects on MCF-7 cancer cell line. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1966-1976, 2015/11/01/ 2015.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 879-84, 2008.

SZAKACS, G.; PATERSON, J. K.; LUDWIG, J. A.; BOOTH-GENTHE, C.; GOTTESMAN, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 3, p. 219-34, 2006.

TACHIBANA, T.; NAKAMURA, A. A method for preparing an aqueous colloidal dispersion of organic materials by using water-soluble polymers: Dispersion of  $\beta$ -carotene by polyvinylpyrrolidone. **Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere**, v. 203, n. 2, p. 130-133, 1965/06/01 1965.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 109, p. 303-18, 2004.

TAHARA, K.; SAKAI, T.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 354, n. 1-2, p. 210-6, 2008.

TELANG, D.; PATIL, A.; PETHE, A.; TATODE, A.; SRIDHAR, A.; DAVE, V. **Kaempferol-Phospholipid Complex: Formulation, and Evaluation of Improved Solubility, In Vivo Bioavailability, and Antioxidant Potential of Kaempferol**. 2016. 89

TIAN, X. J.; YANG, X. W.; YANG, X.; WANG, K. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1-2, p. 58-64, Feb 9 2009.

TZENG, C. W.; YEN, F. L.; WU, T. H.; KO, H. H.; LEE, C. W.; TZENG, W. S.; LIN, C. C. Enhancement of dissolution and antioxidant activity of kaempferol using a nanoparticle engineering process. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 9, p. 5073-80, 2011.

VAN DONGEN, M. C.; VAN ROSSUM, E.; KESSELS, A. G.; SIELHORST, H. J.; KNIPSCHILD, P. G. The efficacy of ginkgo for elderly people with dementia and age-associated memory impairment: new results of a randomized clinical trial. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 48, n. 10, p. 1183-94, 2000.

VAN MEIR, E. G.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D.; SHU, H. K.; WEN, P. Y.; OLSON, J. J. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-93, May-Jun 2010.

VAN WOENSEL, M.; WAUTHOZ, N.; ROSIERE, R.; AMIGHI, K.; MATHIEU, V.; LEFRANC, F.; VAN GOOL, S. W.; DE VLEESCHOUWER, S. Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM? **Cancers**, v. 5, n. 3, p. 1020-48, 2013.



VASCONCELOS, T.; MARQUES, S.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Amorphous solid dispersions: Rational selection of a manufacturing process. **Advanced drug delivery reviews**, v. 100, p. 85-101, 2016/05/01/ 2016.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23-24, p. 1068-1075, 2007.

VINOGRADOV, S. V.; BRONICH, T. K.; KABANOV, A. V. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 1, p. 135-47, 2002.

VO, C. L.; PARK, C.; LEE, B. J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 85, n. 3 Pt B, p. 799-813, 2013.

VYAS, T. K.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K.; SINGH, S.; MISRA, A. Preliminary brain-targeting studies on intranasal mucoadhesive microemulsions of sumatriptan. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, 2006.

VYAS, T. K.; SHAHIWALA, A.; MARATHE, S.; MISRA, A. Intranasal drug delivery for brain targeting. **Current Drug Delivery**, v. 2, n. 2, p. 165-75, 2005.

WANG, S.; CHEN, P.; ZHANG, L.; YANG, C.; ZHAI, G. Formulation and evaluation of microemulsion-based in situ ion-sensitive gelling systems for intranasal administration of curcumin. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 10, p. 831-40, 2012.

WANG, W.; KANG, Q.; LIU, N.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; LI, H.; ZHAO, B.; CHEN, Y.; LAN, Y.; MA, Q.; WU, Q. Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion. **Fitoterapia**, v. 102, p. 189-97, 2015.

XIE, Y.; LUO, H.; DUAN, J.; HONG, C.; MA, P.; LI, G.; ZHANG, T.; WU, T.; JI, G. Phytic acid enhances the oral absorption of isorhamnetin, quercetin, and kaempferol in total flavones of Hippophae rhamnoides L. **Fitoterapia**, v. 93, p. 216-25, Mar 2014.

XU, W.; WEN, M.; YU, J.; ZHANG, Q.; POLYAKOV, N. E.; DUSHKIN, A. V.; SU, W. Mechanochemical preparation of kaempferol intermolecular complexes for enhancing the solubility and bioavailability. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 44, n. 12, p. 1924-1932, 2018.

