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

Fração contendo alto teor de isoflavonas da soja: obtenção e multicomplexação com ciclodextrina

FRANCINI KIYONO JORGE YATSU

PORTO ALEGRE, 2014

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

Fração contendo alto teor de isoflavonas da soja: obtenção e multicomplexação com ciclodextrina

Tese apresentada por Francini Kiyono Jorge Yatsu para obtenção do GRAU DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Valquiria Linck Bassani
Co-orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Letícia Scherer Koester

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.07.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

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

Prof. Dr. Paulo Henrique Schneider
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior
Universidade Federal do Amazonas

Yatsu, Francini K. J.
Fração contendo alto teor de isoflavonas da soja: obtenção e multicomplexação com ciclodextrina / Francini K. J. Yatsu. -- 2014.
228 f.

Orientador: Valquiria L. Bassani.
Coorientador: Letícia S. Koester.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Isoflavonas. 2. Daidzeína, gliciteína e genisteína. 3. Ciclodextrinas. 4. Multicomplexação. 5. Células Caco-2. I. Bassani, Valquiria L., orient. II. Koester, Letícia S., coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES e do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Valquiria Linck Bassani pela oportunidade concedida e pela confiança em mim depositada. Também agradeço pela orientação, pelos conhecimentos compartilhados, pela sinceridade e, principalmente, pela paciência.

À Profª. Drª.Letícia S. Koester pela orientação, pela atenção concedida e pela disponibilidade.

Ao meu marido Marcus Vinícius Rocha Guimarães, pelo amor, pelo apoio incondicional, motivação e compreensão nos momentos de dificuldade. À minha filha Valentina por ter me abençoado inesperadamente com a sua chegada durante o doutorado. Sua presença iluminou os meus dias. A vocês dois, também peço desculpas pelas ausências frequentes, principalmente, nos finais de semana.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico: Juliana Bidone, Juliana Carini, Sara Elis, Letícia, Silvana, Thaís, Regina, Débora, Cristiane, Vinícius, Samuel e Leandro; e a minha de todas as horas Fernanda Salazar.

Aos meus pais, Neusa e Rauro, pelo amor e confiança, e à minha irmã Juliana pela amizade e apoio.

Aos meus sogros Marina Rocha Guimarães e Joaquim da Rocha Guimarães que me acolheram prontamente em seus corações.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido ao longo deste trabalho.

RESUMO

Fração contendo alto teor de isoflavonas da soja: obtenção e multicomplexação com ciclodextrina

O presente trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de uma fração enriquecida em isoflavonas de *Glycine max* (soja), na forma de agliconas (IEF), e sua associação simultânea a ciclodextrina; caracterização físico-quimica da fração e dos complexos sólidos correspondentes, e avaliação de sua permeabilidade intestinal *in vitro* em modelo de membrana artificial paralela (PAMPA) e celular (Caco-2). Para a avaliação qualitativa e quantitativa das agliconas em diferentes matrizes, foi desenvolvido e validado um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando como fase estacionária coluna Phenomenex RP-18 e como fase móvel mistura de acetonitrila:ácido trifluoracético (100:0,01, v/v). O método desenvolvido demonstrou ser rápido, versátil, preciso, seletivo, específico e aplicável à determinação do teor das agliconas presentes em diferentes matrizes. A fração enriquecida em agliconas foi obtida a partir de um extrato seco de soja, por meio de extração com etanol, seguida de hidrólise ácida dos glicosídeos, cristalização das agliconas por adição de antissolvente e purificação por recristalização em etanol. A caracterização física, fisico-química e química das isoflavonas presentes nesta fração enriquecida foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), granulometria por difração a *Laser,* difratometria de raios X em pós (DRX), espectroscopia em infravermelho com tranformada de Fourier (FT-IR), ressonâcia magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^{1}H) e carbono (^{13}C), espectroscopia na região do ultravioleta (UV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise por CLAE, estabilidade frente ao calor e luz ultravioleta (UVC) e solubilidade aparente em água. A fração apresentou um elevado conteúdo de agliconas (próxima a 90%), baixa solubilidade em água e sensibilidade ao calor e à luz UV. A partir dessa fração, foram preparados complexos sólidos com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) empregando-se as técnicas de complexação em pasta/micro-ondas, liofolização, co-evaporação, *spray drying* e em micro-ondas. Os complexos sólidos preparados com HPβCD apresentaram solubilidade superior à fração e os resultados da caracterização físico-química sugerem, fortemente, a formação simultânea de complexos de inclusão e de associação entre as três isoflavonas e a HPβCD. Por fim, foi avaliada a permeabilidade intestinal *in vitro* dos complexos e de IEF em células Caco-2 e PAMPA. Os resultados obtidos indicam que a permeação da daidzeína e da genisteína ocorre predominantemente via transporte ativo, enquanto e permeação de gliciteína ocorre predominantemente via difusão passiva. Da mesma forma, sugere-se que a daidzeína e a genisteína possam compartilhar o mesmo sistema de transporte. A complexação de IEF com HPβCD causou um efeito negativo sobre a permeabilidade intestinal das isoflavonas, excetuando-se os complexos preparados por *spray drying,* os quais apresentaram uma melhora significativa da permeabilidade da genisteína ($p < 0,05$) e não modificaram a permeabilidade da daidzeína e gliciteína.

Palavras-chave: células Caco-2, ciclodextrinas, isoflavonas, daidzeína, gliciteína e genisteína, multicomplexação

ABSTRACT

Fraction containing high content of soy isoflavones: development and multicomplexation with cyclodextrin

The present work was designed to prepare a fraction enriched with soy isoflavone aglycones (IEF) and to characterize their physicochemical properties. Subsequently, its association with cyclodextrins was evaluated and the solid complexes, obtained by different methods, were characterized. Moreover, their *in vitro* permeability in Caco-2 cell permeability assay and parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) was also evaluated. At first, it was necessary to develop and validated a high performance liquid chromatography (HPLC) method of analysis for the quantification of isoflavone aglycones, using a Phenomenex RP-18 column and trifluoroacetic acid 0.1% (v/v) and acetonitrile:trifluoroacetic acid (100:0.01, v/v) as mobile phase. The developed method proved to be fast, versatile, linear, precise, selective and specific in determining the content of aglycones present in different matrices. The aglycone enriched fraction was obtained, from a soybean dry extract, by extraction with ethanol followed by acid hydrolysis of the glycosides. The aglycones formed were precipitated by antisolvent addition and purified by recrystallization with ethanol. The physico-chemical characterization of the isoflavone enriched fraction was performed by the following analysis: morphology in solid state by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier transformed-infrared spectroscopy (FTIR), proton (^{1}H) and carbon (^{13}C) nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), ultraviolet absorption (UV), differential scanning calorimetry (DSC), aglycone content by HPLC, particle size analysis by laser diffraction, stability against heat and ultraviolet light (UVC) and equilibrium solubility study. The fraction presented a high content of aglycones (90%), low water solubility and sensitivity to heat and UV light. From this fraction, solid complexes were prepared with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) employing the following techniques: kneading/microwave, freeze drying, co-evaporation, spray drying and microwave. Solid complexes prepared with HPβCD showed solubility higher than the fraction and the results of physicochemical characterization strongly suggest the simultaneous formation of inclusion and association complexes between HPβCD and all isoflavones. Finally, after the production and characterization of IEF/HPβCD solid complexes, the permeability of such complexes and IEF were evaluated *in vitro* models: Caco-2 cell and PAMPA. The results of Caco-2 and PAMPA indicate that the permeation of daidzein and genistein occur predominantly via absorptive transport, while the permeation of glycitein is predominantly via passive diffusion. The results also suggest that daidzein and genistein share the same transport system. In general, the complexation of the IF with HPβCD had a negative effect on the isoflavones intestinal permeability. The spray-drying method was the only one that did not impair daidzein and glycitein permeabilities but improved genistein permeability from IF:HPβCD complexes as compared to the respective isoflavones permeabilities from IEF.

Keywords: Caco-2 cell, cyclodextrins, multicomplexation, daidzein, isoflavones, genistein and glycitein

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estrutura molecular das isoflavonas da soja..... 33

Figura 2. Estrutura química (a) e forma toroidal da molécula de β-ciclodextrina..... 40

Figura 3. Formação de complexo de inclusão de uma ciclodextrina com uma molécula pequena (A) e estruturas de complexos de inclusão de ciclodextrina com uma molécula hóspede em diferentes relações estequiométricas (B)..... 41

Figura 4. Perfis de solubilidade segundo a teoria de Higuchi e Connors..... 51

CAPÍTULO 1

Figura 1. (A) Chromatographic profile at 260 nm, (B) diode array spectra 200-400 nm and (C) MS/MS spectra of (1) daidzein, (2) glycitein and (3) genistein..... 92

Figura 2. Chromatographic profiles of (1) daidzein, (2) glycitein and (3) genistein and the corresponding degradation products (D1, D2 and D3), observed after exposition to the stress conditions (A) 1 M NaOH/60°C and (B) 1 M NaOH/UV..... 94

Figura 3. Chromatographic profiles of (A) *Glycine max* beans, (B) *Glycine max* dry extract, (C) blank nanoemulsion and (D) isoflavone aglycone loaded-nanoemulsion..... 95

CAPÍTULO 2

Figura 1. Solvent extraction efficiency at sample:solvent ratio of 1:50 (g/mL) after 8 h of mechanical stirring at room temperature..... 115

Figura 2. Yield of total isoflavones at different sample:solvent proportions after 8 h of mechanical stirring at room temperature..... 115

Figura 3. Yield of total isoflavones as function of time and temperature at sample:solvent ratio of 1:20 (g/mL)..... 116

Figura 4. Acid hydrolysis efficiency at 80°C as function of hydrochloric acid concentration and hydrolysis time…… 117
Figura 5. Recovery of total isoflavone aglycones from the hydrolyzed extract after the antisolvent crystallization process……. 118
Figura 6. Scanning electron microscopy photograph of isoflavone standards daidzein (DAI), glycitein (GLY), genistein (GEN) and enriched fraction (IEF)..... 122
Figura 7. The Differential scanning calorimetry curve isoflavone enriched fraction (IEF) and isoflavone standards daidzein (DAI), glycitein (GLY) and genistein (GEN)…… 123
Figura 8. X-ray diffraction pattern of isoflavone enriched fraction (IEF) and isoflavone standards daidzein (DAI), glycitein (GLY) and genistein (GEN)…….. 123
Figura 9. Total isoflavone aglycone content under acidic, alkali, neutral and oxidative stress conditions at 60°C (A), 24°C (B), 24°C/UVC radiation (C) and 5°C (D)…… 125

CAPÍTULO 3

Figura 1. Phase-solubility diagrams of isoflavone enriched fraction/(2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin and isoflavone enriched fraction/β-cyclodextrin at (A) 24.0 ± 0.01°C and (B) 37.0 ± 0.01°C…….. 148
Figura 2. Photomicrographs obtained by scanning electron microscopy of (A) (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HPβCD), (B) isoflavone enriched fraction (IEF), (C) physical mixture of IEF and HPβCD (1:1), (D) spray-dried IEF/HPβCD complex, (E) freeze-dried IEF/HPβCD complex, (F) kneading/microwaved IEF/HPβCD complex, (G) microwaved IEF/HPβCD complex, and (H) co-evaporated IEF/HPβCD complex…….. 151
Figura 3. The Differential scanning calorimetry curves of (A) (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HPβCD), (B) isoflavone enriched

fraction (IEF), (C) physical mixture of IEF and HPβCD (1:1), (D) freeze-dried IEF/HPβCD complex, (E) spray-dried IEF/HPβCD complex, (F) co-evaporated IEF/HPβCD complex, (G) microwaved IEF/HPβCD complex, and (H) kneading/microwaved IEF/HPβCD complex…….... 152

Figura 4. X-Ray diffractograms of (A) isoflavone enriched fraction (IEF), (B) (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HPβCD), (C) physical mixture of IEF and HPβCD (1:1), (D) freeze-dried IEF/HPβCD complex, (E) spray-dried IEF/HPβCD complex, (F) microwaved IEF/HPβCD complex, (G) kneading/microwaved IEF/HPβCD complex, and (H) co-evaporated IEF/HPβCD complex……. 153

Figura 5. FTIR spectrum (A) isoflavone enriched fraction (IEF), (B) (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HPβCD), (C) physical mixture of IEF and HPβCD (1:1), (D) freeze-dried IEF/HPβCD complex, (E) spray-dried IEF/HPβCD complex, (F) microwaved IEF/HPβCD complex, (G) kneading/microwaved IEF/HPβCD complex, and (H) co-evaporated IEF/HPβCD complex……. 154

Figura 6. Expanded region of 2D-ROESY counter maps of complexes (400 MHz, D_2O). (A) spray-dried IEF/HPβCD complex, (B) freeze-dried IEF/HPβCD complex, (C) microwaved IEF/HPβCD complex, (D) kneading/microwaved IEF/HPβCD complex, and (E) co-evaporated IEF/HPβCD complex…….. 156

Figura A.1. ^{1}H NMR spectra of (A) isoflavone enriched fraction (IEF), (B) spray-dried IEF/HPβCD complex, (C) freeze-dried IEF/HPβCD complex, (D) microwaved IEF/HPβCD complex, (E) kneading/microwaved IEF/HPβCD complex, and (F) co-evaporated IEF/HPβCD complex at 300 K (400 MHz, DMSO-d_6).. 161

CAPÍTULO 4

Figura 1. Plot of PAMPA and Caco-2 P_{app} data for daidzein, glycitein and genistein……. 173

Figura 2. Transport of isolated isoflavones daidzein (DAI), glycitein (GLY) and genistein (GEN); isoflavone enriched fraction (IEF) and its complexes prepared by: spray-drying (SPD), freeze-drying (FD), 174

kneading/microwave (KD), microwave(MW), and co-evaporation (CO-EV) methods through Caco-2 monolayer…….

DISCUSSÃO GERAL

Figura 1. Comlexo de inclusão com inserção do anel B na cavidade da β-ciclodextrina (A) e Comlexo de inclusão com inserção dos anéis AC na cavidade da β-ciclodextrina (B)..... 192

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Propriedades estruturais e fisico-químicas das ciclodextrinas de interesse farmacêutico..... 39

Tabela 2. Produtos farmacêuticos contendo ciclodextrinas..... 42

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Linearity data of the isoflavone aglycones standards…… 96

Tabela 2. Repeatability data of the isoflavone aglycones standards, *Glycine max* beans, *Glycine max* dry extract and isoflavone aglycone loaded-nanoemulsion…… 96

Tabela 3. Intermediary precision data of the isoflavone aglycone standards, *Glycine max* beans, *Glycine max* dry extract and isoflavone aglycone loaded-nanoemulsion…… 97

Tabela 4. Recovery data of the isoflavone aglycone standards, *Glycine max* beans, *Glycine max* dry extract and isoflavone aglycone loaded-nanoemulsion……... 98

Tabela 5. Isoflavone aglycones content in *Glycine max* beans, *Glycine max* dry extract and isoflavone aglycone loaded-nanoemulsion…….. 99

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Content of total isoflavone aglycones in the optimized process of extraction and purification…….. 119

Tabela 2. Equilibrium solubility study…… 122

Tabela 3. Kinetics of degradation of isoflavones submitted to stress conditions…….. 125

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Effect of cyclodextrins on the apparent stability constant and complexation efficiency of corresponding complexes at 24.0 ± 0.01°C. and 37.0 ± 0.01°C…… 148

Tabela 2. Total content of isoflavone in the IEF:HPβCD solid complexes and its water solubility…… 157

Tabela A.1. ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) and ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) spectra data of isoflavone enriched fraction (IEF) and ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) spectral data of IEF/HPβCD complexes…….. 162

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Apparent permeability coefficients and transported fraction of isolated isoflavones, isoflavone enriched fraction and isoflavone enriched fraction complexes prepared by different methods…… 172

LISTA DE ABREVIATURAS

Caco-2	permeabilidade intestinal *in vitro* em modelo de célular
^{13}C	carbono 13
CD	ciclodextrina
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	carboximetilcelulose
DAI	daidzeína
DRX	difratometria de raios X em pós
DSC	calorimetria exploratória diferencial
EC	eficiência de solubilização ou complexação
FT-IR	espectroscopia em infravermelho com tranformada de Fourier
GEN	genisteín
GLI	gliciteína
$G_2\beta CD$	maltosil-β-ciclodextrina ramificada
(1H)	Hidrogênio
HPβCD	2-hidroxipropil-β-ciclodextrina
HPγCD	hidroxipropil-γ-ciclodextrina
IEF	fração enriquecida em isoflavonas de Glycine max (soja) na forma de agliconas
K_c	constante de estabilidade
metilβCD	metil-β-ciclodextrina
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PAMAM	dendrímeros de poli(amido)amina
PAMPA	permeabilidade intestinal in vitro em modelo de membrana artificial paralela
PLGA	poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
PEG	polietilenoglicol
PEO	polioxietileno
PPI	dendrímeros de poli(propileno) imina
PPO	polioxipropileno
PVP	polivinilpirrolidona
RMN	ressonâcia magnética nuclear de hidrogênio e carbono

RMβCD	β-ciclodextrina randomicamente metilada
SBEβCD	sulfobutiléter-β-ciclodextrina
SMEDDS	auto-microemulsionável
SNEDDS	auto-nanoemulsionável
UV	espectroscopia na região do ultravioleta
βCD	β-ciclodextrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral.....	29
2.2	Objetivos específicos.....	29
3	REVISÃO DO TEMA.....	31
CAPÍTULO 1:	Desenvolvimento de um método simplificado por cromatografia líquida para análise de rotina de isoflavonas agliconas em diferentes matrizes complexas.....	75
Publicação 1:	A new simplified and stability indicating liquid chromatography method for routine analysis of isoflavones aglycones in different complex matrices……	77
CAPÍTULO 2:	Desenvolvimento de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas de soja.....	103
Publicação 2:	Preparation, optimization and characterization of a high purity soy isoflavone-aglycone fraction……..	105
CAPÍTULO 3	Complexação múltipla de isoflavonas de *Glycine max* presentes em uma fração enriquecida com ciclodextrina.....	137
Publicação 3:	Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction……	139
CAPÍTULO 4	Permeabilidade intestinal *in vitro* de isoflavonas de soja presentes em fração contendo alto teor de agliconas de seus complexos.....	163
Publicação 4:	*In vitro* intestinal permeability of soy isoflavones aglycones fraction and their complexes with cyclodextrin in Caco-2 cell and PAMPA models……	165
4	DISCUSSÃO GERAL……..	179
5	CONCLUSÕES.....	197
6	ANEXOS.....	202

PREFÁCIO

A presente tese, fruto de uma pesquisa cuidadosamente desenvolvida nos últimos quatro anos, foi dividida em quatro capítulos, os quais foram redigidos no formato de artigos científicos. Dessa forma, a fim de facilitar a compreensão, a figura a seguir apresenta uma visão geral da referida tese.

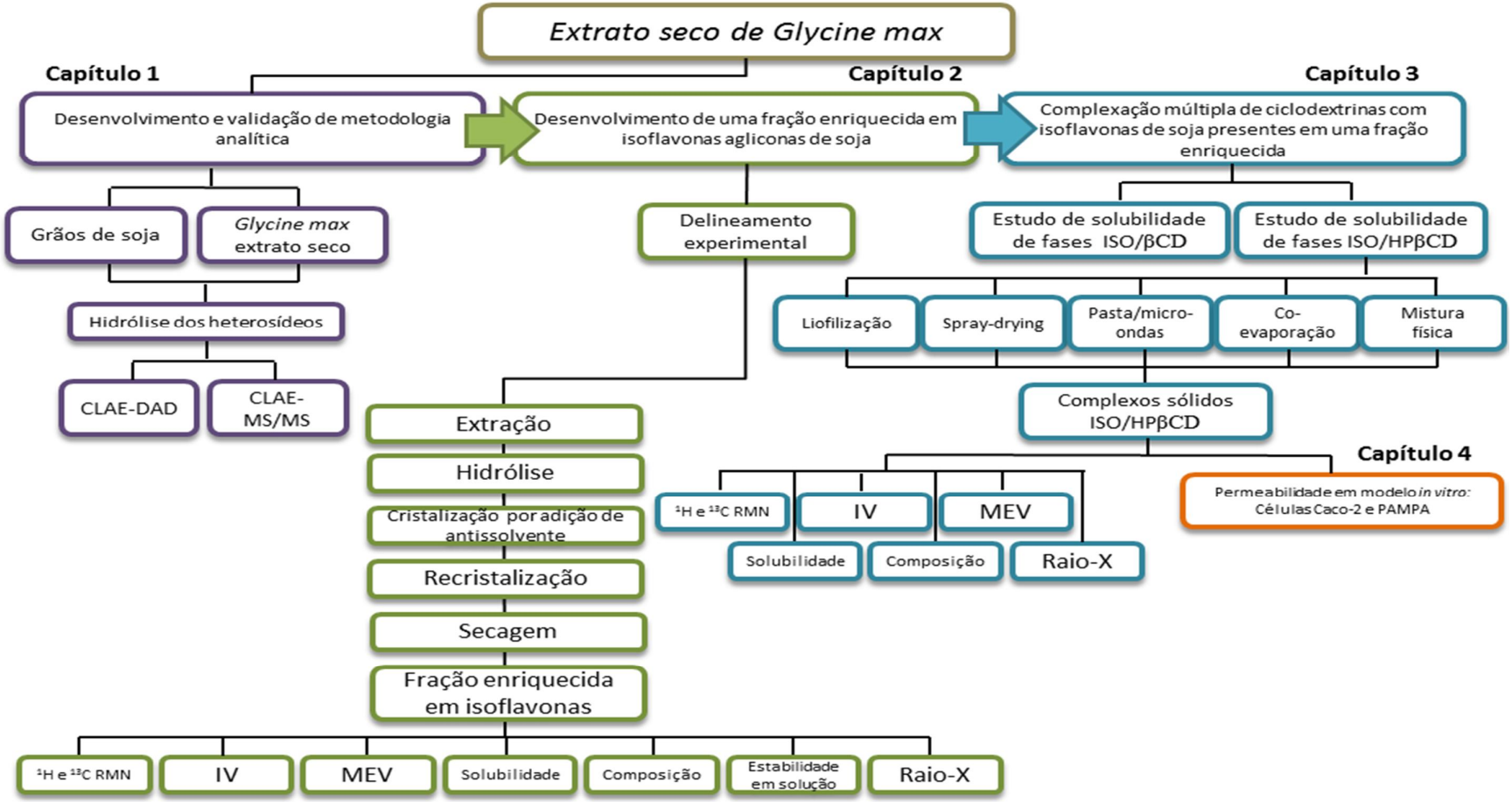


Figura 1. Fluxograma do desenvolvimento da Tese de Doutorado

1 INTRODUÇÃO

As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes à classe dos flavonoides, amplamente distribuídas no reino vegetal. No entanto, as concentrações destes compostos são relativamente maiores em leguminosas e, em particular, na soja (*Glycine max*). As principais isoflavonas presentes na soja estão predominantemente na forma de conjugados glicosídicos (daidzina, genistina e glicitina), sendo a daidzina e a genistina as mais abundantes. Nos produtos fermentados derivados de soja predominam as correspondentes agliconas na forma livre (daidzeína, genisteína e gliciteína) resultantes da ação de glicosidases bacterianas sobre os heterosídeos (Wang et al. 1994; Setchell 1998; Boersma et al. 2001).

A semelhança de sua estrutura com a do esqueleto esteroidal faz com que as isoflavonas sejam capazes de interagir com receptores de estrógenos na maioria dos sistemas biológicos (Setchell et al. 2001), característica que deu origem a sua designação como “fitoestrógeno”. Daí decorre o seu papel importante na prevenção dos sintomas da menopausa, osteoporose, câncer de mama e de próstata (Potter et al. 1998; Han et al. 2002; Peeters et al. 2003; Kumar et al. 2004; Jou et al. 2005). Além disso, Clarkson e colaboradores (1995) têm sugerido que as isoflavonas apresentam tanto atividades agonistas quanto antagonistas sobre os receptores estrogênicos, de modo que estas poderiam ser utilizadas como possível alternativa à terapia hormonal convencional.

A análise de estudos farmacocinéticos têm demonstrado que a absorção das isoflavonas é limitada pela hidrólise inicial da porção glicosídica no intestino e pela baixa solubilidade das agliconas. Após a ingestão de agliconas, as concentrações plasmáticas máximas são atingidas entre 4 a 7 h, e após a ingestão de glicosídeos o tempo médio é retardado para 8 a 11 h. Além de serem absorvidas mais rapidamente, as agliconas também são absorvidas em maiores quantidades. Tais estudos ainda demonstraram que as isoflavonas e seus metabólitos são rapidamente excretados, sendo que a daidzeína e genisteína apresentam um tempo de meia-vida de 9,3 e 7,1 h, respectivamente (Setchell et al. 2001; Zubik et al. 2003).

Em suma, o emprego das isoflavonas da soja como alimento funcional (nutracêuticos) ou como produto farmacêutico apresenta algumas limitações: as relacionadas com a homogeneidade de hidrólise dos heterosídeos no trato intestinal, a baixa hidrossolubilidade das agliconas e reduzida estabilidade em meio aquoso,

além do sabor amargo. (Ungar et al. 2003; Stancanelli et al. 2007). Formulações líquidas contendo isoflavonas facilmente precipitam quando armazenadas por um período prolongado.

Por sua vez, estudos têm demonstrado que as ciclodextrinas são capazes de promover um aumento da hidrossolubilidade de flavonoides, bem como aumento da biodisponibilidade através da formação de complexos de inclusão (Buvári-Barcza et al. 2000; Lee et al. 2007; Borghetti et al. 2009). Além de promoverem o aumento da hidrossolubilidade de moléculas pouco solúveis, complexos de fármacos com ciclodextrinas também têm sido empregados na modulação da sua liberação a partir de sistemas poliméricos, tais como matrizes hidrofílicas de hidroxipropilmetilcelulose (Koester et al. 2004), promovendo assim uma liberação mais constante e controlada.

Desta forma, considerando os conhecimentos científicos existentes sobre as atividades biológicas das isoflavonas, principalmente a sua atividade estrogênica, a sua baixa biodisponibilidade, reduzido tempo de meia-vida e a abundância de matéria prima que lhes dá origem, no caso a soja, torna-se evidente o interesse do desenvolvimento de produtos com fins farmacêuticos, ou como alimentos funcionais, e o uso de estratégias que visem à superação das limitações apresentadas por estas moléculas biologicamente ativas.

Neste contexto, o presente trabalho objetiva desenvolver uma fração padronizada contendo alto teor de isoflavonas da soja, na forma de agliconas, e verificar a viabilidade de sua associação simultânea à ciclodextrina (multicomplexação), utilizando diversos métodos. Os produtos desenvolvidos deverão ser preliminarmente testados no que se refere à permeabilidade intestinal em modelo de células Caco-2 e ensaio de membrana artificial paralela (PAMPA)

2.1. Objetivo geral

Avaliara a permeabilidade intestinal *in vitro* de uma fração padronizada contendo alto teor de isoflavonas-agliconas de *Glycine max* (soja) e de seus respectivos complexos com ciclodextrina.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificar as isoflavonas em diferentes matrizes;
- Desenvolver e caracterizar uma fração enriquecida de isoflavonas da soja, por meio de extração e hidrólise dos heterosídeos correspondentes, e caracterizá-la no que se referem as suas propriedades físicas, físico-químicas e químicas;
- Obter e caracterizar complexos da mistura de agliconas majoritárias daidzeina, gliciteina e genisteína com ciclodextrinas (multicomplexação) por meio de diferentes métodos de complexação e caracterizar as propriedades físico-químicas dos complexos;
- Avaliar a permeabilidade da fração enriquecida e de seus respectivos complexos com ciclodextrinas em modelo de Células Caco-2 e PAMPA.

3 REVISÃO DO TEMA

3.1 Isoflavonas de *Glycine max* (soja)

Como todos os alimentos, a soja contém inúmeros constituintes biologicamente ativos, dentre os quais se destacam as isoflavonas, principais responsáveis pelo grande interesse popular e científico de seus grãos e derivados (Messina 2010).

Até a década de 1990, acreditava-se que as isoflavonas tinham uma distribuição relativamente restrita na natureza, principalmente à família Leguminosae. No entanto, os avanços das técnicas de isolamento e identificação permitiram a detecção de novos isoflavonoides em outras famílias além das leguminosas. Pelo menos 225 isoflavonoides pertencentes a 59 famílias de plantas não leguminosas foram descritas até recentemente (Reynaud et al. 2005; Mackova et al. 2006; Lapcik 2007). Apesar desta distribuição mais ampla, as isoflavonas têm se revelado presentes em maiores concentrações nas leguminosas, com destaque na soja

Doze diferentes isoflavonas foram identificadas na soja diferindo na estrutura química da aglicona ou na parte do açúcar do heterosídeo correspondente. Suas agliconas são denominadas de daidzeína (DAI), genisteína (GEN) e gliciteína (GLI) e os heterosídeos (7-O-glicosídeos) correspondentes são denominados de daidzina, genistina e glicitina, os quais podem estar esterificadas na posição 6″-*O* do anel de glicose com grupos acetil ou malonil, formando outros seis compostos conhecidos como acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitin, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina (Figura 1) (Setchell 1998).

A distribuição e a concentração das diferentes formas de isoflavonas em produtos derivados da soja dependem tanto da variedade de soja quanto do tipo de processamento dos produtos. A soja e a farinha de soja contém, principalmente, 6″-*O*-malonil glicosídeos, enquanto os produtos fermentados, como leite de soja e tofu, contêm principalmente 7-*O*-glicosídeos e agliconas (Barnes et al. 1994; Wang et al. 1994).

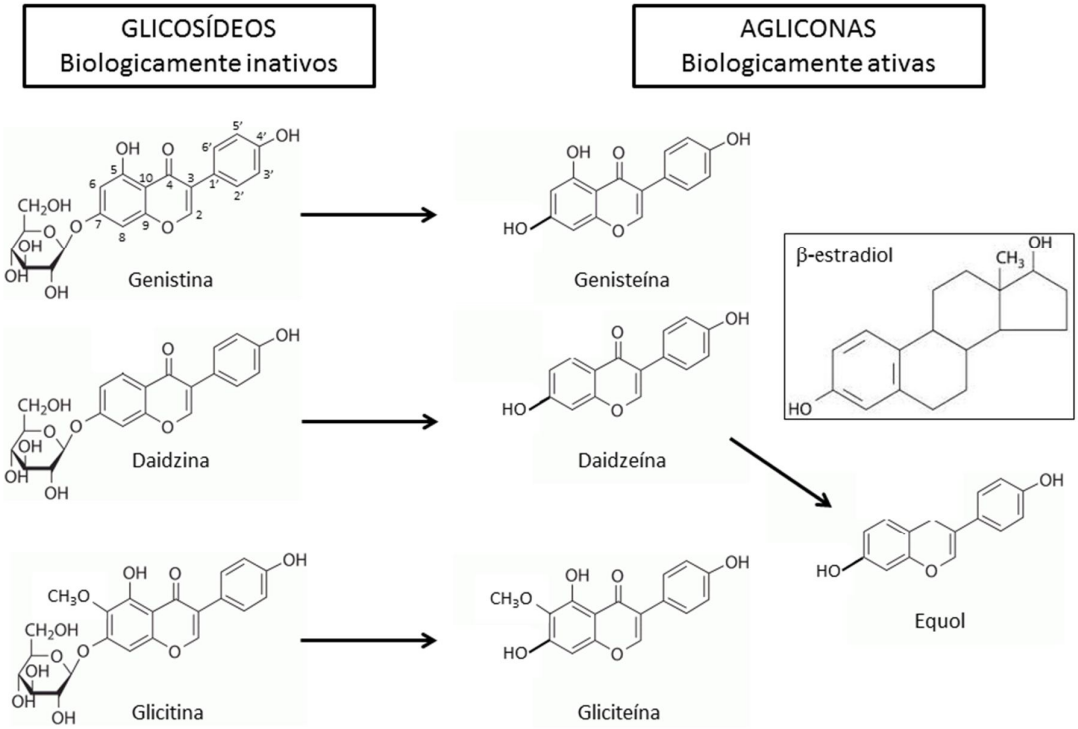


Figura 1. Estrutura molecular das isoflavonas da soja

Figura adaptada de (Cederroth et al. 2009)

Após a ingestão pela via oral, os glicosídeos são hidrolisados a agliconas pelas β-glucosidases presentes ao longo da superfície das vilosidades do intestino delgado e pela microflora residente no intestino grosso (Day et al. 1998; Day et al. 2000; Setchell et al. 2002b). As agliconas, por sua vez, podem ser absorvidas intactas no intestino delgado ou serem metabolizadas pelas bactérias intestinais originando vários outros produtos, incluindo o equol, *p*-etil-fenol (metabólito da genisteína) e *O*-desmetilangolensina (metabólito de daidzeína), os quais serão posteriormente absorvidos (Kelly et al. 1993; Chang et al. 1995; Day et al. 1998).

Após a absorção, as agliconas e os seus metabólitos são transportados para o fígado, onde os microssomos catalisam as reações de hidroxilação e conjugação das isoflavonas com glucuronídeo ou sulfato. Estes, por sua vez, são removidos do plasma, tecidos e órgãos e excretados pela urina ou bile (Heinonen et al. 2003)

No que diz respeito à absorção e à biodisponibilidade das isoflavonas em seres humanos, Izumi et al. (2000) denstraram que as agliconas foram absorvidas

mais rapidamente e em maior extensão do que os seus respectivos glicosídeos após administração oral. Além disso, Setchell et al. (2002b) demonstraram que há diferenças marcantes na farmacocinética dos glicosídeos em comparação as suas respectivas agliconas. O tempo médio para atingir as concentrações plasmáticas máximas ($t_{(max)}$) da genisteína e daidzeína referido é de 5,2 e 6,6 h, respectivamente, enquanto que o $t_{(max)}$ dos respectivos glicosídeos foi retardado para 9,3 e 9,0 h, respectivamente, características coerentes com o tempo de residência necessário para a clivagem hidrolítica da porção glicosídica.

3.1.1 Estabilidade das isoflavonas

Com relação à estabilidade das isoflavonas, Coward et al. (1998), ao avaliar as melhores condições de extração de isoflavonas, a partir de alimentos a base de soja, bem como o efeito do processamento e cozimento desses produtos sobre a composição e concentração das isoflavonas, verificou que a extração a quente com etanol hidrolisava os 6″-*O*-malonil glicosídeos. Além disso, a análise dos alimentos a base de soja por cromatografia líquida em fase reversa acoplada a espectrometria de massas revelou que a farinha de soja desengordurada, não submetida a tratamento térmico, era composta, principalmente, por 6″-*O*-malonil glicosídeos. Em contraste, a farinha de soja torrada continha maiores quantidades de 6″-*O*-acetil glicosídeos, formados a partir da descarboxilação dos grupos malonatos induzida pelo calor.

Posteriormente, Xu et al. (2002) ao investigar a estabilidade das isoflavonas (em estado sólido) em diferentes temperaturas (90 a 215°C) em função tempo, observaram uma redução significativa nas concentrações da daidzina (26%), glicitina (27%) e genistina (27%) após 3 min de exposição à temperatura de 185°C. Na temperatura de 215°C, a redução nas concentrações da daidzina, glicitina e genistina, após 3 e 15 min, foi de 65, 98 e 74% e 91, 99 e 94%, respectivamente, sendo a ordem de estabilidade térmica: glicitina<genistina<daidzina.

Em 2005, Rostagno et al. (2005a) ao avaliar a estabilidade das isoflavonas de soja (agliconas, glicosídeos e 6″-*O*-malonil glicosídeos em etanol 50%) em função do tempo, temperatura, radiação ultravioleta e presença de oxigênio no *head space* do frasco de armazenamento, observaram que as concentrações das isoflavonas armazenadas entre -20 e 10°C permaneceram inalteradas após uma semana de

armazenamento. Além disso, os glicosídeos demonstraram não ser sucetíveis às condições experimentais. A daidzeína e a gliciteína demonstraram ser sensíveis à radiação UV-Vis

3.1.2 Atividades biológicas das isoflavonas

Entre as atividades biológicas descritas na literatura, destaca-se a atividade estrogênica. Muito embora desde 1950 as isoflavonas terem sido amplamente estudadas devido aos relatos sobre seus efeitos estrogênicos em roedores (Cheng et al. 1953; Carter et al. 1954; Cheng et al. 1954), somente cerca de 12 anos mais tarde estes efeitos foram relacionados a sua afinidade pelos receptores estrogênicos (receptor α) (Folman et al. 1966; Folman et al. 1969).

Adlercreutz et al. (1992) foram os primeiros a sugerir que alimentos a base de soja, devido à presença de isoflavonas, eram parcialmente responsáveis pela menor manifestação de sintomas relacionados à menopausa, tais como fogachos, em mulheres asiáticas e japonesas. No entanto, o primeiro estudo a analisar esta hipótese foi publicado somente em 1995 (Murkies et al. 2008). Desde então, mais de 50 ensaios clínicos sobre a eficácia de produtos contendo isoflavona foram conduzidos (Howes et al. 2006).

Em 1995, Clarkson et al. (1995) sugeriram que as isoflavonas possuiam tanto atividades agonistas quanto antagonistas sobre os receptores estrogênicos, de modo que estas poderiam ser utilizadas como possível alternativa à terapia hormonal convencional. Logo depois, Kuiper e colaboradores demonstraram que a genisteína e a daidzeína possuiam afinidade pelos receptores estrogênicos α e β, os quais são expressos nos ovários, útero, cérebro, bexiga, testículos, próstata e pulmões e também nos ossos e sistema cardiovascular; corroborando, assim, os estudos prévios (Kuiper et al. 1996; Kuiper et al. 1997; Kuiper et al. 1998).

Em 1996, o primeiro trabalho referente à atividade das isoflavonas sobre o metabolismo ósseo foi publicado. De acordo com os autores, a genisteína era capaz de suprimir a atividade osteoclástica tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Blair et al. 1996). Logo em seguida, um estudo, com roedores, foi publicado demostrando que proteínas associadas à isoflavonas de soja eram capazes de aumentar a massa óssea, na administração crônica (Arjmandi et al. 1996) e, dois anos mais tarde, o

primeiro estudo clínico com mulheres na pós-menopausa foi publicado (Potter et al. 1998).

Desde então, mais de 30 ensaios examinaram os efeitos de produtos que contêm isoflavonas sobre a densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa. Dentre esses, cabe destacar os estudos epidemiológicos observacionais, os quais examinaram a ligação entre uma dieta rica em fitoestrógenos e a massa óssea e reportaram que a suplementação alimentar com proteína de soja e isoflavonas era efetiva em manter ou aumentar de maneira significativa a massa óssea em mulheres pós-menopausa (Horiuchi et al. 2000; Mei et al. 2001; Greendale et al. 2002).

Estudos em animais e humanos também têm comprovado os efeitos benéficos da suplementação alimentar com soja e derivados frente à diabetes e à obesidade. Tsai e colaboradores observaram, em indivíduos obesos com diabetes tipo 2, que os polissacarídeos da soja eram efetivos em reduzir o aumento dos níveis pós-prandiais de glicose e triglicerídeos. Tais efeitos seriam resultado do aumento nas concentrações de glucagon, peptídeos pancreáticos e somatostatina (Tsai et al. 1987). Em estudo semelhante, Hermansen et al. (2001) verificaram que as isoflavonas associadas às fibras de cotilédone de soja eram capazes de reduzir o colesterol, a polipoproteína B-100 e triglicerídeos em comparação a uma dieta a base de caseína e celulose em pacientes com diabetes tipo 2. Além de reduzir os níveis de colesterol, triglicerídeos e o peso, uma dieta rica em isoflavonas também seria efetiva em reduzir a resistência à insulina e aumentar o controle da glicemia (Jayagopal et al. 2002).

3.1.3 Formas farmacêuticas contendo isoflavonas

Apesar da soja e seus derivados serem ricos em isoflavonas, a biodisponibilidade destas é considerada baixa, pois sofre grande influencia da complexa matriz alimentar, processamento industrial, microflora intestinal, dose ingerida, tempo de trânsito intestinal e solubilidade. Nesta perspectiva, alguns estudos foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a solubilidade e, consequentemente, a biodisponibilidade desses constituintes.

Setchell e colaboradores desenvolveram grânulos de extrato de soja (40-45 % isoflavonas totais, contendo 55-72 % de genistina e genisteína e 6-10 % de

saponinas) por microencapsulação, utilizando como adjuvante uma mistura de etilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose, e avaliaram a sua biodisponibilidade em mulheres pós-menopausa. O objetivo foi o de prolongar a liberação das isoflavonas. A formulação foi capaz de dobrar o tempo médio de residência no trato intestinal, no entanto, a biodisponibilidade das isoflavonas foi significativamente reduzida devido à diminuição da taxa de dissolução das isoflavonas (Setchell et al. 2005).

Em 2006, Motlekar e colaboradores prepararam micropartículas de genisteína e polietilenoglicol (PEG), as quais foram capazes de aumentar significativamente a extensão da dissolução da agliconas (Motlekar et al. 2006). Kwon e colaboradores desenvolveram micelas poliméricas de genisteína a partir de um copolímero tri-bloco composto por polioxietileno (PEO) e polioxipropileno (PPO), cuja biodisponibilidade em ratos foi superior à genisteína na forma de pó (Kwon et al. 2007).

Entre 2008 e 2010, Du et al.(2008), Zhu et al. (2009) e Shen et al. (2010) demonstraram a viabilidade de obtenção de genisteína auto-microemulsionável (SMEDDS), genisteína auto-nanoemulsionável (SNEDDS) e daidzeína-SMEDDS, respectivamente, cujos produtos demonstraram ser capazes de promover o aumento da solubilidade *in vitro.*

No ano seguinte, Tang et al. (2011) relataram a preparação de nanopartículas de genisteína pela técnica nanoprecipitação usando Eudragit® E100 a fim de melhorar a biodisponibilidade oral de genisteína. Segundo os autores, após a administração de uma dose única de 100 mg/kg de nanopartículas de genisteína ou de uma suspensão de genisteína a ratos em jejum, a biodisponibilidade relativa da genisteína, a partir das nanopartículas em comparação à suspensão de referência, foi 241,8%.