YANG, F.; RIEDEL, R.; DEL PINO, P.; PELAZ, B.; SAID, A. H.; SOLIMAN, M.; PINNAPIREDDY, S. R.; FELIU, N.; PARAK, W. J.; BAKOWSKY, U.; HAMPP, N. Real-time, label-free monitoring of cell viability based on cell adhesion measurements

with an atomic force microscope. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 017-0256, 2017.

YANG, L.; GAO, S.; ASGHAR, S.; LIU, G.; SONG, J.; WANG, X.; PING, Q.; ZHANG, C.; XIAO, Y. Hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for delivery of curcuminoid and its in vitro evaluation in glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1391-401, 2015.

YANG, R. Y.; LIN, S.; KUO, G. Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 1, p. 275-9, 2008.

YANG, Y.; BAI, L.; LI, X.; XIONG, J.; XU, P.; GUO, C.; XUE, M. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: an evaluation using the blood-brain barrier cell and Caco-2 cell models. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 3, p. 388-96, Apr 2014.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant foods for human nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113-22, 2004.

ZHANG, K.; GU, L.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.; ZHAO, L.; BI, K.; CHEN, X. Preparation and evaluation of kaempferol-phospholipid complex for pharmacokinetics and bioavailability in SD rats. **J Pharm Biomed Anal**, v. 114, p. 168-75, 2015.

ZHANG, Q.; WU, D.; WU, J.; OU, Y.; MU, C.; HAN, B. Improved blood-brain barrier distribution: effect of borneol on the brain pharmacokinetics of kaempferol in rats by in vivo microdialysis sampling. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, p. 270-7, 2015.

ZHANG, Y.; CHEN, A. Y.; LI, M.; CHEN, C.; YAO, Q. Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **Journal of Surgical Research**, v. 148, n. 1, p. 17-23, 2008.

ZHAO, G.; DUAN, J.; XIE, Y.; LIN, G.; LUO, H.; LI, G.; YUAN, X. Effects of solid dispersion and self-emulsifying formulations on the solubility, dissolution, permeability and pharmacokinetics of isorhamnetin, quercetin and kaempferol in total flavones of Hippophae rhamnoides L. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 7, p. 1037-45, Jul 2013.

ZHU, L.; MA, J.; JIA, N.; ZHAO, Y.; SHEN, H. Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-fluorouracil: preparation, characterization and cytotoxicity studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, n. 1, p. 1-6, 2009.





Tabela 1. Variáveis no planejamento experimental Box-Behnken.

Fator	Baixo (-)	Alto(+)	Ponto Central
Triglicerídeos de cadeia média (%)	8	20	14
Lecitina de ovo (%)	1	5	3,5
Polissorbato 80 (%)	1	3	2

Tabela 2. Respostas obtidas através do planejamento experimental Box-Behnken.

TCM (%)	Lecitina (%)	Polisorbato 80 (%)	Content (%)	Size (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
20	5	2	88,36	131,23	0,19	-15,57
14	2	1	88,15	145,20	0,18	-10,60
8	5	2	94,91	123,53	0,36	-10,83
8	2	2	89,56	131,53	0,39	-11,37
20	3,5	3	93,76	141,93	0,29	-11,97
14	5	3	86,32	128,80	0,34	-11,27
14	3,5	2	91,79	138,33	0,31	-15,93
20	3,5	1	83,65	155,27	0,11	-9,99
14	2	3	88,57	118,13	0,35	-17,47
20	2	2	89,77	132,70	0,19	-15,87
14	5	1	88,08	126,70	0,19	-10,73
14	3,5	2	87,66	116,83	0,28	-8,12
8	3,5	1	85,51	123,00	0,35	-11,77
14	3,5	2	85,52	148,70	0,24	-11,33
8	3,5	3	85,22	190,90	0,42	-34,00

Figura 1. Resultados da análise estatística obtidos através do Software Minitab ®16.

**Regressão de Superfície de Resposta: Size (nm) versus TCM (%); Lecitin (%); Polisorbate 80**

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	3462,62	384,74	1,37	0,380
Linear	3	154,60	51,53	0,18	0,903
TCM (%)	1	7,67	7,67	0,03	0,875
Lecitin (%)	1	37,41	37,41	0,13	0,730
Polisorbate 80 (%)	1	109,52	109,52	0,39	0,559
Quadrado	3	1434,96	478,32	1,71	0,280
TCM (%)*TCM (%)	1	305,57	305,57	1,09	0,344
Lecitin (%)*Lecitin (%)	1	720,54	720,54	2,57	0,170
Polisorbate 80 (%)*Polisorbate 80 (%)	1	302,78	302,78	1,08	0,346
Interação com 2 Fatores	3	1873,06	624,35	2,23	0,203
TCM (%)*Lecitin (%)	1	10,67	10,67	0,04	0,853
TCM (%)*Polisorbate 80 (%)	1	1649,71	1649,71	5,89	0,060
Lecitin (%)*Polisorbate 80 (%)	1	212,67	212,67	0,76	0,424
Erro	5	1401,13	280,23		
Falta de ajuste	3	872,73	290,91	1,10	0,508
Erro puro	2	528,40	264,20	*	*
Total	14	4863,76			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
16,7400	71,19%	19,34%	0,00%