Mais recentemente, Ma et al. (2012) referem a preparação de nanopartículas de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) carregadas com complexos de daidzeína e hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) (D-CNPs) e nanopartículas de PLGA carregadas com complexos de fosfolipídios e daidzeína (D-PNPs) com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade da daidzeína. Os estudos farmacocinéticos demonstraram que, após a administração oral das nanopartículas de D-PNPs e D-CNPs aos ratos, numa dose de 10 mg/kg, a biodisponibilidade relativa foi aumentada cerca de 5,57 e 8,85 vezes, respectivamente, em comparação a uma suspensão de daidzeína.

Os estudos acima citados demonstram que o aumento da solubilidade das isoflavonas é capaz de promover de maneira efetiva o aumento da sua biodisponibilidade, e que a sua associação a polímeros hidrofílicos pode aumentar o tempo de residência das isoflavonas no corpo. Nesse contexto, estudos têm demonstrado que as ciclodextrinas são capazes de promover um aumento da hidrossolubilidade de flavonoides, bem como aumento da biodisponibilidade através da formação de complexos de inclusão (Buvári-Barcza et al. 2000; Lee et al. 2007; Borghetti et al. 2009).

3.2 Ciclodextrinas

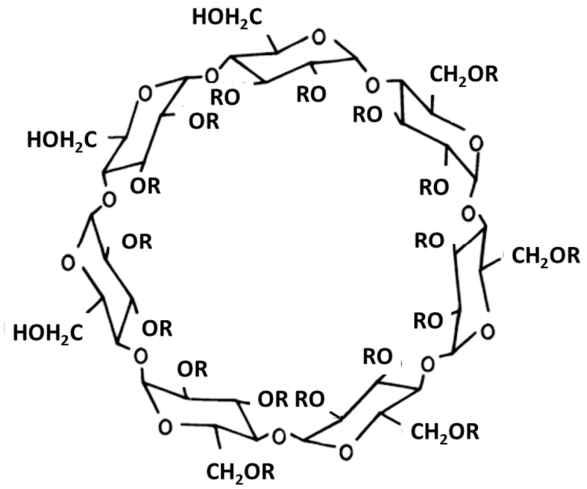
Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos derivados do amido contendo seis (αCD), sete (βCD), oito (γCD), nove (δCD), 10 (εCD) ou mais unidades de α-D-glicopiranose ligadas por ligações do tipo α-1→4. Foram primeiramente descritas por Villiers em 1891. No entanto, foi Schardinger quem identificou tanto a α quanto a β-ciclodextrina (βCD) entre 1903-1911. Em 1930, Freudenberg e colaboradores identificaram a γ-ciclodextrina e caracterizaram as ciclodextrinas como oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glucose. Mais tarde, Cramer e colaboradores descreveram a sua capacidade para formar complexos de inclusão e, no início dos anos 1950, as características físico-químicas básicas das CDs foram descobertas, incluindo a sua capacidade para solubilizar e estabilizar moléculas bioativas (Singh et al. 2002).

A primeira patente relacionada às CDs foi requerida por Freudenberg, Cramer e Plieninger em 1953. No entanto, as ciclodextrinas em sua forma isolada e adequada para aplicações farmacêuticas só se tornaram disponíveis 25 anos mais tarde, sendo o primeiro produto farmacêutico contendo ciclodextrinas comercializado no Japão (comprimidos sublinguais contendo prostaglandina E2/β-ciclodextrina). Doze anos depois, comprimidos contendo piroxicam/β-ciclodextrina foram comercializados na Itália por Chiesi Farmaceutici e, somente em 1997, a primeira formulação contendo CD foi introduzida no mercado Americano (USA) (itraconazol/2-hidroxipropil-β-ciclodextrina solução oral) (Loftsson et al. 2007).

A descoberta que a substituição de qualquer uma das hidroxilas, mesmo por porções hidrofóbicas, resultava em aumento significativo na sua solubilidade em água fez com que diversos derivados semissintéticos tenham sido produzidos e

utilizados numa variedade de produtos industriais. As CDs semissintéticas de maior interesse farmacêutico incluem os derivados da βCD e γCD: hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD), hidroxipropil-γ-ciclodextrina (HPγCD), β-ciclodextrina randomicamente metilada (RMβCD), sulfobutiléter-β-ciclodextrina (SBEβCD) e maltosil-β-ciclodextrina ramificada (G_2βCD) (Tabela 1) (Loftsson et al. 2007).

Tabela 1. Propriedades estruturais e fisico-químicas das ciclodextrinas de interesse farmacêutico



Ciclodextrinas	R = H ou	MM[a] (Da)	Solubilidade em água[b] (mg/mL)
α-ciclodextrina (α -CD)	-H	972	145
β-ciclodextrina (β-CD)	-H	1.135	18,5
2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD)	$-CH_2CHOHCH_3$	1.400	>600
Sulfobutiléter-β-ciclodextrina (SBE-β-CD)	$-(CH_2)SO_3^-Na^+$	2.163	>500
β-ciclodextrina randomicamente metilada (RM-β-CD) sal sódico	$-CH_3$	1.312	>500
6-O-maltosil-β-ciclodextrina (G_2-β-CD)	-maltosil$^-$	1.459	>1.500
γ-ciclodextrina (γ-CD)	-H	1.297	232
2-hidroxipropil-γ-ciclodextrina (HP-γ-CD)	$-CH_2CHOHCH_3$	1.576	>500

[b] MM: massa molecular

[a] Solubilidade em água a 25 °C

As informações listadas nesta tabela baseiam-se parcialmente na referência: (Brewster et al. 2007)

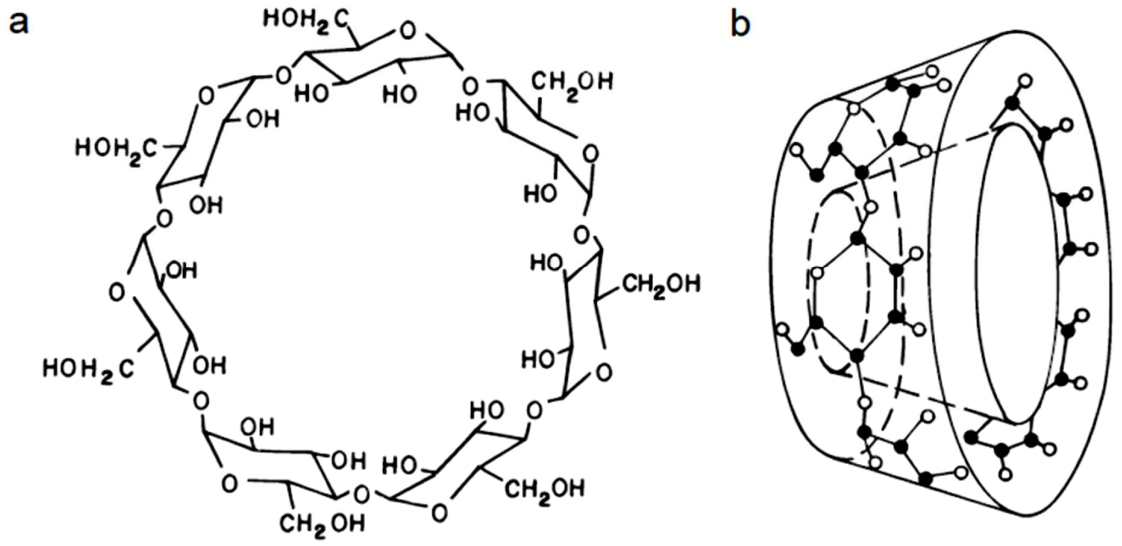


Figura 2. Estrutura química (a) e forma toroidal da molécula de β-ciclodextrina. Figura adaptada de (Loftsson et al. 1996)

Devido à conformação de cadeira das unidades de glucopiranoses, as CDs possuem a forma de um cone truncado ou toroidal. Dessa forma, suas hidroxilas ficam orientadas para o exterior do cone, sendo que hidroxilas primárias dos açúcares ficam dispostas na porção mais estreita do cone e as secundárias na porção mais ampla, formando, assim, uma cavidade central com caráter relativamente lipofílico. Em soluções aquosas, as hidroxilas formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água circundantes, resultando em uma camada de hidratação ao redor da molécula de CD dissolvida (Szejtli 1998). Dessa forma, a cavidade lipofílica das moléculas de ciclodextrina fornece um microambiente no qual moléculas não polares com tamanho adequado podem ser inseridas total ou parcialmente para formar um complexo de inclusão (Figura 2).

Além da formação de complexos na proporção de uma molécula de CD para uma molecula hóspede (1:1), complexos com outras relações estequiometrias também têm sido identificados, isto é, complexos de ordem superior, com moléculas hóspedes encapsuladas por mais de uma CD (2:1) e complexos de ordem mais baixa, onde uma molécula de CD interage com mais de uma molécula hóspede (1:2) (Figura 3) (van de Manakker et al. 2009).

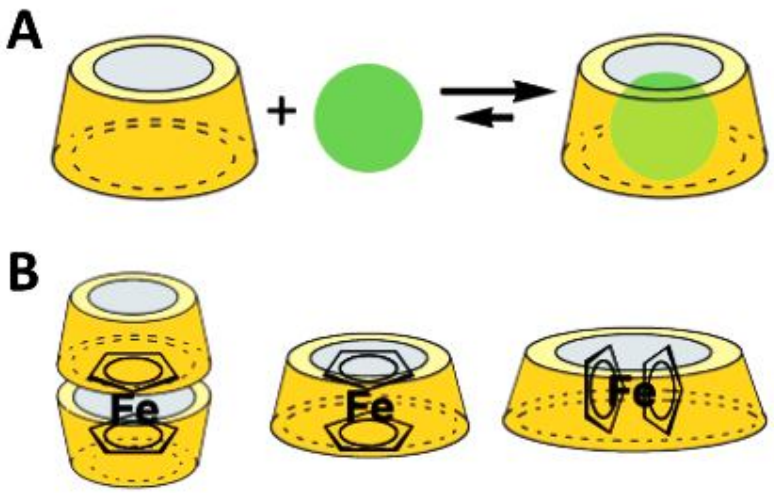


Figura 3. Formação de complexo de inclusão de uma ciclodextrina com uma molécula pequena (A) e estruturas de complexos de inclusão de ciclodextrina com uma molécula hóspede em diferentes relações estequiométricas ou configurações (B). Figura adaptada de (Harada 2001)

A complexação com CDs é caracterizada pela ausência de formação e quebra de ligações covalentes. A força motriz do processo é o potencial químico gerado pela saída das moléculas de água presentes na cavidade da ciclodextrina, que estavam impossibilitadas de fazer ligações de hidrogênio com o meio externo. A energia livre do sistema diminui quando a molécula-hóspede menos polar entra na cavidade da ciclodextrina, expulsando as moléculas de água. Outras forças também contribuem para a complexação, como a liberação da tensão do anel (especialmente para as α-ciclodextrinas), interações do tipo *van der Waals*, ligações de hidrogênio e alterações da tensão superficial do solvente utilizado como meio para a complexação (Loftsson et al. 1996).

O fato de não haver formação de ligações covalentes entre a molécula hóspede e a CD faz com que os complexos se dissociem facilmente em condições fisiológicas, especialmente resultante da diluição. Em solução aquosa, os complexos coexistem em equilíbrio com a molécula-hóspede livre, constituindo um processo dinâmico em que a molécula-hóspede se associa e se dissocia constantemente da ciclodextrina. Vários equilíbrios químicos podem ser encontrados no sistema simultaneamente (Uekama et al. 1987).

Portanto, a inclusão em CDs exerce um efeito profundo sobre as propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes, tais como: aumento da solubilidade e dissolução em água; estabilização e proteção contra oxidação, luz visível ou UV e calor; controle da volatilização e da sublimação; e isolamento físico de compostos incompatíveis. Assim, a formação de complexos de inclusão pode estabilizar, melhorar a solubilidade, aumentar a biodisponibilidade e diminuir os efeitos adversos de compostos ativos de interessse. Por essas razões, atualmente, há mais de 30 diferentes produtos contendo complexos de ciclodextrina comercializados no mundo (Tabela 2) (Loftsson et al. 2010).

Tabela 2. Produtos farmacêuticos contendo ciclodextrinas

Droga/ciclodextrina	Nome comercial	F. farmacêutica	País
α-ciclodextrina			
Alprostadil (PGE_1)	Prostavastin, Rigidur	solução I.V.	Japão, Europa, USA
OP-1206	Opalmon	comprimido	Japão
Cloridrato de cefotiam	Pansporin T	comprimido	Japão
β-ciclodextrina			
Cloridrato de benexato	Ulgut, Lonmiel	cápsula	Japão
Cefalosporina (ME 1207)	Meiact	comprimido	Japão
Clordiazepóxido	Transillium	comprimido	Argentina
Dexametasona	Glymesason	pomada	Japão
Cloridrato de difenidramina e clorteofilina	Stada-Travel	comprimido mastigável	Europa
Iodo	Mena-Gargle	solução	Japão
Nicotina	Nicorette, Nicogum	comprimido sublingual e goma de mascar	Europa
Nimesulida	Nimedex	comprimido	Europa
Nitroglicerina	Nitropen	comprimido sublingual	Japão
Omeprazol	Omebeta	comprimido	Europa
PGE_2	Prostarmon E	comprimido sublingual	Japão
Piroxicam	Brexin, Flogene, Cicladon	Comprimido, supositório e solução	Europa, Brasil
Ácido tiaprofénico	Surgamyl	comprimido	Europa
2-hidroxipropil-β-ciclodextrina			
Cisaprida	Propulsid	supositório	Europa
Itraconazol	Sporanox	solução oral e I. V.	Europa, USA
Mitomicina	Mitozytrex	infusão I. V.	Europa, USA
β-ciclodextrina metilada			
Cloranfenicol	Clorocil	colírio	Europa
17-β-estradiol	Aerodiol	Spray nasal	Europa
Sulfobutiléter- β-ciclodextrina			
Voriconazol	Vfend	solução I. V.	Europa, USA
Mesilato de ziprasidona	Geodon, Zeldox	solução I. M.	Europa, USA
2-hidroxipropil-γ-ciclodextrina			
Diclofenaco sódico	Voltaren	colírio	Europa
Tc-99 Teoboroxima	Cardiotec	solução I. V.	USA

As informações listadas nesta tabela baseiam-se parcialmente nas seguintes referências: (Loftsson et al. 2004; Szejtli 2004; Loftsson et al. 2005; Loftsson et al. 2010)

Com relação à capacidade das CDs em promover o aumento da biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade, convém ressaltar que esse aumento pode ser consequencia tanto do aumento da solubilidade e dissolução do fármaco em água quanto do aumento da sua permeabilidade. Este, por sua vez, pode ser em consequencia tanto do aumento da disponibilização do fármaco na superfície da barreira biológica quanto pela ação direta das CDs sobre membranas. Neste caso, as CDs por causa da sua capacidade de remover o colesterol, podem aumentar a fluidez da membrana e induzir a sua invaginação. Tal fato pode reduzir a resistência da membrana ou até mesmo provocar lise celular facilitando, assim, a penetração de fármacos (Carrier et al. 2007).

3.2.1 Complexos de ciclodextrinas e isoflavonas

Em 2007, foi publicado o primeiro estudo sobre a formação de complexos de inclusão de ciclodextrinas com uma isoflavona. Neste estudo, Crupi et al. (2007) avaliaram a formação de complexos de β-ciclodextrina (βCD), hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) e metil-β-ciclodextrina com a genisteína em meio aquoso analisando as associações pelas técnicas de espectroscopia nas regiões do infravermelho (FT-IR) e ultravioleta visível (UV-Vis). No mesmo ano, Stancanelli et al. (2007) relata a avaliação da solubilidade da genisteína e daidzeína em meio aquoso na presença de HPβCD e a determinação das respectivas constantes de associação empregando as técnicas de espectroscopia na região do ultravioleta visível e dicroismo circular.

Ainda em 2007, Lee et al. (2007) reportam a preparação de complexo de β-CD com extrato de hipocótilos de soja contendo 33,3% de isoflavonas totais (daidzina, glicitina e genistina) e avaliou a sua biodisponibilidade em ratos Sprague-Dawley. Os autores verificaram que, após a administração oral do complexo, houve um aumento significativo da biodisponibilidade da daidzeína (126%), genisteína (180%) e gliciteína (170%), respectivamente, em comparação ao extrato.

No ano seguinte, Daruhazi et al. (2008) investigaram a formação de complexos de inclusão de genisteína com α, β e γ-ciclodextrina (γCD) em meio sólido empregando a técnica de pasta. Os autores verificaram que a genisteína era capaz de formar complexos de inclusão tanto com a βCD quanto com a γ-ciclodextrina. No entanto, no caso da α-ciclodextrina, a formação de complexos de

inclusão não era possível atribuindo esta limitação à impossibilidade da genisteína inserir-se apropriadamente na reduzida cavidade da α-ciclodextrina.

Em 2010, Xavier et al. (2010) prepararam complexos de β-ciclodextrina e genisteína empregando o método de liofilização e avaliou a forma de interação entre a genisteína e a ciclodextrina através de ressonâcia magnética nuclear (RMN) e modelagem molecular. Segundo os autores, o complexo apresentou um elevado conteúdo de genisteína (19,22%). Além disso, de acordo com a modelagem molecular, a interação de genisteína com βCD ocorreria, principalmente, através da inserção do anel A da genisteína na cavidade da ciclodextrina, sem descartar a possibilidade de inclusão através do anel B, como previamente relatado na literatura, uma vez que as diferenças energéticas entre as duas configurações mostraram ser de pequena dimensão.

Posteriormente em 2011, Zhao et al. (2011) após preparar e caracterizar complexos de inclusão de daidzeína com dendrímeros de poli(amido)amina (PAMAM) e poli(propileno) imina (PPI), observaram um aumento de 186 e 650 vezes na solubilidade aquosa da daidzeína para os dendrímeros PAMAM e PPI, respectivamente. Além disso, o complexo daidzeína/PPI exibiu uma menor taxa de liberação *in vitro* para a daidzeína.

Neste mesmo ano, Borghetti et al. (2011) avaliaram o efeito de diferentes ciclodextrinas (βCD, metilβCD e HPβCD) e polímeros hidrofílicos [carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), polietilenoglicol (PEG) e polivinilpirrolidona (PVP)] sobre a solubilidade da daidzeína em água. Os autores verificaram um aumento significativo na solubilidade da daidzeína em água: 5,7 (βCD), 7,2 (metilβCD) e 9,4 (HPβCD) vezes, bem como a formação de complexos de inclusão através da inserção do anel B/C da daidzeína na cavidade das ciclodextrinas. Também verificaram que a associação dos complexos aos polímeros hidrofílicos HPMC ou PVP (1%, m/m) eram capazes de potencializar o aumento da solubilidade da daidzeína.

Em 2013, Daruházi et al. (2013) avaliaram o efeito da formação de complexos de inclusão da daidzeína e genisteína e diferentes ciclodextrinas (βCD, γCD, HPβCD e RMβCD), obtidos empregando-se o método de pasta, sobre o perfil de dissolução e transporte através de células Caco-2. Os autores observaram que todas as ciclodextrinas testadas foram capazes de aumentar significativamente a solubilidade

de ambas isoflavonas em água, sendo a RMβCD a mais eficiente. Da mesma forma, no ensaio de permeabilidade em células Caco-2, todas as ciclodextrinas testadas foram capazes de aumentar significativamente a quantidade de daidzeína e genisteína transportada quando comparada a quantidade das moléculas isoladas transportadas.

3.2.2 Técnicas de obtenção de complexos de ciclodextrinas

Diversas técnicas são empregadas no preparo de complexos com CDs, dentre os quais se destacam: método de co-precipitação, pasta, co-evaporação, *spray drying*, liofilização, fluido supercrítico, microondas e mistura a seco. No método de co-precipitação, a solução de fármaco e CD deve estar em condições muito próximas à saturação. Conforme a reação de complexação progride ou caso a solução seja resfriada, a solubilidade do complexo formado será excedida e este precipitará. A adição de solventes orgânicos também pode ser utilizada para induzir a precipitação do material em forma de complexo de inclusão (Al-Marzouqi et al. 2007; Nacsa et al. 2008; Al-Marzouqi et al. 2009; Mohit et al. 2010). Assim, o complexo precipitado pode ser coletado por decantação, centrifugação ou filtração. As principais desvantagens desse método são o baixo rendimento conseguido na produção em escalas maiores do que a laboratorial, o risco de formação de complexos de inclusão com solventes orgânicos, o longo tempo do processamento e a necessidade de grandes volumes de água para dissolvar a CD (Hedges 1998; Del Valle 2004).

Tendo em vista que a formação de complexos de inclusão é mais favorecida em meio líquido, principalmente quando a CD e a molécula hóspede estão solubilizados, os métodos de complexação mais empregados se processam em solução aquosa. A presença de água dissolve os componentes e favorece a interação hidrofóbica entre a molécula hóspede e a CD. Em alguns casos, a água fomenta a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas da molécula hóspedes e da CD auxiliando a captação e manutenção da mesma na cavidade da CD, fazendo parte da estrutura cristalina do complexo no estado sólido (Hedges 1998).

No caso da formação do complexo em meio líquido, após a complexação, torna-se necessário o emprego de técnicas de secagem para se obter os complexos

na forma sólida, tais como: secagem em estufa, liofilização, *spray drying,* leito fluido e evaporação sob pressão reduzida. Portanto, a diferença básica entre os métodos de complexação em meio líquido reside na técnica de secagem empregada (Del Valle 2004).

A complexação em meio líquido consiste na dissolução da CD em meio aquoso e posterior adição do composto ativo em excesso. A suspensão resultante permanece em temperatura constante, sob agitação, por um intervalo de tempo suficiente para atingir o equilíbrio termodinâmico de encapsulação molecular. Alguns produtos necessitam vários dias, enquanto que outros requerem apenas algumas horas. Técnicas auxiliares, como a utilização de ultrassom, conseguem acelerar o processo de equilíbrio e são comumente utilizadas.

Para auxiliar na dissolução das substâncias de interesse, os quais possuem como característica intrínseca a baixa solubilidade em água, podem ser utilizados co-solventes (etanol, metanol, dimetilsulfóxido, éter, acetona, etc.) ou elevar a temperatura do meio. Nesse último caso, cabe salientar que a formação de complexos é um processo exotérmico. Portanto, o aumento da temperatura normalmente desfavorece a sua formação. Além da adição de co-solventes, também podem ser adicionados ao meio: ácidos, bases, sais, polímeros e metais para auxiliar na formação dos complexos (Loftsson et al. 2007).

Com relação aos métodos de secagem, destaca-se o emprego da liofilização, principalmente quando se tratam de substâncias termolábeis e voláteis. Após a complexação, a solução aquosa é congelada e a água é sublimada em condições de pressão reduzida. Esta técnica permite a obtenção de complexos de inclusão com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. No entanto, quando se utilizam álcoois como co-solventes, torna-se necessária a sua remoção antes do congelamento da solução. Geralmente obtem-se pós secos e amorfos. Este método apresenta como desvantagens, o longo tempo de processamento, as más características de fluxo do material obtido e a umidade residual elevada (Cao et al. 2005).

No caso de substâncias não termoestáveis, um método de secagem muito empregado é a secagem por nebulização, comumente conhecida como *spray drying.* O processo de secagem consiste em dispersar em finas gotículas o líquido no interior de uma câmara munida de uma corrente controlada de ar quente. Dessa

maneira, consegue-se a evaporação do solvente, em geral água, obtendo-se uma separação ultrarrápida dos sólidos solúveis contidos na solução, com a mínima degradação do produto a secar. O produto na forma de pó é separado do vapor de água num ciclone. O baixo rendimento e o estresse térmico, em alguns casos, podem constituir-se limitações desta técnica (Fernandes et al. 2002).

Outras técnicas de secagem que também empregam aquecimento em temperaturas mais elevadas para a eliminação do solvente e obtenção de complexos sólidos são a secagem em estufa, forno de micro-ondas e co-evaporação sob pressão reduzida. Os dois primeiros métodos são mais empregados na secagem de complexos obtidos em estado sólido, uma vez que a quantidade de solvente a ser removida é menor. Já o emprego de forno de micro-ondas é empregado para promover o aumento da temperatura do meio líquido de complexação, uma vez que possui um bom poder de penetração, fato esse, que permite o aquecimento dos complexos de maneira mais homogênea. Ademais, com respeito ao aquecimento convencional, isto é, convenção, condução ou radiação com luz infravermelha, a irradiação micro-ondas oferece várias vantagens, tais como: elevada capacidade de aquecimento de grandes volumes em tempo reduzido, ausência de sobre aquecimento de superfície, mais econômico e baixo custo operacional, além de permitir a eliminação do solvente dos complexos (Moneghini et al. 2008).

Com relação à co-evaporação, os complexos geralmente são preparados em meio líquido com auxílio de co-solventes (mistura hidroalcoólicas) e, posteriormente, todo o solvente é removido sob pressão reduzida com emprego de temperatura. Também se pode remover somente o solvente orgânico. Nesse caso, quando houver a precipitação dos complexos, estes podem ser recuperados por filtração ou centrifugação e, posteriormente, secos. Por outro lado, quando não há precipitação, o complexo sólido pode ser obtido através de outras técnicas de secagem, como por exemplo, a liofilização.

Além dos métodos de complexação em meio líquido, os complexos também podem ser obtidos em estado sólido. A estrutura sólida de misturas binárias entre uma substância de interesse e CD pode ser bastante diferente das encontradas em soluções aquosas. Em meio aquoso, há um equilíbrio dinâmico entre as moléculas num meio polar, enquanto que os sistemas sólidos são estáticos e sofrem limitada

influência do seu conteúdo aquoso residual. A maioria dos métodos de preparação de complexos sólidos inclui diferentes graus de dissolução como etapa intermediaria do seu processo de obtenção. Os sistemas sólidos contendo fármaco e CD são estruturas heterogêneas que podem estar constituídas pelos seus componentes individuais não complexados, e/ou por diferentes tipos de associações entre eles, como na forma de complexos de inclusão de diferentes estequiometrias e níveis de inclusão ou como agregados com variável estado cristalino ou amorfo. Por esta razão, a eficiência de complexação (relação entre fármaco livre e complexado) destes sistemas é completamente dependente do processo de preparação (Cunha-Filho et al. 2007).

Dentre os métodos de complexação em meio sólido, o mais utilizado é o método de pasta, também conhecido como malaxagem (*kneading*). Esse método consiste em formar uma pasta a partir da adição de uma mínima quantidade de líquido (água ou misturas hidroetanólicas) suficiente para umedecer a mistura em pó de fármaco e CD. Em escala laboratorial, é realizada num almofariz com auxílio de um pistilo. Industrialmente, a mistura de componentes é efetuada numa malaxadora. A secagem do material pode ser feita em estufa ou em forno de microondas ou diretamente na malaxadora acompanhada de pulverização para uniformizar o tamanho de partícula (Del Valle 2004).

Outra opção seria a obtenção de complexos através de uma simples mistura física de CD com o fármaco (*physical mixture*) sem adição de água, sendo este método muito empregado para substâncias oleosas ou líquidas. Geralmente, este método é realizado em temperatura ambiente e o tempo de mistura irá variar de acordo com o composto de interesse. Em alguns casos são necessários vários dias para detectar-se a formação de complexos de inclusão. Em geral, é um método de complexação pouco eficiente (Hedges 1998; Borghetti et al. 2009).

Recentemente, técnicas mais modernas e inovadoras de obtenção de complexos em estado sólido têm sido utilizadas, como por exemplo, na presença de fluido supercrítico. A mistura física de CD com a molécula hóspede é exposta a fluídos supercríticos, os quais são produzidos pelo aquecimento de um gás, acima de sua temperatura crítica ou compressão de líquido acima de sua pressão crítica. Os fluídos supercríticos têm densidades, viscosidades e outras propriedades que são intermediárias entre aquelas da substância em seu estado gasoso e em seu

estado líquido, sendo o dióxido de carbono o fluído supercrítico mais usado por suas temperaturas críticas baixas (31 ^{o}C), por ser inerte, por ser de baixa toxicidade e reatividade e alta pureza a baixos custos. Apesar de ser um método atóxico, rápido, quimicamente estável, de baixo custo de manutenção, ainda é uma técnica que apresenta um investimento inicial bastante elevado, relativa à aquisição do equipamento (Al-Marzouqi et al. 2007).

3.2.3 Avaliação da formação de complexos de inclusão

Após a preparação dos complexos, é imprescindível avaliar se houve ou não a formação de complexo de inclusão. Como as propriedades físico-químicas do fármaco e da CD livre são relativamente diferentes daquelas apresentadas pelos complexos correspondentes, metodologias que tenham sensibilidade suficiente para medir estas diferenças podem ser utilizadas para caracterizá-los.

O primeiro parâmetro a ser avaliado é a extensão da complexação em meio aquoso. Esta é caracterizada pela constante de associação ou complexação K, que representa a estabilidade do complexo formado (CD:F). Considerando que uma molécula de ciclodextrina seja capaz de complexar uma molécula-hóspede (F), $K_{1:1}$ pode ser definido como (Uekama et al. 1987):

$$K_{1:1} = \frac{[CD:F]}{[CD]_{livre}\,[F]_{livre}}$$

O valor de $K_{1:1}$, geralmente, situa-se entre 50 e 2.000 com um valor médio de 129, 490 e 355 para α, β e γ-CD respectivamente. Valores baixos de K indicam que o complexo tenderá a existir mais na forma dissociada, enquanto que valores altos indicam que a forma complexada será predominante em relação à forma dissociada (Loftsson et al. 1996). Vários métodos podem ser empregados para a determinação dos valores de K, sendo a abordagem mais utilizada para o estudo de complexação o método descrito por Higuchi e Connors (Higuchi et al. 1965). Esse estudo analisa os efeitos da adição do agente complexante sobre a substância a ser solubilizada, permitindo obter a constante de estabilidade (K_c) e a estequiometria de formação do

complexo, a partir da solubilidade intrínseca do substrato (S_0) e a inclinação da reta resultante do diagrama de solubilidade:

$$K_{1:1} = \frac{\text{Inclinação}}{S_0 \text{ x } (1\text{-Inclinação})}$$

Vale ressaltar que a determinação do valor de K não indica se um fármaco formou ou não um complexo de inclusão com uma CD, apenas indica como a ciclodextrina influenciou a mudança nas propriedades do fármaco, especialmente, a solubilidade (Loftsson et al. 2004). Embora seja mais comum a forma de complexação em que a molécula-hóspede situa-se no interior da cavidade hidrofóbica da CD, podem ocorrer outras formas de associação entre as CDs e outras moléculas, de forma análoga ao que ocorre com oligossacarídeos e polissacarídeos não-cíclicos (Brewster et al. 2007). Os grupos hidroxila presentes na superfície externa do anel podem formar ligações de hidrogênio com outras moléculas. Tanto as CDs sozinhas quanto os complexos podem formar agregados que, por sua vez, também podem melhorar a hidrossolubilidade de moléculas hidrofóbicas por um mecanismo semelhante à formação de micelas (Loftsson et al. 2007).

Segundo Higuchi e Connors, os perfis de solubilidade obtidos a partir da técnica acima descrita (Figura 4), classificam-se como perfis do *tipo A*, quando a solubilidade do substrato aumenta com o incremento da concentração de CD. Quando a formação do complexo segue cinética de primeira ordem em relação à CD e de primeira ordem, ou superior em relação ao substrato, um perfil *tipo AL* é obtido. Se a formação do complexo é de primeira ordem em relação ao substrato, mas de segunda ordem, ou superior, em relação à CD, o perfil de solubilidade obtido possui um desvio positivo da linearidade, sendo classificado como diagramas do *tipo AP*. Perfis do *tipo AN* são de interpretação mais complexa devido à multiplicidade de fenômenos que podem ocorrer. Perfis do *tipo B* são obtidos com a formação de complexos de baixa hidrossolubilidade sendo, em alguns casos, até mesmo inferior à da molécula hospedeira e que precipitam na medida em que há encapsulação (Higuchi et al. 1965).

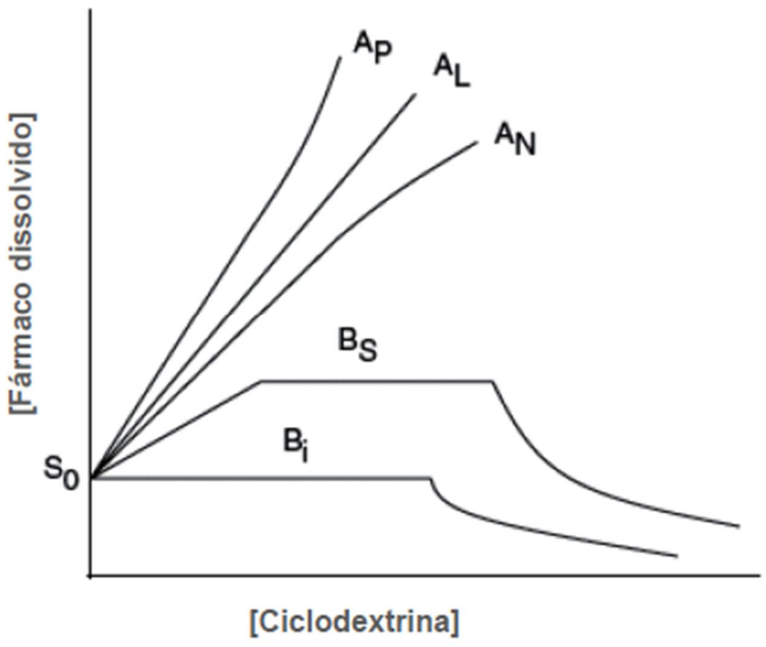


Figura 4. Perfis de solubilidade segundo Higuchi e Connors

S_0 = solubilidade intrínseca do fármaco em ausência de ciclodextrina

Figura adaptada de (Higuchi et al. 1965)

Além da determinação da constante de estabilidade do complexo, também se pode calcular a eficiência de solubilização ou complexação (EC) a partir do diagrama de solubilidade de fases. Esta também pode ser determinada a partir da inclinação da curva obtida no diagrama de solubilidade de fases (Loftsson et al. 2005):

$$\mathrm{EC} = \frac{\text{Inclinação}}{(1\text{-Inclinação})}$$

Observa-se que os valores de os valores de $K_{1:1}$ podem variar enormemente. Esta limitação tem origem em diversas causas: S_0 pode ser fortemente afetado por excipientes, tais como sais utilizados em tampões, polímeros ou conservantes; S_0 pode ser inferior ao limite de detecção do método analítico utilizado para a determinação quantitativa do fármaco e, ainda, S_0 é, em geral, muito maior que o intercepto do diagrama de solubilidade de fases. Uma vez que o valor numérico de

EC é somente dependente da inclinação da curva de solubilidade, uma menor variação é geralmente observada para os valores de EC (Cunha-Filho et al. 2007).

Para avaliar a formação ou não de complexo entre fármacos e CDs, diversas técnicas podem ser empregadas, entre elas, a microscopia eletrônica de varredura (Borghetti et al. 2011); calorimetria exploratória diferencial difração de raios-X (Mohit et al. 2010), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia Raman e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (H^1 RMN) (Crupi et al. 2007; Borghetti et al. 2009). Essas técnicas, especialmente a H^1 RMN, permitem verificar quais grupamentos químicos da molécula hóspede interagiram com a CD.

3.2.4 Toxicidade das ciclodextrinas

Tendo em vista que os complexos podem ser administrados por diferentes vias, um fato muito importante a ser considerado no desenvolvimento de novos medicamentos contendo CDs é a avaliação da toxicidade dos complexos. A toxicidade destas substâncias está diretamente ligada com sua capacidade de ser absorvida pelo organismo, de interagir com os sistemas enzimáticos, provocando alterações metabólicas ou, ainda, com a capacidade de se depositarem em certos órgãos e tecidos.

De forma geral, as ciclodextrinas de origem natural e seus derivados hidrofílicos são capazes de permear, somente, membranas biológicas lipofílicas tais como a córnea, porém com grande dificuldade. No entanto, estudos de toxicidade demonstraram que, quando administradas pela via oral, as CDs são praticamente atóxicas devido a sua baixíssima absorção gastrintestinal (Irie et al. 1997; Matsuda et al. 1999). Contudo, as CDs metiladas podem ser absorvidas em certa extensão (~10%) a partir do trato gastrintestinal. Por conseguinte, apenas quantidades limitadas destas CDs podem ser incluídas em formulações orais e, de modo algum, podem ser incluídas em formulações parenterais.

Estudos também revelaram que α e βCDs apresentam certo grau de nefrotoxicidade, efeito este vinculado à sua cristalização ou à formação de complexos com o colesterol nos tecidos renais. A utilização de derivados hidroxipropilados contorna este problema, já que as moléculas apresentam uma solubilidade bem mais elevada em água (Irie et al. 1997).

Atualmente, a βCD é aprovada como ingrediente alimentar em vários países, tais como Suécia, Alemanha, Bélgica, Espanha, França, Holanda, Hungria, Estados Unidos da América e Japão. A monografia da βCD está incluída na Farmacopeia Americana, Farmacopeia Europeia e Farmacopeia Japonesa, entre outras, assim como no "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (Loftsson et al. 2007). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), na Resolução RDC 2 de 15 de janeiro de 2007 aprova o uso de ciclodextrinas como aditivos para aromatizantes (Brasil 2007).

Portanto, excetuando-se as CDs metiladas, o uso das CDs pela via oral pode ser considerado muito seguro. Assim, considerando a baixa solubilidade e biodisponibilidade das isoflavonas e os conhecimentos científicos existentes sobre as CDs, a associação destas com a βCD e a HPβCD para administração pela via oral com o intuito de promover o aumento da sua solubilidade e biodisponibilidade, demonstra ser uma estratégia viável e segura.

3.2.5 Permeabilidade intestinal *in vitro*

Como alternativa aos estudos *in vivo*, diferentes técnicas *in vitro* são empregadas para a determinação das características e mecanismos de permeabilidade epitelial de um composto. Tais técnicas podem ser classificadas em: métodos biofísicos e métodos biológicos.

Dentre os métodos biofísicos *in vitro,* destaca-se o emprego de membranas sintéticas constituídas de fosfolipídeos, principalmente a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, sendo o ensaio PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)* a técnica mais conhecida e utilizada nos experimentos dessa natureza (Dudeja et al. 1991; Taillardat-Bertschinger et al. 2002).

Esta técnica é baseada na formação de uma bicamada de fosfolipídeos em solução de dodecano impregnada entre duas membranas semipermeáveis com espessura e dimensões de poros bem estabelecidas, formando, desta forma, dois compartimentos: o doador, onde se adiciona o fármaco em solução e o receptor, onde se quantifica a fração do fármaco que foi capaz de atravessar a bicamada lipídica formada (Avdeef 2001). Este método é muito utilizado para avaliar a permeabilidade transcelular passiva, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento de um novo fármaco.

Em relação aos métodos biológicos, vários modelos baseados em culturas celulares têm sido desenvolvidos. Dentre eles, destaca-se o emprego de células Caco-2, as quais têm sido amplamente utilizadas como ferramentas de triagem nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos (Artursson et al. 1991; Balimane et al. 2005).

Mantidas as condições adequadas de cultivo, as células Caco-2 crescem formando uma monocamada de células cilíndricas polarizadas, com microvilosidades na borda apical, apresentando, ainda, as junções oclusivas entre células adjacentes e expressando atividade enzimática de hidrolases comuns do intestino delgado. Para se manter as condições mais próximas possíveis das encontradas no intestino *in vivo,* as células Caco-2 são cultivadas em suporte de filtros permeáveis que mantém o livre acesso de íons e nutrientes, constituintes do meio de cultivo, em ambos os lados da membrana formada (Pinto et al. 1983).

Assim, com o ensaio PAMPA é possível avaliar apenas a permeabilidade passiva, uma vez que esse modelo baseia-se na separação de dois compartimentos por uma bicamada lipídica simples, enquanto que as células Caco-2 representam um modelo de mecanismos múltiplos, já que esta linhagem se diferencia e passa a exibir características morfológicas e funcionais similares às dos enterócitos (Artursson et al. 1991; Bohets et al. 2001; Miret et al. 2004).

Portanto, a combinação dessas duas metodologias demonstra ser uma ferramenta importante para a avaliação diagnóstica da permeabilidade. Caso exista uma correlação entre os resultados obtidos nos dois ensaios, um perfil de permeabilidade passiva é esperado. Entretanto, se os valores de permeabilidade em Caco-2 forem inferiores ou superiores aos obtidos no PAMPA, é possível que o fármaco seja substrato de algum transportador de efluxo ou absorção, respectivamente (Di et al. 2005).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adlercreutz H. "Phyto-oestrogens and cancer." *The Lancet Oncology* 3(6): 364-373 (2002).

Adlercreutz H, Hamalainen E, Gorbach SeGoldin B. "Dietary Phyto-Estrogens and the Menopause in Japan." *The Lancet* 339 (8803): 1233-1233 (1992).

Al-Marzouqi AH, Elwy HM, Shehadi IeAdem A. "Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques." *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 49(2): 227-233 (2009).

Al-Marzouqi AH, Jobe B, Dowaidar A, Maestrelli F, et al. "Evaluation of supercritical fluid technology as preparative technique of benzocaine-cyclodextrin complexes-comparison with conventional methods." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43(2): 566–574 (2007).

Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, et al. "Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis." *Journal of Nutrition* 126(1): 161-167 (1996).

Artursson PeKarlsson J. "Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175(3): 880-885 (1991).

Avdeef A. "Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state)." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1(4): 277-351 (2001).

Balimane PVeChong S. "Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique." *Drug Discovery Today* 10(5): 335-343 (2005).

Barnes S, Kirk MeCoward L. "Isoflavones and Their Conjugates in Soy Foods - Extraction Conditions and Analysis by Hplc Mass-Spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(11): 2466-2474 (1994).

Beig A, Agbaria ReDahan A. "Oral delivery of lipophilic drugs: the tradeoff between solubility increase and permeability decrease when using cyclodextrin-based formulations." *Public Library of Science* 8(7): e68237 (2013).

Blair HC, Jordan SE, Peterson TGeBarnes S. "Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats." *Journal of Cellular Biochemistry* 61(4): 629-637 (1996).

Boersma BJ, Barnes S, Kirk M, Wang CC, et al. "Soy isoflavonoids and cancer -- metabolism at the target site." *Mutation Research* 480-481: 121-127 (2001).

Bohets H, Annaert P, Mannens G, Van Beijsterveldt L, et al. "Strategies for absorption screening in drug discovery and development." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1(5): 367-383 (2001).

Borghetti GS, Lula IS, Sinisterra RDeBassani VL. "Quercetin/beta-cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture." *AAPS PharmSciTech* 10(1): 235-242 (2009).

Borghetti GS, Pinto AP, Lula IS, Sinisterra RD, et al. "Daidzein/cyclodextrin/hydrophilic polymer ternary systems." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 37(8): 886-893 (2011).

Brasil (2007). Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Brasília, Aprova o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes: Diário Oficial da União.

Brewster MEeLoftsson T. "Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(1): 645–666 (2007).

Buvári-Barcza ÁeBarcza L. "Changes in the Solubility of beta-Cyclodextrin on Complex Formation: Guest Enforced Solubility of beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes." *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 36(3): 355-370 (2000).

Cao F, Guo JXePing QN. "The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 31(8): 747-756 (2005).

Carrier RL, Miller LAeAhmed M. "The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability." *Journal of Controlled Release* 123(2): 78-99 (2007).

Carter MW, Smart WWGeMatrone G. "Effect of Genistin on Growth and Reproduction of the Mouse." *Journal of Animal Science* 13(4): 1016-1017 (1954).

Cederroth CReNef S. "Soy, phytoestrogens and metabolism: A review." *Molecular Cellular Endocrinology* 304(1-2): 30-42 (2009).

Chang YCeNair MG. "Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria." *Journal of Natural Products* 58(12): 1892-1896 (1995).

Chena L, Zhaob X, Fang LeGamesc DE. "Quantitative determination of acetyl glucoside isoflavones and their metabolites in human urine using combined liquid chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1154(1-2): 103–110 (2007).

Cheng E, Story CD, Yoder L, Hale WH, et al. "Estrogenic Activity of Isoflavone Derivatives Extracted and Prepared from Soybean Oil Meal." *Science* 118(3058): 164-165 (1953).

Cheng E, Yoder L, Story CDeBurroughs W. "Estrogenic Activity of Some Isoflavone Derivatives." *Science* 120(3119): 575-576 (1954).

Chun J, Kim JSeKim JH. "Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of Streptococcus infantarius 12 and Weissella sp. 4." *Food Chemistry* 109(2): 278-284 (2008).

Clarkson TB, Anthony MSeHughes CL. "Estrogenic Soybean Isoflavones and Chronic Disease - Risks and Benefits." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 6(1): 11-16 (1995).

Coward L, Barnes NC, Setchell KDReBarnes S. "Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjugates - Antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets." *Journal of Agricultural and Food Chem*istry 41(11): 1961-1967 (1993).

Coward L, Smith M, Kirk MeBarnes S. "Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing." *The American Journal of Clinical Nutrition* 68(6): 1486-1491 (1998).

Crupi V, Ficarra P, Guardo M, Majolino D, et al. "UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with beta-cyclodextrins." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44(1): 110-117 (2007).

Cunha-Filho MSSeSá-Barreto LCL. "Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico." *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 28(1): 1-9 (2007).

Dahan AeMiller JM. "The solubility-permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs." *AAPS PharmSciTech* 14(2): 244-251 (2012).

Daruházi AE, Kiss T, Vecsernyés M, Szente L, et al. "Investigation of transport of genistein, daidzein and their inclusion complexes prepared with different cyclodextrins on Caco-2 cell line." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 84(112-116) (2013).

Daruhazi AE, Szente L, Balogh B, Matyus P, et al. "Utility of cyclodextrins in the formulation of genistein part 1. Preparation and physicochemical properties of genistein complexes with native cyclodextrins." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48(3): 636-640 (2008).

Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, et al. "Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase." *Febs Letters* 468(2-3): 166-170 (2000).

Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, et al. "Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity." *Febs Letters* 436(1): 71-75 (1998).

Del Valle EMM. "Cyclodextrins and their uses: a review." *Process Biochemistry* 39(9): 1033-1046 (2004).

Delmonte P, Perry JeRader JI. "Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and kudzu: extraction followed by basic or acid hydrolysis." *Journal of Chromatography A* 1107(1-2): 59-69 (2006).

Di LeKerns EH. "Application of pharmaceutical profiling assays for optimization of drug-like properties." *Current Opinion in Drug Discovery Development* 8(4): 495-504 (2005).

Du XH, Niu X, Feng QJ, Du H, et al. "Study on absorption mechanism of genistein self-microemulsifying system in rat intestines." *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 33(12): 1406-1409 (2008).

Dudeja PK, Harig JM, Wali RK, Knaup SM, et al. "Differential modulation of human small intestinal brush-border membrane hemileaflet fluidity affects leucine aminopeptidase activity and transport of D-glucose and L-glutamate." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 284(2): 338-345 (1991).

Fenner GP. "Low-temperature treatment of soybean (Glycine max) isoflavonoid aglycon extracts improves gas chromatographic resolution." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(12): 3727-3729 (1996).

Fernandes CMeVeiga FJ. "Effect of the hydrophobic nature of triacetyl-beta-cyclodextrin on the complexation with nicardipine hydrochloride: physicochemical and dissolution properties of the kneaded and spray-dried complexes." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50(12): 1597-1602 (2002).

Fiechter G, Opacak I, Raba BeMayer HK. "A new ultra-high pressure liquid chromatography method for the determination of total isoflavone aglycones after enzymatic hydrolysis: Application to analyze isoflavone levels in soybean cultivars." *Food Research International* 50(2): 586-592 (2013).

Folman YePope GS. "The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other utero-vaginotrophic compounds of low potency." *Journal of Endocrinology* 34(2): 215-225 (1966).

Folman YePope GS. "Effect of Norethisterone Acetate, Dimethylstilboestrol, Genistein and Coumestrol on Uptake of [3h]Oestradiol by Uterus, Vagina and Skeletal Muscle of Immature Mice." *Journal of Endocrinology* 44(2): 213-& (1969).

Gardner CD, Newell KA, Cherin ReHaskell WL. "The effect of soy protein with or without isoflavones relative to milk protein on plasma lipids in

hypercholesterolemic postmenopausal women." *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(4): 728-735 (2001).

Greendale GA, FitzGerald G, Huang MH, Sternfeld B, et al. "Dietary soy isoflavones and bone mineral density: results from the study of women's health across the nation." *The American Journal of Epidemiology* 155(8): 746-754 (2002).

Griffith APeCollison MW. "Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 913(1-2): 397-413 (2001).

Han KK, Soares JM, Jr., Haidar MA, de Lima GR, et al. "Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms." *Obstetrics and Gynecology* 99(3): 389-394 (2002).

Harada A. "Cyclodextrin-based molecular machines." *Accounts of Chemical Research* 34(6): 456-464 (2001).

Hedges AR. "Industrial applications of cyclodextrins*." Chemical Reviews* 98(5): 2035-2044 (1998).

Heinonen SM, Hoikkala A, Wahala KeAdlercreutz H. "Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 87(4-5): 285-299 (2003).

Hermansen K, Sondergaard M, Hoie L, Carstensen M, et al. "Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects." *Diabetes Care* 24(2): 228-233 (2001).

Higuchi TeConnors KA. "Phase-solubility techniques." *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* 4(1): 117-212 (1965).

Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H, et al. "Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal Japanese women." *Osteoporosis International* 11(8): 721-724 (2000).

Howes LG, Howes JBeKnight DC. "Isoflavone therapy for menopausal flushes: A systematic review and meta-analysis." *Maturitas* 55(3): 203-211 (2006).

Huang ZR, Hung CF, K. LYeFang JY. "In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein." *International Journal of Pharmaceutics* 364(1): 36–44 (2008).

ICH (2005). International Conference on Harmonisation QIA (R2) Stability testing testing of new drug substances and products.

Irie TeUekama K. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation." *Journal of Pharmaceutical Science* 86(2): 147-162 (1997).

Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, et al. "Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans." *Journal of Nutrition* 130(7): 1695-1699 (2000).

Jayagopal V, Albertazzi P, Kilpatrick ES, Howarth EM, et al. "Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes." *Diabetes Care* 25(10): 1709-1714 (2002).

Jha HC, Zilliken FeBreitmaier E. "Carbon-13 chemical shift assignments of chromones and isoflavones." *Canadian Journal of Chemistry* 58(12): 1211-1219 (1980).

Jou HJ, Ling PYeWu SC. "Comparison of 70 mg and 35 mg isoflavone soya supplement for menopause symptoms." *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 90(2): 159-160 (2005).

Kao TH, Chien JTeChen BH. "Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide." *Food Chemistry* 107(4): 1728-1736 (2008).

Kelly GE, Nelson C, Waring MA, Joannou GE, et al. "Metabolites of Dietary (Soya) Isoflavones in Human Urine." *Clinica Chimica Acta* 223(1-2): 9-22 (1993).

Kerns EH, Di L, Petusky S, Farris M, et al. "Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery." *Journal of Pharmaceutical Science* 93(6): 1440-1453 (2004).

Klejdus B, Mikelova R, Petrlova J, Potesil D, et al. "Evaluation of isoflavone aglycon and glycoside distribution in soy plants and soybeans by fast column high-performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(15): 5848-5852 (2005).

Klejdus B, Vacek J, Benesova L, Kopecky J, et al. "Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389(7-8): 2277-2285 (2007).

Klump SP, Allred MC, MacDonald JLeBallam JM. "Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study." *J AOAC* Int 84(6): 1865-1883 (2001).

Kobayashi S, Shinohara M, Nagai TeKonishi Y. "Transport mechanisms for soy isoflavones and microbial metabolites dihydrogenistein and dihydrodaidzein across monolayers and membranes." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 77(11): 2210-2217 (2013).

Koester LS, Bertuol JB, Groch KR, Xavier CR, et al. "Bioavailability of carbamazepine:beta-cyclodextrin complex in beagle dogs from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets." *European Journal of Pharmaceutical Science* 22(2-3): 201-207 (2004).

Kratz JM, Teixeira MR, Koester LSeSimoes CM. "An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44(6): 531-537 (2011).

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, et al. "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* 138(3): 863-870 (1997).

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, et al. "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta." *Endocrinology* 139(10): 4252-4263 (1998).

Kuiper GGJM, Enmark E, PeltoHuikko M, Nilsson S, et al. "Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(12): 5925-5930 (1996).

Kumar NB, Cantor A, Allen K, Riccardi D, et al. "The specific role of isoflavones in reducing prostate cancer risk." *Prostate* 59(2): 141-147 (2004).

Kwon SH, Kim SY, Ha KW, Kang MJ, et al. "Pharmaceutical evaluation of genistein-loaded pluronic micelles for oral delivery." *Archives of Pharmaceutical Research* 30(9): 1138-1143 (2007).

Lapcik O. "Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule?" *Phytochemistry* 68(22-24): 2909-2916 (2007).

Lee SH, Kim YH, Yu HJ, Cho NS, et al. "Enhanced bioavailability of soy isoflavones by complexation with beta-cyclodextrin in rats." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71(12): 2927-2933 (2007).

Li-Hsun C, Ya-Chuan CeChieh-Ming C. "Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures." *Food Chemistry* 84(2): 279–285 (2004).

Loftsson TeBrewster ME. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins .1. Drug solubilization and stabilization." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85(10): 1017-1025 (1996).

Loftsson TeBrewster ME. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62(11): 1607-1621 (2010).

Loftsson TeDuchene D. "Cyclodextrins and their pharmaceutical applications." *International Journal of Pharmaceutics* 329(1-2): 1-11 (2007).

Loftsson T, Hreinsdottir DeMasson M. "Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs." *International Journal of Pharmaceutics* 302(1-2): 18-28 (2005).

Loftsson TeMasson M. "The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 14(1): 35-43 (2004).

Ma Y, Zhao X, Li JeShen Q. "The comparison of different daidzein-PLGA nanoparticles in increasing its oral bioavailability." *International Journal of Nanomedicine* 7: 559-570 (2012).

Mackova Z, Koblovska ReLapcik O. "Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa - an update." *Phytochemistry* 67(9): 849-855 (2006).

Matsuda HeArima H. "Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 36(1): 81-99 (1999).

Mei J, Yeung SSeKung AW. "High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(11): 5217-5221 (2001).

Messina M. "A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research." *Journal of Nutrition* 140(7): 1350S-1354S (2010).

Miller JM, Beig A, Carr RA, Spence JK, et al. "A win-win solution in oral delivery of lipophilic drugs: supersaturation via amorphous solid dispersions increases apparent solubility without sacrifice of intestinal membrane permeability." *Molecular Pharmaceutics* 9(7): 2009-2016 (2012).

Miret S, Abrahamse Lede Groene EM. "Comparison of in vitro models for the prediction of compound absorption across the human intestinal mucosa." *Journal of Biomolecular Screening* 9(7): 598-606 (2004).

Mohit V, Harshal G, Neha D, Vilasrao K, et al. "A comparative study of complexation methods for cefdinir-hydroxypropyl-β-cyclodextrin system " *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 71(1-2): 57-66 (2010).

Moneghini M, Bellich B, Baxa PePrincivalle F. "Microwave generated solid dispersions containing Ibuprofen." *International Journal of Pharmaceutics* 361(1-2): 125-130 (2008).

Motlekar N, Khan MAeYouan BC. "Preparation and characterization of genistein containing poly(ethylene glycol) microparticles." *Journal of Applied Polymer Science* 101(3): 2070-2078 (2006).

Murkies AL, Lombard C, Strauss BJG, Wicox G, et al. "Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: Effect of soy and wheat (Reprinted from Maturitas, vol 21, pg 189-195, 1995)." *Maturitas* 61(1-2): 27-33 (2008).

Murphy PA. "Separation of genistin, daidzin and their aglucones, and coumesterol by gradient high-performance liquid-chromatography." *Journal of Chromatography* 211(1): 166-169 (1981).

Murphy PA, Barua KeHauck CC. "Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods." *Journal of Chromatography* B 777(1-2): 129-138 (2002).

Nacsa A, Ambrus R, Berkesi O, Szabo-Revesz P, et al. "Water-soluble loratadine inclusion complex: Analytical control of the preparation by microwave irradiation." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48(3): 1020-1023 (2008).

Niessen WMA, Manini PeAndreoli R. "Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry." *Mass Spectrometry Review* 25(6): 881-899 (2006).

Oitate M, Nakaki R, Koyabu N, Takanaga H, et al. "Transcellular transport of genistein, a soybean-derived isoflavone, across human colon carcinoma cell line (Caco-2)." *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 22(1): 23-29 (2001).

Park HJ, Park JH, Moon JO, Lee KT, et al. "Isoflavone glycosides from the flowers of Pueraria thunbergiana." *Phytochemistry* 51(1): 147-151 (1999).

Peeters PH, Keinan-Boker L, van der Schouw YTeGrobbee DE. "Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence." *Breast Cancer Res Treat* 77(2): 171-183 (2003).

Penalvo JL, Nurmi TeAdlercreutz H. "A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products." *Food Chemistry* 87(2): 297-305 (2004).

Peng YY, Chu QC, Liu FHeYe JN. " Determination of isoflavones in soy products by capillary electrophoresis with electrochemical detection." *Food Chemistry* 87(1): 135-139 (2004).

Pinto M, Robine Leon SeAppay MD. "Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture." *Biology of the Cell* 47: 323-330 (1983).

Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, et al. "Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women." *The American Journal of Clinical Nutrition* 68(6 Suppl): 1375S-1379S (1998).

Prabhakaran MP, Hui LSePerera CO. "Evaluation of the composition and concentration of isoflavones in soy based supplements, health products and infant formulas." *Food Research International* 39(6): 730-738 (2006).

Reynaud J, Guilet D, Terreux R, Lussignol M, et al. "Isoflavonoids in non-leguminous families: an update." *Natural Products Report* 22(4): 504-515 (2005).

Rostagno MA, Palma MeBarroso CG. "Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans." *Analytical Chimica Acta* 522(2): 169-177 (2004).

Rostagno MA, Palma MeBarroso CG. "Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects." *Food Chemistry* 93(3): 557-564 (2005a).

Rostagno MA, Palma MeBarroso CG. "Solid-phase extraction of soy isoflavones." *Journal of Chromatography* A 1076(1-2): 110-117 (2005b).

Rostagno MA, Palma MeBarroso CG. "Fast analysis of soy isoflavones by high-performance liquid chromatography with monolithic columns." *Analytica Chimica Acta* 582(2): 243-249 (2007a).

Rostagno MA, Palma MeBarroso CG. "Microwave assisted extraction of soy isoflavones." *Analytica Chimica Acta* 588(2): 274-282 (2007b).

Rostagno MA, Palma MeBarroso CG. "Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices." *Analytica Chimica Acta* 597(2): 265-272 (2007c).

Rostagno MA, Villares A, Guillamon E, Garcia-Lafuente A, et al. "Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods." *Journal of Chromatography A* 1216(1): 2-29 (2009).

Satomi K, Takehiko U, Kunimasa H, Toshiya T, et al. (2003). Agent for inhibiting bitter taste, astringent tast ans astrictive taste of isoflavone derivative, method for inhibiting bitter taste, astringent tast ans astrictive taste by using the agent, and addible composition containing isoflavone derivative Japan. JP2003183166.

Schwartz HeSontag G. "Determination of isoflavones in nutritional supplements by HPLC with coulometric electrode array detection." *Monatshefte Fur Chemie* 139(8): 865-872 (2008).

Schwartz HeSontag G. "Comparison of sample preparation methods for analysis of isoflavones in foodstuffs." *Analytica Chimica Acta* 633(2): 204-215 (2009).

Sepehr E, Cooke G, Robertson PeGilani GS. "Bioavailability of soy isoflavones in rats. Part I: Application of accurate methodology for studying the effects of gender and source of isof lavones." *Molecular Nutrition and Food Research* 51(7): 799-812 (2007).

Setchell KD. "Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones." *The American Journal of Clinical Nutrition* 68(6 Suppl): 1333S-1346S (1998).

Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, et al. "Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements." *Journal of Nutrition* 131(4 Suppl): 1362S-1375S (2001).

Setchell KD, Brzezinski A, Brown NM, Desai PB, et al. "Pharmacokinetics of a slow-release formulation of soybean isoflavones in healthy postmenopausal women." *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53(6): 1938-1944 (2005).

Setchell KDR, Brown NMeLydeking-Olsen E. "The clinical importance of the metabolite equol - A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones." *Journal of Nutrition* 132(12): 3577-3584 (2002a).

Setchell KDR, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, et al. "Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability." *The American Journal of Clinical Nutrition* 76(2): 447-453 (2002b).

Setchell KDReCole SJ. "Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling." *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51(14): 4146-4155 (2003).

Shen Q, Li X, Yuan DeJia W. "Enhanced Oral Bioavailability of Daidzein by Self-Microemulsifying Drug Delivery System." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58(5): 639-643 (2010).

Shihabi ZK, Kute T, Garcia LLeHinsdale M. "Analysis of Isoflavones by Capillary Electrophoresis." *Journal of Chromatography A* 680(1): 181-185 (1994).

Singh M, Sharma ReBanerjee UC. "Biotechnological applications of cyclodextrins." *Biotechnology Advances* 20(5-6): 341-359 (2002).

Stancanelli R, Mazzaglia A, Tommasini S, Calabro ML, et al. "The enhancement of isoflavones water solubility by complexation with modified cyclodextrins: a spectroscopic investigation with implications in the pharmaceutical analysis." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44(4): 980-984 (2007).

Sung JH, Choi SJ, Lee SW, Park KH, et al. "Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68(5): 1051-1058 (2004).

Szejtli J. "Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry." *Chemical Reviews* 98(5): 1743-1753 (1998).

Szejtli J. "Past, present, and future of cyclodextrin research." *Pure and Applied Chemistry* 76(10): 1825-1845 (2004).

Taillardat-Bertschinger A, Martinet CA, Carrupt PA, Reist M, et al. "Molecular factors influencing retention on immobilized artifical membranes (IAM) compared to partitioning in liposomes and *n*-octanol." *Pharmaceutical Research* 19(6): 729-737 (2002).

Takatsuka N, Nagata C, Kurisu Y, Inaba S, et al. "Hypocholesterolemic effect of soymilk supplementation with usual diet in premenopausal normolipidemic Japanese women." *Preventive Medicine* 4: 308-314 (2000).

Tang JL, Xu N, Ji HY, Liu HM, et al. "Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment." *International Journal of Nanomedicine* 6: 2429-2435 (2011).

Tavelin S, Grasjo J, Taipalensuu J, Ocklind G, et al. "Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport." *Methods in Molecular Biology* 188: 233-272 (2002).

Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, et al. "Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan." *Nutrition and Cancer* 54(2): 184-201 (2006).

Tsai AC, Vinik AI, Lasichak AeLo GS. "Effects of soy polysaccharide on postprandial plasma glucose, insulin, glucagon, pancreatic polypeptide, somatostatin, and triglyceride in obese diabetic patients." *The American Journal of Clinical Nutrition* 45(3): 596-601 (1987).

Uekama KeOtagiri M. "Cyclodextrins in Drug Carrier Systems." *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 3(1): 1-40 (1987).

Ungar Y, Osundahunsi OFeShimoni E. "Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity." Journal of Agricultural and *Food Chemistry* 51(15): 4394-4399 (2003).

USP (2011) United States Pharmacopoeia. United States Pharmacopoeia Convention, Rockville.

Utkina EA, Antoshina SV, Selishcheva AA, Sorokoumova GM, et al. "Isoflavones daidzein and genistein: Preparation by acid hydrolysis of their glycosides and the effect on phospholipid peroxidation." *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 30(4): 385-390 (2004).

van de Manakker F, Vermonden T, van Nostrum CFeHennink WE. "Cyclodextrin-Based Polymeric Materials: Synthesis, Properties, and Pharmaceutical/Biomedical Applications." *Biomacromolecules* 10(12): 3157-3175 (2009).

Wang HJeMurphy PA. "Isoflavone content in commercial soybean foods." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(8): 1666–1673 (1994).

Wang HY, Komolpis K, Kaufman PB, Malakul P, et al. "Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (Glycine max)." *Biotechnology Progress* 17(3): 424-430 (2001).

Williamson G, Day AJ, DuPont MS, Ridley S, et al. "Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity." *Febs Letters* 436(1): 71-75 (1998).

Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Stanczyk FZ, et al. "Dietary patterns and breast cancer risk in Asian American women." *The American Journal of Clinical Nutrition* 89(4): 1145-1154 (2009).

Wu JG, Ge JA, Zhang YP, Yu Y, et al. "Solubility of genistein in water, methanol, ethanol, propan-2-ol, 1-butanol, and ethyl acetate from (280 to 333) K." *Journal of Chemical and Engineering Data* 55(11): 5286-5288 (2010).

Wu QL, Wang MF, Sciarappa WJeSimon JE. "LC/UV/ESI-MS analysis of isoflavones in Edamame and Tofu soybeans." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(10): 2763-2769 (2004).

Xavier CR, Silva APC, Schwingel LC, Borghetti GS, et al. "Improvement of genistein content in solid genistein/β-cyclodextrin complexes." *Química Nova* 33(3): 587-590 (2010).

Xu ZM, Wu QeGodber JS. "Stabilities of daidzin, glycitin, genistin, and generation of derivatives during heating." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(25): 7402-7406 (2002).

Yamaguchi M. "Isoflavone and bone metabolism: Its cellular mechanism and preventive role in bone loss." *Journal of Health Science* 48(3): 209-222 (2002).

Yatsu FK, Koester LS, Lula I, Passos JJ, et al. "Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction." *Carbohydrate Polymers* 98(1): 726-735 (2013).

Yatsu FKJ, Pedrazza GPR, Argenta DF, Barreto F, et al. "A new simplified and stability indicating liquid chromatography method for routine analysis of isoflavones aglycones in different complex matrices." *Food Analytical Methods* 1: 1 (2014).

Zhang EJ, Ng KMeLuo KQ. "Extraction and purification of isoflavones from soybeans and characterization of their estrogenic activities." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(17): 6940-6950 (2007).

Zhao C, Wang YT, Su YZ, Zhang HF, et al. "Inclusion complexes of isoflavones with two commercially available dendrimers: Solubility, stability, structures, release behaviors, cytotoxicity, and anti-oxidant activities." *International Journal of Pharmaceutics* 421(2): 301-309 (2011).

Zhu S, Hong M, Liu CePei Y. "Application of Box-Behnken design in understanding the quality of genistein self-nanoemulsified drug delivery systems and optimizing its formulation." *Pharmaceutical Development Technology* 14(6): 642-649 (2009).

Zubik LeMeydani M. "Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women." *The American Journal of Clinical Nutrition* 77(6): 1459-1465 (2003).

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento de um método simplificado por cromatografia líquida para análise de rotina de isoflavonas agliconas em diferentes matrizes complexas

PUBLICAÇÃO 1*:	**A new simplified and stability indicating liquid chromatography method for routine analysis of isoflavones aglycones in different complex matrices**

* Publicado online no periódico Food Analytical Methods: 08 de Março de 2014

Desenvolvimento de um método simplificado por cromatografia líquida para análise de rotina de isoflavonas agliconas em diferentes matrizes complexas

Francini K. J. Yatsu; Graziele P. R. Pedrazza; Débora F. Argenta; Fabiano Barreto; Helder F. Teixeira; Letícia S. Koester, Valquiria L. Bassani*

Resumo

O presente capítulo foi publicado online no periódico Food Analytical Methods (Yatsu et al. 2014) e teve como objetivo o desenvolvimento de um método de análise, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (LC), para a determinação das isoflavonas-agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína presentes em diferentes matrizes complexas, desde a matéria prima, extrato padronizado até sistemas coloidais. O método envolveu prévia hidrólise das diversas isoformas heterosídicas, resultando na análise de apenas três agliconas majoritárias correspondentes, propiciando redução de tempo e de custo de análise. Além disso, uma minuciosa avaliação da seletividade e a influência de diferentes matrizes sobre o método foi realizada. Para tanto, utilizou-se como fase estacionária uma coluna Phenomenex RP-18 (Synergi Fusion 150 x 4,6mm d.i., 4 µm) e como fase móvel ácido trifluoracético 0,01% (v/v) e acetonitrila:ácido trifluoracético (100:0.01, v/v). A separação de todas as isoflavonas agliconas foi alcançada em 23 min, com um tempo total de análise de 30 min. Para a avaliação da especificidade do método, os padrões das isoflavonas foram submetidos a diferentes condições de estresse (HCl 1 M, NaOH 1 M, H_2O_2 30%, 60°C e UVC 254 nm) e analisados por LC-UV e LC-MS/MS. Em pH básico, tanto na exposição à temperatura de 60°C quanto sob a exposição da radiação UVC, foi possível detectar a presença de 3 novos picos (D1, D2 and D3), os quais apresentaram uma boa resolução. O método demostrou uma linearidade superior a 0,999 na faixa de concentração de 0,1 a 10 $\mu g.mL^{-1}$ para todas as isoflavonas agliconas. Os limites de quantificação variaram entre 0,28 e 0,37 $\mu g.mL^{-1}$ e a precisão intermediária apresentou

valores de desvio padrão relativo (DPR) entre 0,03 e 0,25%. Após a validação, o método foi utilizado na análise do conteúdo de isoflavonas agliconas em três matrizes diferentes: grãos de *Glycine max*, extrato seco de *Glycine max* e uma nanoemulsão contendo as isoflavonas agliconas. Os dados de repetibilidade revelaram valores de DPR entre 0,02 e 1,41% e precisão intermediária entre 0,05 e 1,99%. Já os dados de recuperação dos padrões de isoflavonas agliconas nas matrizes ficaram entre 90,74 e 106,43%. Portanto, o método desenvolvido demonstrou ser rápido, versátil, linear, preciso e específico e aplicável na determinação do teor das agliconas presentes na fração e em outras matrizes complexas.

Referência Bibliográfica

Yatsu FKJ, Pedrazza GPR, Argenta DF, Barreto F, et al. "A new simplified and stability indicating liquid chromatography method for routine analysis of isoflavones aglycones in different complex matrices." *Food Analytical Methods* 1: 1 (2014).

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas de soja

PUBLICAÇÃO 2: Isoflavone Enriched-Fraction from *Glycine max:* Preparation, Optimization and Characterization

Desenvolvimento de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas de soja

Francini K. J. Yatsu*; Letícia S. Koester, Valquiria L. Bassani

Resumo

O segundo capítulo do trabalho, o qual será submetido à publicação, refere-se ao desenvolvimento de uma fração padronizada contendo alto teor de isoflavonas da soja, na forma de agliconas. Para tanto, foi desenvolvido um método de extração e purificação simples e de baixo custo, e a fração obtida foi caracterizada no que se referem as suas propriedades físicas e químicas. Para tanto, partiu-se de um extrato seco padronizado de *Glycine max,* contendo a concentração nominal de 22% de isoflavonas glicosídicas, como uma fonte alternativa, de custo acessível. Na etapa de extração, optamos por uma simples extração sólido-líquido, com agitação mecânica, empregando etanol como solvente. O etanol foi utilizado como solvente extrator devido à polaridade dos heterosídeos, ao seu baixo custo, baixa toxicidade, elevada eficiência de extração, por ser de fácil recuperação e reciclagem e por gerar baixo impacto ambiental. Assim, 3 diferentes concentrações de etanol (60%, 80% e 96%, v/v) foram testadas. Além disso, tanto a influência do tempo quanto da temperatura sobre a extração foram avaliadas. Uma vez tendo sido estabelecida as melhores condições de extração, partiu-se para a avaliação das condições de hidrólise a fim de se obter uma fração rica em isoflavonas na forma de agliconas, a forma biologicamente ativa. O ácido clorídrico foi escolhido porque suas soluções são bastante estáveis durante o armazenamento, mantendo a sua concentração ao longo do tempo. Além disso, considerando que a hidrólise não é eficiente em concentrações baixas de ácido e, em concentrações elevadas, o ácido pode levar a certa retenção deste nos produtos de cristalização, procedeu-se a hidrólise no intervalo de concentração de 0,1 a 0,5 M de ácido clorídrico. Também tendo em vista que a hidrólise não é eficaz a temperaturas inferiores a 75°C e que temperaturas superiores a 80°C não são capazes de elevar a eficiência da hidrólise, esta foi

avaliada somente a 80°C. Considerando que as isoflavonas agliconas são praticamente insolúveis em água, a adição de um antissolvente é uma alternativa promissora para recuperar as agliconas, por cristalização, a partir do extrato hidrolisado. Naturalmente, a água foi utilizada como antissolvente. Neste ensaio, a fim de avaliar a eficiência de recuperação das agliconas a partir do extrato hidrolisado, adicionou-se uma quantidade conhecida de água ao extracto hidrolisado, o qual foi posteriormente filtrado em membrana de 0,2 µm para separar os cristais formados da solução mãe. Os cristais foram então redissolvidos em metanol e quantificados por CLAE. Os resultados demonstraram que a melhor proporção de água:extrato hidrolisado foi de 1:5 (v/v), pois proporções mais elevadas não apresentaram maiores rendimentos ($p > 0,05$). Por fim, IEF teve sua identidade, pureza e propriedades físico-químicas avaliadas. Em relação a sua identidade, as análises de espectroscopia em infravermelho com tranformada de Fourier (FT-IR), ressonâcia magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^{1}H) e carbono (^{13}C) e cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta (UV) e por massas (MS) atestaram a identidade e determinaram o conteúdo de isoflavona nos cristais (daidzeína, 441,43 ± 3,89 mg/g; gliciteína, 363,46 ± 1,04 mg/g e de genisteína, 91,72 ± 0,95 mg/g). Ainda neste estudo, tendo em vista que a fração pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de produtos farmacêuticos, avaliou-se preliminarmente a estabilidade das isoflavonas em solução na presença ou ausência de agentes estressores (ácido clorídrico, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio) sob diferentes condições de armazenamento, tais como a exposição à radiação violeta e temperaturas elevadas. Após uma semana de estudo, foi possível verificar que as isoflavonas possuem uma boa estabilidade em etanol e na presença de ácido clorídrico, quando armazenadas em temperatura ambiente ou em temperaturas mais baixas e quando protegidas da radiação ultravioleta C (UVC). Frente ao exposto, e considerando-se o elevado teor de isoflavonas na fração obtida, o método de extração e purificação desenvolvido pode ser considerado satisfatório.

CAPÍTULO 3: Complexação múltipla de isoflavonas de *Glycine max* presentes em uma fração enriquecida com ciclodextrina

PUBLICAÇÃO 3*: Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction

*Publicado no periódico Carbohydrate Polymers 98: 726– 735 (2013)

Complexação múltipla de isoflavonas de *Glycine max* presentes em uma fração enriquecida com ciclodextrina

Francini K. J. Yatsu[a*]; Letícia S. Koester[a], Ivana Lula[b,c] , Joel J. Passos[b], Rubén Sinisterra[b] and Valquiria L. Bassani[a]

Resumo

O presente capítulo foi publicado no periódico Carbohydrate Polymers (Yatsu et al. 2013) e teve como objetivo avaliar a formação de complexos de uma fração rica em isoflavonas agliconas (IEF) com β-ciclodextrina (βCD) e 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) empregando-se as técnicas de complexação em pasta, liofilização, co-evaporação, *spray drying* e em micro-ondas. Os complexos obtidos foram caracterizados quanto à solubilidade e teor de isoflavonas. A formação de complexos de inclusão foi avaliada pelas mesmas técnicas de difratometria de raios X em pós (DRX), espectroscopia em infravermelho com tranformada de Fourier (FT-IR), ressonâcia magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^{1}H) e carbono (^{13}C), espectroscopia na região do ultravioleta (UV) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os complexos sólidos preparados com HPβCD apresentaram solubilidade superior à fração e os resultados da caracterização físico-química sugerem, fortemente, a formação simultânea de complexos de inclusão entre as três isoflavonas e a HPβCD e a associação destas às hidroxilas externas da cilcodextrina.

Referência Bibliográfica

Yatsu FK, Koester LS, Lula I, Passos JJ, et al. "Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction." *Carbohydrate Polymers* 98(1): 726-735 (2013).

CAPÍTULO 4: Permeabilidade intestinal *in vitro* de isoflavonas de soja presentes em fração contendo alto teor de agliconas de seus complexos com ciclodextrina em modelos de células Caco-2 e PAMPA

PUBLICAÇÃO 4*:	***In vitro* intestinal permeability of soy isoflavones aglycones fraction and their complexes with cyclodextrin in Caco-2 cell and PAMPA models**

Permeabilidade intestinal *in vitro* de isoflavonas de soja presentes em fração contendo alto teor de agliconas de seus complexos com ciclodextrina em modelos de células Caco-2 e PAMPA

Francini K. J. Yatsu[a],Jadel M.Kratz[b],Naira F. Z. Schneider[b],Cláudia M. O. Simões[b], Letícia S. Koester[a], Valquiria L. Bassani[a]*

Resumo

O quarto capítulo deste trabalho, o qual será submetido à publicação, teve como objetivo avaliar o efeito da complexação simultânea da daidzeína, genisteína e gliciteína, presentes numa fração rica em isoflavonas agliconas (IEF), com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) na permeabilidade intestinal *in vitro* em modelo de membrana artificial paralela (PAMPA) e celular (Caco-2). Os resultados dos ensaios *in vitro* indicam que a permeação da daidzeína e da genisteína ocorre predominantemte via transporte ativo, enquanto e permeação de gliciteína ocorre predominantemente via difusão passiva. De modo geral, observou-se que a complexação com HPβCD causou um grande efeito negativo sobre a permeabilidade intestinal das isoflavonas, excetuando-se o complexo sólido preparado por *spray drying,* o qual apresentou um resultado bastante positivo. Tanto a permeabilidade da daidzeína quanto da gliciteína presentes nesse complexo apresentaram valores similares ao da fração livre ($p > 0,05$), enquanto a permeabilidade da genisteína apresentou uma melhora significativa ($p < 0,05$), sendo este último fenômeno também observado na permeabilidade da genisteína presente no complexo sólido preparado por co-evaporação.

DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho foi desenvolvido em 4 etapas, constituindo-se cada uma dessas um capítulo do presente trabalho (Figura 1, Prefácio).

O capítulo 1 foi dedicado ao desenvolvimento de um método de análise, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, para a determinação das isoflavonas-agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína presentes em diferentes matrizes complexas, desde a matéria prima, extrato padronizado até sistemas coloidais.

Inúmeros métodos de análise de isoflavonas têm sido descritos na literatura. No entanto, a maioria deles não avalia, ou avalia apenas alguns parâmetros, relativos ao desempenho analítico do método. Parâmetros importantes como a seletividade e a influência de diferentes matrizes sobre o método, geralmente, são negligenciados, pois a maioria dos métodos desenvolvidos é aplicada, quase que exclusivamente, a um único tipo de amostra (matriz), com o objetivo de identificar e caracterizar uma gama de isoformas de isoflavonas e não apenas as majoritárias. Tal abordagem eleva consideravelmente o tempo e o custo da análise, pois uma grande quantidade de solventes é necessária, além de demandar o emprego de uma grande gama de padrões, os quais são, de forma geral, caros, instáveis e pouco disponíveis no mercado para aquisição.

Neste contexto, considerando que a aplicação do método destinava-se especialmente a quantificar as isoflavonas na forma de agliconas, o método envolveu prévia hidrólise das diversas isoformas heterosídicas, resultando na análise de apenas três agliconas majoritárias correspondentes, propiciando redução de tempo e de custo de análise. Além disso, uma minuciosa avaliação da seletividade e a influência de diferentes matrizes sobre o método foi realizada.

Tendo em vista que o efeito da matriz pode ser descrito como uma supressão ou incremento da resposta do analito devido à co-eluição de componentes da matriz, este pode ser facilmente avaliado comparando-se a resposta obtida de uma solução da amostra contendo os padrões e de uma solução contendo somente os padrões. Assim, no presente trabalho, o efeito da matriz foi avaliado através da comparação das inclinações das curvas de calibração das amostras contendo os padrões das isoflavonas agliconas (S_m)

com as inclinações das soluções contendo somente os padrões (S_s) (C% = 100 x [1 – (S_m/S_s)]).

De acordo com Niessen et al. (2006), o efeito de matriz pode ser considerado baixo na faixa entre -20% < C% <20%, médio nas faixas de -50% < C% <-20% ou 20%> C% > 50% e alto nas faixas de C% < -50% ou C% > 50%. Portanto, os resultados obtidos indicam que todas as matrizes avaliadas exercem um baixo efeito sobre a resposta das isoflavonas, demonstrando, assim, que o método desenvolvido é seletivo, dispensando o pré-tratamento das amostras por técnicas como a extração em fase sólida e/ou a partição com solventes (Klejdus et al. 2005; Rostagno et al. 2005b).

Além disso, o método desenvolvido demonstrou ser rápido, versátil, preciso, linear e específico. Para a avaliação da especificidade do método, os padrões das isoflavonas foram submetidos a diferentes condições de estresse (HCl 1 M, NaOH 1 M, H_2O_2 30%, 60°C e UVC 254 nm) e analisados por LC-UV e LC-MS/MS. Em pH básico, tanto na exposição à temperatura de 60°C quanto sob a exposição da radiação UVC, foi possível detectar a presença de 3 novos picos (D1, D2 and D3), os quais apresentaram uma boa resolução (Figura 2, Capítulo 1). A análise dos novos picos por LC-MS/MS, comparativamente à biblioteca disponível revelou que o pico D1 corresponde a um isômero da daidzeína, D2 à *O*-desmetilangolensina e D3 à diidrogenisteína (Chena et al. 2007). Portanto, D1 e D2, correspondem aos derivados da daidzeína e D3 da genisteína.

A segunda etapa do trablalho (Capítulo 2) refere-se ao desenvolvimento de uma fração padronizada contendo alto teor de isoflavonas da soja, na forma de agliconas. Para tanto, foi desenvolvido um método de extração e purificação simples e de baixo custo, e a fração obtida foi caracterizada no que se refere as suas propriedades físicas e químicas.

Partindo do pressuposto que a maioria dos produtos a base de soja disponíveis no mercado possuem uma baixa concentração de isoflavonas (Delmonte et al. 2006; Prabhakaran et al. 2006; Schwartz et al. 2008) e que estas, geralmente, estão na forma de glicosídeos, as quais precisam ser hidrolisadas a agliconas (forma biologicamente ativa) para serem absorvidas (Day et al. 2000; Setchell et al. 2002b), optamos por desenvolver uma fração rica em isoflavonas na forma de agliconas (IEF). Além disso, considerando que

a obtenção de isoflavonas, a partir da soja, é um processo custoso, que gera grandes quantidades de resíduos além de difícil separação da fração lipídica; partiu-se de um extrato seco padronizado de *Glycine max,* contendo a concentração nominal de 22% de isoflavonas glicosídicas, como uma fonte alternativa, de custo acessível.

A fim de aumentar a eficiência de extração e reduzir os custos operacionais, adotou-se uma estratégia de produção simples, a qual pode ser genericamente resumida nas seguintes etapas: extração das isoflavonas heterosídicas a partir do extrato seco de *Glycine max* com solvente orgânico apropriado; hidrólise da porção heterosídica; recuperação das agliconas e purificação.

Na etapa de extração, optamos por uma simples extração sólido-líquido, com agitação mecânica, empregando etanol como solvente. Tal procedimento foi escolhido tendo em vista a baixa complexidade da matriz. Já o etanol foi utilizado como solvente extrator devido à polaridade dos heterosídeos, ao seu baixo custo, baixa toxicidade, elevada eficiência de extração, por ser de fácil recuperação e reciclagem e por gerar baixo impacto ambiental. Assim, 3 diferentes concentrações de etanol (60%, 80% e 96%, v/v) foram testadas. Apesar de não ter sido verificada uma diferença estatística significante ($p > 0.05$) na eficiência de extração entre as soluções hidroalcoólicas (60 e 80%) e o etanol 96 % (v/v), este último foi eleito o solvente extrator, pois a água co-extraiu outros compostos do extrato seco de *Glycine max* que não são de interesse. Além disso, com o objetivo de estabelecer o volume mínimo necessário para extrair a maior quantidade possível de isoflavonas, a relação droga:solvente também foi devidamente avaliada. Em não havendo diferença estatística significante ($p > 0.05$) entre as proporçãoes 1:20 e 1:50, a primeira foi escolhida por ser mais vantajosa economicamente.

Ainda em relação à extração, tanto a influência do tempo quanto da temperatura sobre a extração foram avaliadas. A partir desse ensaio, verificou-se que a temperatura foi o único fator relevante, uma vez que, com o aumento do tempo de extração, não houve aumento significativo na extração das isoflavonas. Em relação à influência da temperatura sobre a extração, tal resultado já era esperado, pois é de amplo conhecimento que a solubilidade das moléculas, em geral, tende a se elevar com o aumento da temperatura. No

entanto, como não sabíamos a exata composição do extrato, não era possível prever a influencia do tempo. Assim, pode-se concluir que a matriz do extrato seco não possuía uma ligação forte com os heterosídeos, uma vez que estes foram prontamente extraídos após 2 h de extração a 60°C, condição essa que permitiu que praticamente 100% das isoflavonas fossem recuperadas a partir do extrato seco.

Uma vez tendo sido estabelecida as melhores condições de extração, partiu-se para a avaliação das condições de hidrólise a fim de se obter uma fração rica em isoflavonas na forma de agliconas, a forma biologicamente ativa. Considerando-se que a hidrólise da porção heterosídica pode ser realizada tanto com o auxílio de ácidos quanto de enzimas, purificadas ou secretadas por microorganismos, optamos pelo uso de ácido orgânico, uma vez que o custo de aquisição ou produção de β-glucosidases de microorganismos é mais elevado e os processos enzimáticos são mais complexos. Assim, a eficiência de hidrólise ácida (concentração de ácido versus o tempo de hidrólise) foi avaliada a 80°C utilizando ácido clorídrico.

O ácido clorídrico foi escolhido porque suas soluções são bastante estáveis durante o armazenamento, mantendo a sua concentração ao longo do tempo. Este atributo, bem como o fato de que ele está disponível como um reagente puro, faz do ácido clorídrico um excelente reagente acidificante. Além disso, considerando que a hidrólise não é eficiente em concentrações baixas de ácido e, em concentrações elevadas, o ácido pode levar a certa retenção deste nos produtos de cristalização, procedeu-se a hidrólise no intervalo de concentração de 0,1 a 0,5 M de ácido clorídrico. Também tendo em vista que a hidrólise não é eficaz a temperaturas inferiores a 75°C e que temperaturas superiores a 80°C não são capazes de elevar a eficiência da hidrólise (Zhang et al. 2007), esta foi avaliada somente a 80°C.

Dessa forma, em tal ensaio pudemos observar que a eficiência de hidrólise está intimamente correlacionada à concentração do ácido e do tempo de hidrólise, posto que a concentração de agliconas foi diretamente proporcional a concentração de ácido e do tempo. Portanto, após 12 h, a uma concentração de ácido de 0,5 M a 80°C, foi possível hidrolisar cerca de 90% dos heterosídeos presentes na solução extrativa, o que corresponde a 85%,

100%, e 92% dos heterosídeos da daidzeína, genisteína e gliciteína, respectivamente.

Considerando que as isoflavonas agliconas são praticamente insolúveis em água, a adição de um antissolvente é uma alternativa promissora para recuperar as agliconas, por cristalização, a partir do extrato hidrolisado. Naturalmente, a água foi utilizada como antissolvente. Neste ensaio, a fim de avaliar a eficiência de recuperação das agliconas a partir do extrato hidrolisado, adicionou-se uma quantidade conhecida de água ao extracto hidrolisado, o qual foi posteriormente filtrado em membrana de 0,2 µm para separar os cristais formados da solução mãe. Os cristais foram então redissolvidos em metanol e quantificados por CLAE.

Os resultados demonstraram que a melhor proporção de água:extrato hidrolisado foi de 1:5 (v/v), pois proporções mais elevadas não apresentaram maiores rendimentos ($p > 0,05$), sendo que os cristais obtidos apresentaram uma pureza de aproximadamente 54% de agliconas. Dessa forma, a fim de melhorar a pureza dos cristais, estes foram recristalizados em etanol puro e novamente analisados por CLAE. Assim, o produto final, denominado de fração rica em isoflavonas agliconas (IEF), apresentou um elevado teor de isoflavonas totais (90%).

Por fim, IEF teve sua identidade, pureza e propriedades físico-químicas avaliadas. Em relação a sua identidade, as análises de espectroscopia em infravermelho com tranformada de Fourier (FT-IR) (Figuras A5 a A8), ressonâcia magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^{1}H) e carbono (^{13}C) (Figuras A18 e A19) e cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta (UV) e por massas (MS) (Figura A1 a A3) atestaram a identidade e a pureza dos cristais. Cabe destacar que os resultados encontrados foram devidamente comparados com dados da literatura e com resultados apresentados pelos próprios padrões submetidos às mesmas análises, quando foi possível (Figuras A5 a A8).

No estudo de solubilidade em água, as isoflavonas agliconas presentes na IEF apresentaram uma solubilidade superior àquela observada para os padrões. Resultados semelhantes também foram observados para uma mistura de isoflavonas de soja composta por 55% de genisteína, 43% de daidzeína e 1,8% de gliciteína) (Zhang et al. 2007). Os autores verificaram que a

solubilidade de genisteína e daidzeína na mistura era de 5,2 e 3,3 vezes maior do que a dos compostos puros em tampão pH 6 e sugeriram que a mistura seria uma dispersão sólida eutética. Considerando-se que o efeito principal de formação de uma mistura eutética seria o de diminuir o ponto de fusão da mistura dos respectivos substratos, os pontos de fusão da IEF e dos padrões de isoflavonas foram determinados por calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Figura 7, Capítulo 2). Uma vez que o ponto de fusão da IEF demonstrou ser menor do que o encontrada para os padrões, pode-se sugerir que, pelo menos em parte, a solubilidade mais elevada da fração, pode ser atribuída à formação de uma dispersão sólida eutética. Além disso, a diferença na solubilidade também pode estar relacionada a diferentes estruturas cristalinas (polimorfismo) e hábitos cristalinos (morfologia). Nesse sentido, tanto a fração quanto os padrões de isoflavonas foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de raios X em pós (DRX). A fotomicrografia da fração demonstrou possuir um hábito muito similar àquele apresentado pelos padrões de daidzeína e gliciteína (Figura 6, Capítulo 2). No entanto, o difratograma dos padrões de isoflavonas revelou uma estrutura cristalina bem definida, ao passo que IEF exibiu uma diminuição considerável no número de picos de difração, bem como uma ausência de picos agudos, sugerindo assim que IEF seria menos cristalina do que os padrões, o que poderia explicar a diferença na solubilidade (Figura 8, Capítulo 2).

Ainda neste estudo, tendo em vista que a fração pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de produtos farmacêuticos, avaliou-se preliminarmente a estabilidade das isoflavonas em solução na presença ou ausência de agentes estressores (ácido clorídrico, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio) sob diferentes condições de armazenamento, tais como a exposição à radiação violeta e temperaturas elevadas. Após uma semana de estudo, foi possível verificar que as isoflavonas possuem uma boa estabilidade em etanol e na presença de ácido clorídrico, quando armazenadas em temperatura ambiente ou em temperaturas mais baixas e quando protegidas da radiação ultravioleta C (UVC) (Figura 9, Capítulo 2). Esta observação prova que método de extração e purificação desenvolvido não exerce efeito negativo sobre a estabilidade das agliconas, ou seja, as

isoflavonas não sofrem degradação por ação da elevada temperatura, presença de ácido e uso do etanol como solvente durante o referido processo.

Já em relação à sensibilidade das isoflavonas à radição UVC (254 nm), cabe destacar que esta possui baixa incidência na luz solar e está ausente na luz branca gerada por lâmpadas fluorescente. No entanto, esta foi utilizada neste trabalho tendo em vista ser a mais energética, o que possibilitaria acelerar o estudo de estabilidade de modo a visualizar uma possível instabilidade das moléculas analisadas. Assim, moléculas não sensíveis a essa radiação, também não seriam sensíveis à luz solar, composta por luz visível (400-700 nm) e radiação UV próxima (200-380 nm), uma vez que a luz solar possui uma baixa incidência de radiação UVC. Assim, considerando-se os resultados do presente estudo de estabilidade frente à radiação UVC, pudemos verificar que estes estão parcialmente de acordo com Rostagno et al. (2005a), o qual demonstrou que apenas a daidzeína e a genisteína em epresentes em um extrato hidroalcoólico e as soluções padrão, eram sensíveis à luz UV-Vis. Portanto, durante o processo de extração e purificação, recomenda-se a proteção das isoflavonas contra a luz UV-Vis para evitar uma possível degradação.

Face ao exposto, e considerando-se o elevado teor e pureza da IEF obtida, bem como a sua maior solubilidade em água, o método de extração e purificação desenvolvido pode ser considerado satisfatório.

Apesar da maior hidrossolubilidade das isoflavonas quando presentes no IEF, comparativamente às isoflavonas individualmente, esta ainda é restrita (44,55 µg/mL) (Tabela 2, Capítulo 2). Além dessa característica, sabe-se que as isoflavonas também possuem sabor amargo, baixa estabilidade em água, baixa biodisponibilidade e tempo de meia vida relativamente curto (Setchell et al. 2001; Wang et al. 2001; Satomi et al. 2003; Ungar et al. 2003; Sepehr et al. 2007).

Neste contexto, emprego de ciclodextrinas mostrou-se uma estratégia de interesse, considerando estudos prévios que têm demonstrado sua capacidade de promover um aumento da solubilidade de flavonoides, bem como aumento da biodisponibilidade através da formação de complexos de inclusão (Buvári-Barcza et al. 2000; Lee et al. 2007; Borghetti et al. 2009a). Assim, o presente estudo propôs, no capítulo 3, avaliar a formação de complexos da IEF com β-

ciclodextrina (βCD) e 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) empregando-se diferentes métodos.

No estudo de solubilidade de fases a 24°C, verificou-se que ambas as ciclodextrinas eram capazes de aumentar linearmente a solubilidade da IEF em função da concentração, sendo tal comportamento caracterizado como uma curva do tipo A_L, na faixa de concentração das isoflavonas de 0 a 5 mM, de acordo com Higuchi e Connors (Higuchi et al. 1965). No entanto, ao compararmos as constantes de estabilidade (K_s) e eficiência de complexação (EC) das ciclodextrinas, observou-se que a HPβCD apresentou um maior poder de solubilização, comparativamente à βCD, uma vez que uma menor quantidade desta ciclodextrina foi requerida para solubilizar a IEF (1:7) (Tabela 1 e Figura 1, Capítulo 3).

Tendo em vista que as condições de processamento (temperatura, tempo de agitação e quantidade de fármaco em excesso) podem influenciar a eficiência de complexação nos estudos de solubilidade de fases, como demonstrado por Borghetti e colaboradores (2009), foi realizado um novo estudo de solubilidade de fases variando-se esses parâmetros. Assim, empregou-se uma temperatura mais elevada (37 ºC) e ampliou-se a faixa de concentração das ciclodextrinas: 0-10 mM de βCD e 0-100 mM de HPβCD. Mesmo com o aumento da temperatura e da concentração de ciclodextrinas, o perfil dos diagramas de solubilidade de fases não foi alterado (Tabela 1 e Figura 1, Capítulo 3). Observou-se que nestas condições a solubilidade intrínsica (S_0) das isoflavonas aumentou significativamente (p<0,05). Como consequência, tais condições determinaram uma redução significativa nos valores de K_s e de EC para ambas as ciclodextrinas, especialmente para a genisteína, sugerindo que a formação de complexos IEF:ciclodextrinas ocorra por um processo exotérmico, portanto, desfavorecido pelo aumento da temperatura.

Ao compararmos a solubilidade das isoflavonas presentes na IEF antes e após a complexação com as ciclodextrinas, verificou-se que o incremento de solubilidade das mesmas não foi proporcional à sua concentração na IEF. Alguns experimentos foram iniciados, e não estão concluídos, com o intuito de compreender como a proporção relativa às isoflavonas afeta a sua solubilidade e a formação de complexos. Estes envolvem estudo da solublidade das

isoflavonas (padrões adquiridos comercialmente) de forma isolada e misturadas em diferentes proporções, assim como análise da energia envolvida no estudo conformacional dessas associações (dados não mostrados).

É importante ressaltar que pela primeira vez, a solubilidade em água da gliciteína foi determinada e a sua complexação com ciclodextrinas foi avaliada. A gliciteína apresentou uma menor solubilidade em água em comparação às outras isoflavonas e ambas as ciclodextrinas testadas foram capazes de promover aumento da sua hidrossolubilidade, sendo HPβCD a mais efetiva.

Assim, a complexação das isoflavona contidas na IEF com HPβCD mostrou ser uma estratégia promissora, uma vez que o complexo IEF/HPβCD apresentou uma maior solubilidade e eficiência complexação superior. Com base nos resultados obtidos, complexos de IEF/HPβCD foram produzidos por diferentes métodos: pasta/micro-ondas, liofolização, co-evaporação, *spray drying* e microondas.

Na análise morfológica, os complexos sólidos apresentaram morfologia distinta da mistura física de IEF com HPβCD, especialmente os complexos obtidos por *spray drying* e por liofilização. O primeiro apresentou partículas esferoidais com superfície lisa e o segundo se apresentou na forma de um pó amorfo. Da mesma forma, os termogramas dos complexos apresentaram perfis diferenciados em relação à mistura física, indicando a formação de uma nova estrutura cristalina ou novo hábito cristalino (Figura 2, Capítulo 3).

Na análise térmica, IEF apresentou um único pico endotérmico agudo a 300°C, HPβCD um amplo pico endotérmico a 334°C e a mistura física de IEF e HPβCD apresentou uma drástica redução na intensidade do pico correspondente ao ponto de fusão da IEF, o que era esperado, uma vez que a quantidade de IEF na mistura física era muito pequena (Figuras A34 a A37). Já nos termogramas dos complexos sólidos de IEF/HPβCD, houve um desaparecimento completo do pico correspondente ao ponto de fusão da IEF e um deslocamento do pico correspondente ao ponto de fusão da HPβCD (Figuras A38 a A42). Portanto, embora os complexos obtidos sejam diferentes da mistura física, com respeito aos termogramas, eles não proporcionam evidência suficiente sobre a formação de complexos de inclusão verdadeiros.

Da mesma forma, na análise de XDR, tanto os padrões quanto IEF demonstraram possuir um elevado grau de cristalinidade, ao passo que HPβCD

demonstrou ser amorfo. Já o difratograma de mistura física apresentou picos correspondentes ao IEF, indicando a presença de IEF no estado cristalino. Em contraste, os complexos sólidos obtidos a partir dos métodos de micro-ondas, pasta/micro-ondas e co-evaporação apresentaram uma diminuição considerável tanto no número quanto na intensidade dos picos de difração, o que sugere que tais complexos possuem um menor grau de cristalinidade em relação à mistura física. Além disso, os difratogramas dos complexos sólidos obtidos por *spray drying* e por liofilização apresentaram uma ausência de picos agudos (Figuras A25 a A33). Dessa forma, estes resultados sugerem fortemente que os complexos apresentam um arranjo cristalino diferente e que as isoflavonas podem estar provavelmente interagindo com a HPβCD através da formação de complexos de inclusão.

No intuito de verificar a possível formação de complexos de inclusão, análises de FT-IR e RMN dos complexos e da mistura física foram realizadas. O espectro de infravermelho de IEF apresentou bandas de absorção características em 3394 cm^{-1} (–OH livre), 3224 cm^{-1} (–OH ligado, característico de ligações de hidrogênio formada entre –OH em C_5 e o grupamento carbonil em C_4 da genisteína), 3070 cm^{-1} (C-H, sp^2), 2939 cm^{-1} (C-H, sp^3, característico de $–OCH_3$ da gliciteína), 1630 cm^{-1} (C=O), 1614 cm^{-1} (C=C), 1194 cm^{-1} (C-O) e 820 cm^{-1} (*p*-substituição no anel aromático) (Figura A8). Já espectro de infravermelho da HPβCD apresentou bandas de absorção características em 3337.71 cm^{-1} (O–H), 2925 cm^{-1} (C–H) e 1651 cm^{-1} (H–O–H), enquanto a mistura física apresentou bandas de absorção correspondentes aos compostos originais (Figura A10).

Em relação aos complexos sólidos, bandas de absorção características de IEF (3394 cm^{-1}, 3224 cm^{-1}, and 2939 cm^{-1}) não foram identificadas. Já as bandas dos estiramentos de C=O (1630 cm^{-1}), C=C (1614 cm^{-1}) e C-O (1194 cm^{-1}) se apresentaram alargadas e com baixa intensidade nos espectros dos complexos sólidos. Segundo Crupi et al. (2007), mudanças espectrais, em frequências altas, no estiramento de O-H e, em baixas frequências, no estiramento de C=O, C=C, C-O-C e C-O podem ser atribuídas à associação, via ligação de hidrogênio, entre a ciclodextrina e a molécula hóspede durante o processo de complexação. Portanto, tais resultados seriam um indicativo da formação de complexos de inclusão (Figuras A11 a A17).

Na análise ^{1}H unidimensional, o complexo obtido por liofilização apresentou, apenas, deslocamentos químicos nos sinais dos hidrogênios H6 e H8 (anel A) e OH-4' (anel B) pertencentes às isoflavonas. Da mesma forma, o complexo obtido por *spray drying* apresentou deslocamentos químicos nos sinais dos hidrogênios H5 e H6 (anel A) e H2'/6' (anel B) pertencentes às isoflavonas. Por outro lado, os demais complexos demonstraram um maior número de deslocamentos químicos nos sinais dos hidrogênios H2 (anel C); H5, H6, H8, OH-5 e OCH_3 (anel A); e H2'/6' e H3'/5' (anel B) pertencentes às isoflavonas (Tabela A1, Capítulo 3). Em todos os casos, os resultados das perturbações nas densidades eletrônicas moleculares das isoflavonas sugerem a existência de interações entre as isoflavonas e a HPβCD. Estes resultados indicam, portanto, que a inclusão das isoflavonas na cavidade da ciclodextrina pode ocorrer tanto através da inserção do anel A quanto do anel B das isoflavonas, possibilidades já evidenciadas por trabalhos anteriores (Daruhazi et al. 2008; Xavier et al. 2010; Borghetti et al. 2011) (Fig. 1).

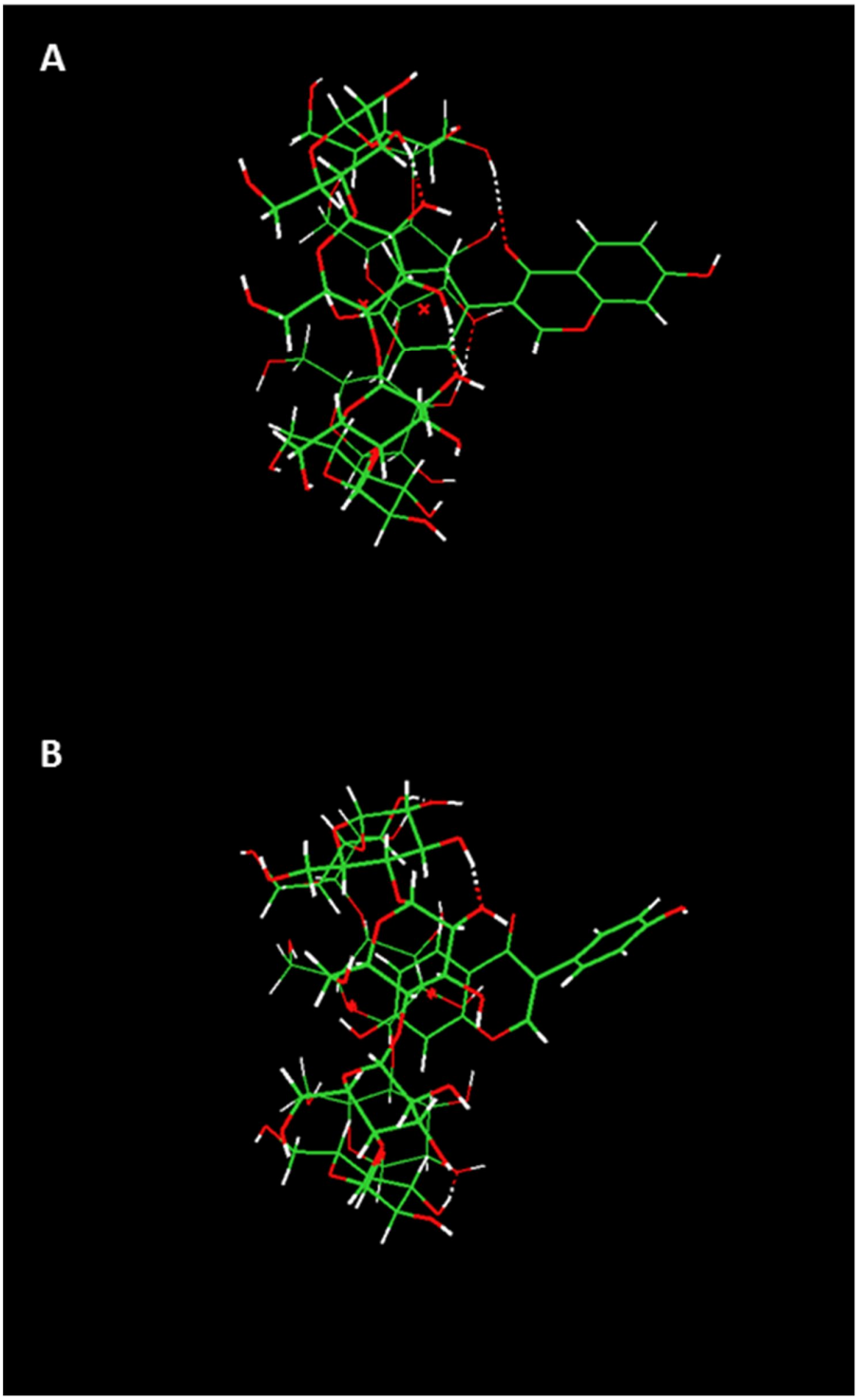


Figura 1. Complexo de inclusão com inserção do anel B na cavidade da β-ciclodextrina (A) e Complexo de inclusão com inserção dos anéis AC na cavidade da β-ciclodextrina (B)

Com relação à análise ^{1}H bidimensional, é possível verificar, em todos os complexos obtidos, a existência de interações intermoleculares entre os sinais dos hidrogênios aromáticos H2'/6' das isoflavonas (7,44-7,24 ppm) e do hidrogênio H5 (3,88-3,85 ppm) da HPβCD. Os complexos também apresentaram interações entre os hidrogênios H8 e H6 (6,94-6,86 ppm) e H3'/5' (6,81 ppm) das isoflavonas e o hidrogênio H4 (3,32-3,38 ppm) da HP-β-CD (Figura A20 a A24). Portanto, a análise de RMN sugere que os complexos de inclusão podem ser formados através da inserção do anel B das isoflavonas na cavidade da ciclodextrina, uma vez que os hidrogênios H3 e H5 da HPβCD estão localizados no interior da cavidade de ciclodextrina. Além disso, os resultados também sugerem que as isoflavonas podem estar externamente associadas à HPβCD, uma vez que o hidrogênio H4 da HPβCD se localiza no exterior da ciclodextrina, sendo tal complexação denominada de complexo de associação, o qual também pode contribuir de maneira significativa para o aumento da solubilidade das isoflavonas (Fig. 2).

Uma vez evidenciada a formação de complexos de inclusão, o teor de isoflavonas nos complexos sólidos e a sua solubilidade em água foram avaliados. Excetuando-se o complexo obtido por liofilização, todos os demais complexos apresentaram teor e solubilidade similares ($p > 0,05$). Cabe destacar que no processo de liofilização, a dispersão de IEF e HPβCD foi filtrada antes do passo de liofilização para remover o material não solubilizado. Portanto, o menor conteúdo de isoflavonas no complexo sólido IEF/HPβCD foi, provavelmente, devido à eliminação do IEF não solubilizado. Além disso, o método de liofilização demonstrou ser o menos eficaz em promover a formação de complexos entre IEF e HPβCD, uma vez que tal complexo sólido apresentou a menor solubilidade. Este resultado pode estar relacionado com o uso de etanol como cossolvente nos demais métodos de complexação avaliados. A solubilização das isoflavonas e HPβCD, promovido pelo etanol, poderia facilitar a interação hidrofóbica entre as isoflavonas e HPβCD e, consequentemente, promover a formação de complexos.

Em suma, este é o primeiro estudo que avalia a complexação simultânea de três isoflavonas com ciclodextrinas e a influência de diferentes métodos sobre a obtenção de complexos. Os resultados sugerem que é possível formar complexos de inclusão entre as isoflavonas daidzeína, gliciteína e genisteína,

na forma isolada ou na forma de mistura, simultaneamente. Também foi evidenciada que a complexação pode ocorrer tanto pela inserção do anel B quanto do anel A na cavidade interna da CD, bem como através de interações entre as isoflavonas e o lado externo da CD.

Por fim, após a obtenção e caracterização dos complexos sólidos de IEF/HPβCD, o objetivo do quarto capítulo deste trabalho foi avaliar o efeito da complexação simultânea da daidzeína, genisteína e gliciteína, presentes na IEF, com HPβCD na permeabilidade intestinal *in vitro* dessas isoflavonas, empregando-se os modelos de células Caco-2 e PAMPA.

De acordo com Artursson e J. Karlsson (1991), substâncias que são completamente absorvidas em humanos possuem coeficientes de permeabilidade aparente (P_{app}) > 1 x 10^{-6} cm/s; fármacos que são absorvidos na faixa de 100% > P_{app} > 1% possuem coeficientes de permeabilidade na faixa de 0,1-1,0 x 10^{-6} cm/s; e fármacos que são pouco absorvidos (< 1%) possuem coeficientes de permeabilidade inferiores a ≤ 1 x 10^{-7} cm/s. Portanto, com base nos resultados obtidos no ensaio de células Caco-2, as isoflavonas isoladas podem ser classificadas como substâncias que são completamente absorvidas em células Caco-2 (Papp> 1 x 10^{-6} cm / s) (Tabela 1, Capítulo 4).

No ensaio PAMPA, as isoflavonas isoladas apresentaram valores de P_{app} similares (p> 0.05). No entanto, os valores de P_{app} da daidzeína e genisteína foram inferiores àquele observado no ensaio de células Caco-2. Já a gliciteína apresentou valores de P_{app} similares (p> 0.05) em ambos os ensaios. De acordo com Kerns et al. (2004), o qual comparou dados de permeabilidade de ensaios em PAMPA e em cálulas Caco-2; a correlação (r) dos valores de P_{app} de PAMPA e Caco-2 na faixa de 0,76-0,92 indicam a predominância de difusão passiva na permeação, a correlação de PAMPA << Caco-2 indicam a predominância de transporte ativo (paracelular e transcelular), e a correlação de PAMPA >> Caco-2 indicam a predominância de efluxo. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que a permeação da daidzeína e da genisteína ocorre predominantemte via transporte ativo, enquanto e permeação de gliciteína ocorre predominantemente via difusão passiva (Figura 1, Capítulo 4). Este resultado está parcialmente de acordo com Kobayashi et al. (2013), que observou um r^2 semelhante para daidzeína. Nesse estudo, o valore de P_{app} da

genisteína no ensaio Caco-2 foi maior do que o seu respectivo valor de Papp no ensaio PAMPA.

Ao compararmos os valores de P_{app} do ensaio Caco-2 das isoflavonas isoladas com os valores de IEF, daidzeína e genisteína apresentaram um valor de P_{app} superior ao observado para IEF. Somente o valor de P_{app} da gliciteína não foi afetado pela presença das outras isoflavonas. Tais resultados estão de pleno acordo com Oitate et al. (2001), que demonstrou que o transporte da genisteína através das células Caco-2 era saturável e dependente da temperatura, sendo negativamente afetado pela rutina, quercetina, (+)-catequina e (-)-epicatequina. Os autores ainda sugeriram que o transporte da genistein através das células Caco-2 ocorreria por intermédio de um sistema de transporte comum a outros flavonoides localizado na membrana apical. Nesse contexto, nossos resultados são um indicativo de que tanto a daidzeína quanto a genisteína compartilham o mesmo sistema de transporte, enquanto a gliciteína seria transportada por difusão passiva.

Por fim, o efeito da complexação de IEF com HPβCD na permeabilidade intestinal das isoflavonas foi avaliado. Neste trabalho, nós anteriormente demonstramos que a HPβCD era capaz de aumentar significativamente a solubilidade em das isoflavonas presentes em IEF em água e, mais recentemente, Daruhazi et al. (2013) demonstrou que diferentes ciclodextrinas (βCD, HPβCD, RMβCD e γCD) eram capazes de promover um incremento no transporte da daidzeína e da genisteína através de células Caco-2. Já no presente estudo, observou-se que a complexação com HPβCD causou um grande efeito negativo sobre a permeabilidade intestinal das isoflavonas. Ambos os valores de P_{app} (Caco-2 e PAMPA) e fração total transportada dos complexos sólidos de IEF/HPβCD, preparados por todas as técnicas, foram significativamente menores do que os valores observados para a fração livre, excetuando-se o complexo sólido preparado por *spray drying,* o qual apresentou um resultado bastante positivo. Tanto a permeabilidade da daidzeína quanto da gliciteína presentes nesse complexo apresentaram valores similares ao da fração livre ($p > 0,05$), enquanto a permeabilidade da genisteína apresentou uma melhora significativa ($p < 0,05$), sendo este último fenômeno também observado na permeabilidade da genisteína presente no complexo sólido preparado por co-evaporação (Figura 2, Capítulo 4).

Anteriormente, também se observou, no estudo de solubilidade de fases, uma constante de estabilidade de $397M^{-1}$ e eficiência de complexação de 0,0920 a 37°C para o complexo IEF/HPβCD. De acordo com Dahan et al. (2012) e Beig et al. (2013), a diminuição da permeabilidade pode estar relacionada a diminuição da fração livre do fármaco disponível no fluido gastrointestinal. Uma vez que apenas a fração livre da substância é absorvida através da mucosa gastrointestinal, fatores que influenciam o teor de fração livre, tais como a magnitude da constante de estabilidade entre o fármaco e a ciclodextrina e a presença de um excesso de ciclodextrina, irão afetar negativamente a biodisponibilidade do fármaco. Portanto, o efeito negativo da HPβCD no transporte de isoflavonas pode estar relacionado com a existência de um excesso de HPβCD não complexada, uma vez que o complexo HPβCD/IEF apresentou uma eficiência de complexação de baixa magnitude.

O mesmo grupo de pesquisa acima citado, em um trabalho anterior, demonstraram que a supersaturação do fármaco obtida através de uma dispersão sólida amorfa preparada por *spray drying* era capaz de previnir tal compensação entre o aumento da solubilidade e diminuição da permeabilidade observada para outras formulações preparadas a fim de promover o aumento da solubilidade (Miller et al. 2012). Dessa forma, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Mas de acordo com os resultados apresentados, é razoável concluir que, entre os métodos de complexação testados, o *spray drying* pode ser considerado como uma abordagem promissora para melhorar permeabilidade intestinal das isoflavonas.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no o presente trabalho permitem elaborar as conclusões que seguem:

- O método de análise desenvolvido para a determinação de isoflavonas, na forma de agliconas, em diferentes matrizes, demonstrou ser rápido, versátil, econômico, linear, preciso, seletivo e específico;
- As isoflavonas de soja (daidzeína, gliciteína e genisteína) demonstraram ser sensíveis, em meio líquido, a elevadas temperaturas (60 ºC) e à radiação ultravioleta (UVC) na presença de agente oxidante (peróxido de hidrogênio) e em pH básico;
- O método de extração e purificação desenvolvido, após ser otimizado, permitiu a obtenção de uma fração padronizada, contendo alto teor de isoflavonas-agliconas, com baixo custo;
- A fração enriquecida em isoflavonas agliconas apresentou baixa solubilidade em água. Porém, esta foi superior à solubilidade das isoflavonas isoladas;
- A solubilidade da gliciteína em água foi determinada e a complexação desta molécula com a β-ciclodextrina e 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina foi de 0,05 mM a 24°C, sendo estes relatos inéditos sobre esta molécula;
- No estudo de complexação com β-ciclodextrina e 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (solubilidade de fases), verificou-se que as ciclodextrinas são capazes de aumentar significativamente e de maneira linear a solubilidade das isoflavonas presentes na fração desenvolvida;
- No estudo de solubilidade de fases, a genisteína apresentou a maior dissolução intrínseca. No entanto, a daidzeína e gliciteína apresentaram maior incremento na sua solubilidade após a complexação com as ciclodextrinas, sendo a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina mais efetiva comparativamente à β-ciclodextrina;
- O aumento da temperatura do meio de complexação levou a uma redução significativa na eficiência de complexação, especialmente para a genisteína, sugerindo a formação dos complexos ocorre por meio de processo exotérmico;
- A obtenção de complexos sólidos de isoflavonas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina foram obtidos com sucesso utilizando-se os métodos de

pasta/micro-ondas, liofolização, co-evaporação, *spray drying* e micro-ondas, sendo o método de liofilização o menos efetivo;

- Os resultados obtidos na caracterização físico-química dos complexos sólidos sugerem fortemente que há a formação de complexos de inclusão e de associação;
- Os dados referentes à análise de ressonância magnética nuclear sugerem que os complexos de inclusão são preferencialmente formados pela inserção do anel B das isoflavonas na cavidade da 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, corroborando, assim, alguns dados da literatura;
- Com base nos resultados obtidos no ensaio de células Caco-2, as isoflavonas isoladas podem ser classificadas como fármacos que são completamente absorvidos em células Caco-2;
- Os resultados obtidos no ensaio de células Caco-2 e PAMPA indicam que a permeação da daidzeína e da genisteína ocorre predominantemente via transporte ativo, enquanto e permeação de gliciteína ocorre predominantemente via difusão passiva. Da mesma forma, indicam que a daidzeína e a genisteína podem compartilhar o mesmo sistema de transporte;
- A complexação de IEF com HPβCD causou um efeito negativo sobre a permeabilidade intestinal das isoflavonas para a mioria dos complexos testados;
- Tanto o complexo sólido, preparado por *spray drying* quanto por co-evaporação apresentaram uma melhora significativa permeabilidade da genisteína ($p < 0,05$).

6 ANEXOS

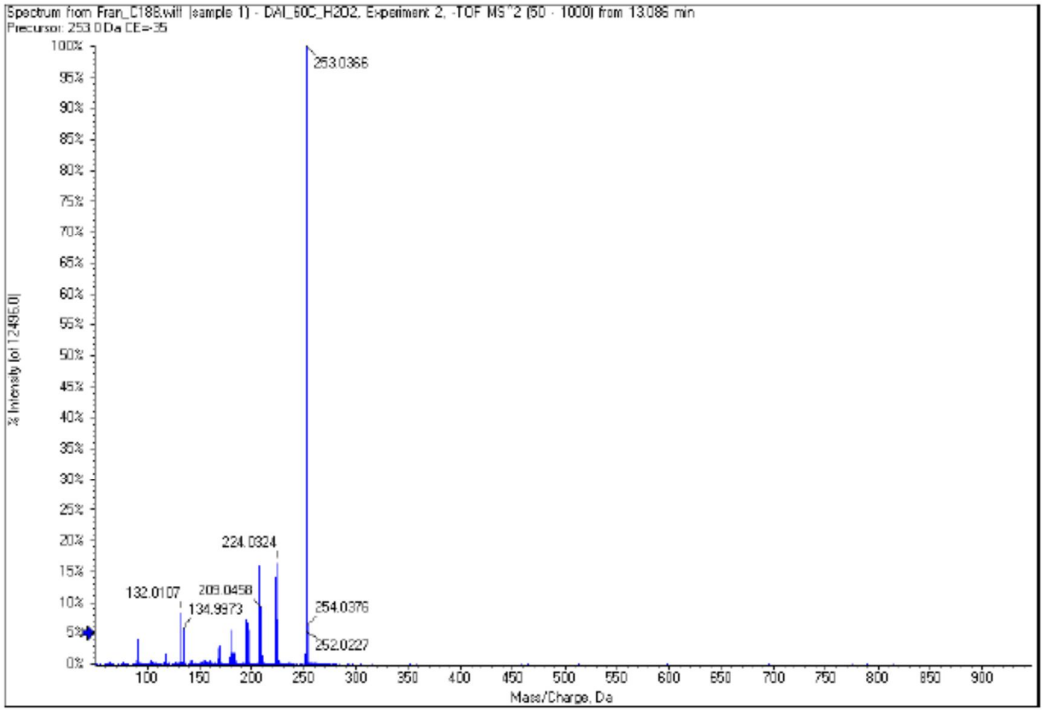


Figura A1. Espectro de massas da daidzeína

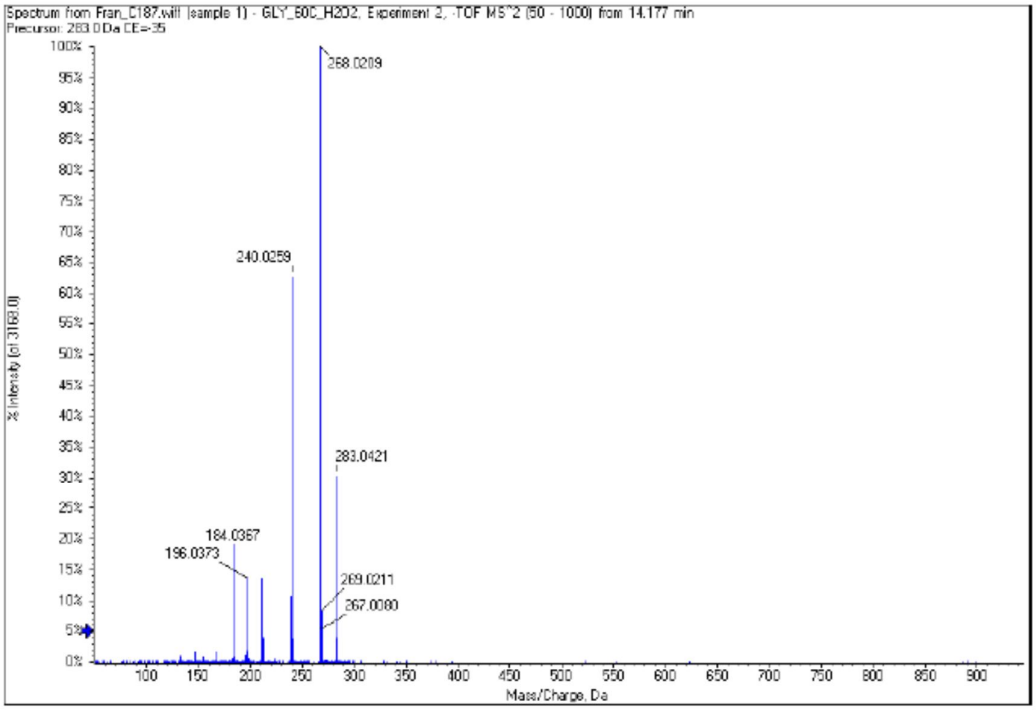


Figura A2. Espectro de massas da gliciteína

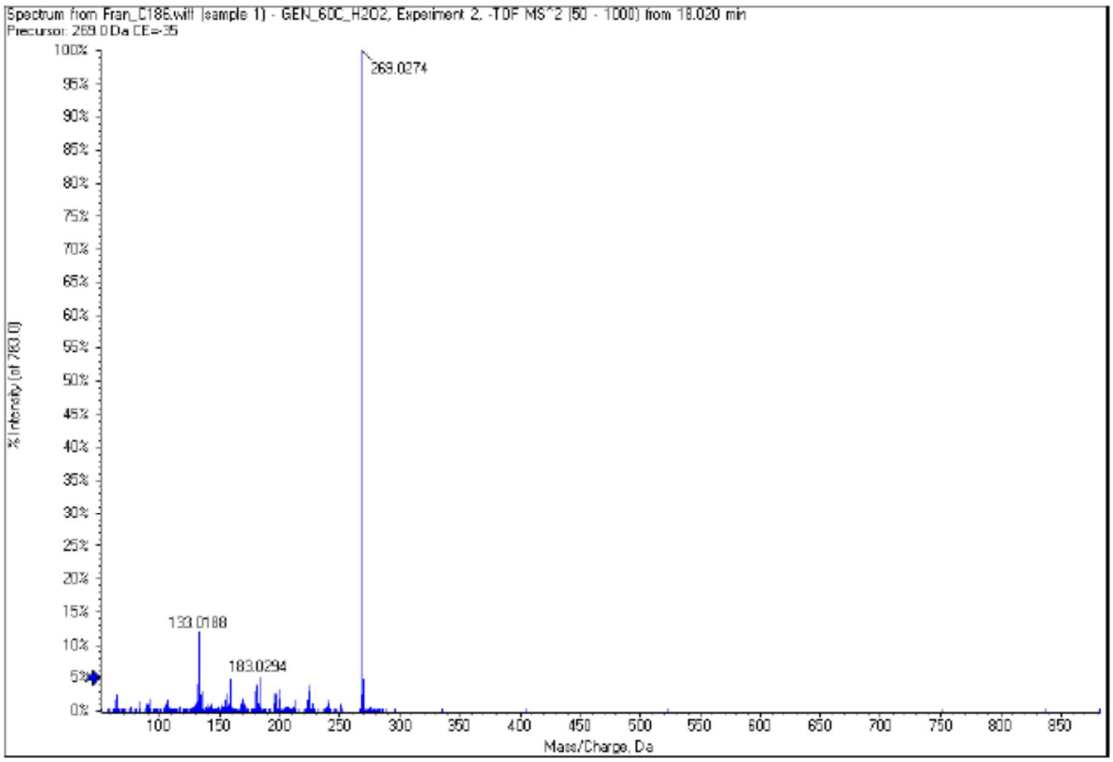


Figura A3. Espectro de massas da genisteína

CILAS