**Regressão de Superfície de Resposta: PDI versus TCM (%); Lecitin (%); Polisorbate 80 (%)**

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,112951	0,012550	19,06	0,002
Linear	3	0,107952	0,035984	54,64	0,000
TCM (%)	1	0,068204	0,068204	103,56	0,000
Lecitin (%)	1	0,000080	0,000080	0,12	0,741
Polisorbate 80 (%)	1	0,039668	0,039668	60,23	0,001
Quadrado	3	0,001486	0,000495	0,75	0,567
TCM (%)*TCM (%)	1	0,000909	0,000909	1,38	0,293
Lecitin (%)*Lecitin (%)	1	0,000458	0,000458	0,70	0,442
Polisorbate 80 (%)*Polisorbate 80 (%)	1	0,000006	0,000006	0,01	0,926
Interação com 2 Fatores	3	0,003514	0,001171	1,78	0,267
TCM (%)*Lecitin (%)	1	0,000361	0,000361	0,55	0,492
TCM (%)*Polisorbate 80 (%)	1	0,003099	0,003099	4,71	0,082
Lecitin (%)*Polisorbate 80 (%)	1	0,000054	0,000054	0,08	0,787
Erro	5	0,003293	0,000659		
Falta de ajuste	3	0,000976	0,000325	0,28	0,839
Erro puro	2	0,002317	0,001158	*	*
Total	14	0,116244			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0256624	97,17%	92,07%	82,08%

## Regressão de Superfície de Resposta: Content (%) versus TCM (%); Lecitin (%); Polisorbate

### Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	78,219	8,6910	0,70	0,697
Linear	3	9,332	3,1108	0,25	0,858
TCM (%)	1	0,015	0,0150	0,00	0,974
Lecitin (%)	1	0,326	0,3255	0,03	0,878
Polisorbate 80 (%)	1	8,992	8,9919	0,73	0,433
Quadrado	3	29,194	9,7312	0,79	0,551
TCM (%)*TCM (%)	1	2,314	2,3140	0,19	0,684
Lecitin (%)*Lecitin (%)	1	8,708	8,7082	0,70	0,440
Polisorbate 80 (%)*Polisorbate 80 (%)	1	15,941	15,9412	1,29	0,308
Interação com 2 Fatores	3	39,693	13,2309	1,07	0,441
TCM (%)*Lecitin (%)	1	11,429	11,4289	0,92	0,381
TCM (%)*Polisorbate 80 (%)	1	27,071	27,0714	2,18	0,199
Lecitin (%)*Polisorbate 80 (%)	1	1,192	1,1924	0,10	0,769
Erro	5	61,951	12,3902		
Falta de ajuste	3	41,670	13,8899	1,37	0,448
Erro puro	2	20,281	10,1406	*	*
Total	14	140,170			

### Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
3,51997	55,80%	0,00%	0,00%

## Otimização da Resposta: PDI; Size (nm)

### Parâmetros

Resposta	Meta	Inferior	Alvo	Superior	Peso	Importância
PDI	Mínimo		0,109	0,417	1	1
Size (nm)	Mínimo	116,833		190,900	1	1

### Solução

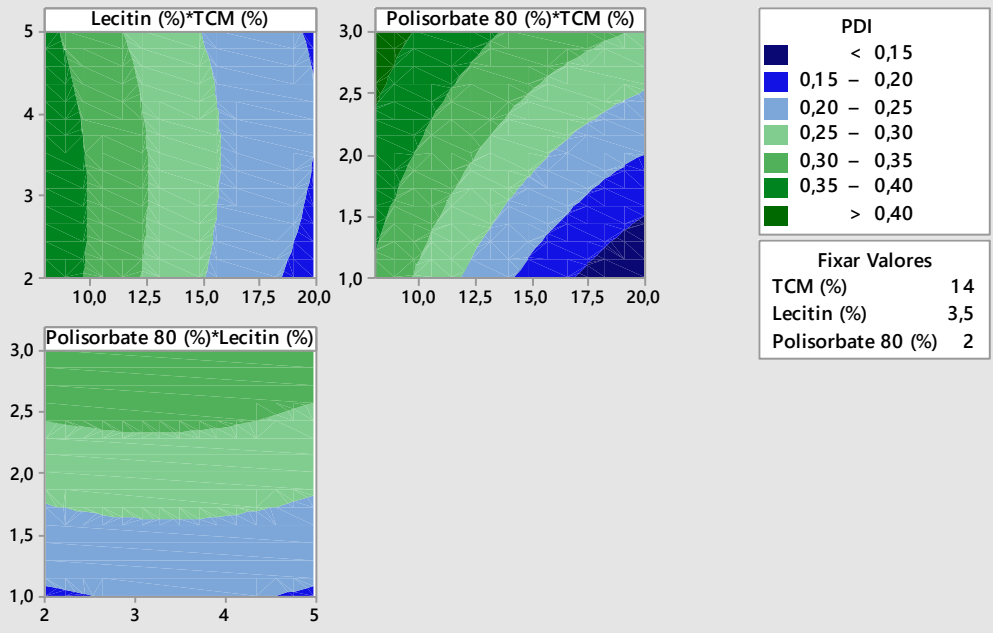
Solução	TCM (%)	Lecitin (%)	Polisorbate 80 (%)	PDI Ajuste	Size (nm) Ajuste	Desirability Composta
1	15,8788	5	1	0,161302	124,010	0,866442

### Predição de Múltiplas Respostas

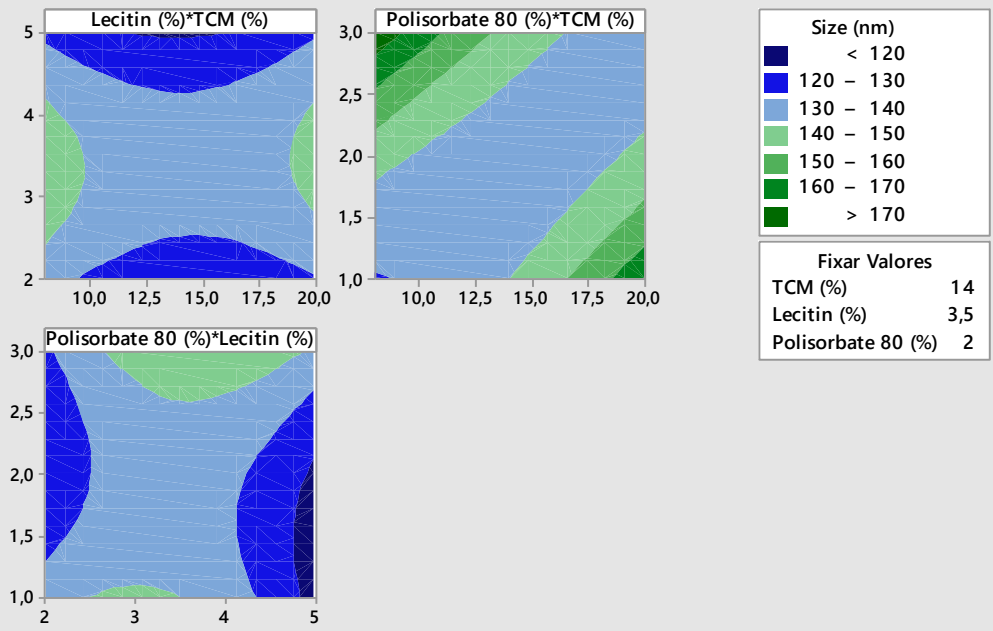
Variável	Configurações
TCM (%)	15,8788
Lecitin (%)	5
Polisorbate 80 (%)	1

Resposta	Ajuste	EP do Ajustado	IC de 95%	IP de 95%
PDI	0,1613	0,0228	(0,1027; 0,2199)	(0,0731; 0,2495)
Size (nm)	124,0	14,9	( 85,8; 162,2)	( 66,4; 181,6)

### Gráficos de Contorno de PDI



### Gráficos de Contorno de Size (nm)







**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 31218

**Título:** DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO KAEMPFEROL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

**Vigência:** 28/04/2016 à 31/12/2018

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI - coordenador desde 28/04/2016  
LETICIA SCHERER KOESTER - coordenador desde 28/04/2016  
MARIANA COLOMBO - A uno de Doutorado desde 28/04/2016

**Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 29/08/2016 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO - UFRGS- AV. PAULO DA GAMA, 110 BAIRRO FARROUPILHA, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 101 ratos Wistar machos, de 8 a 9 semanas, pesando entre 220 e 300 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.**

Porto Alegre, Sexta-Feira, 9 de Setembro de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética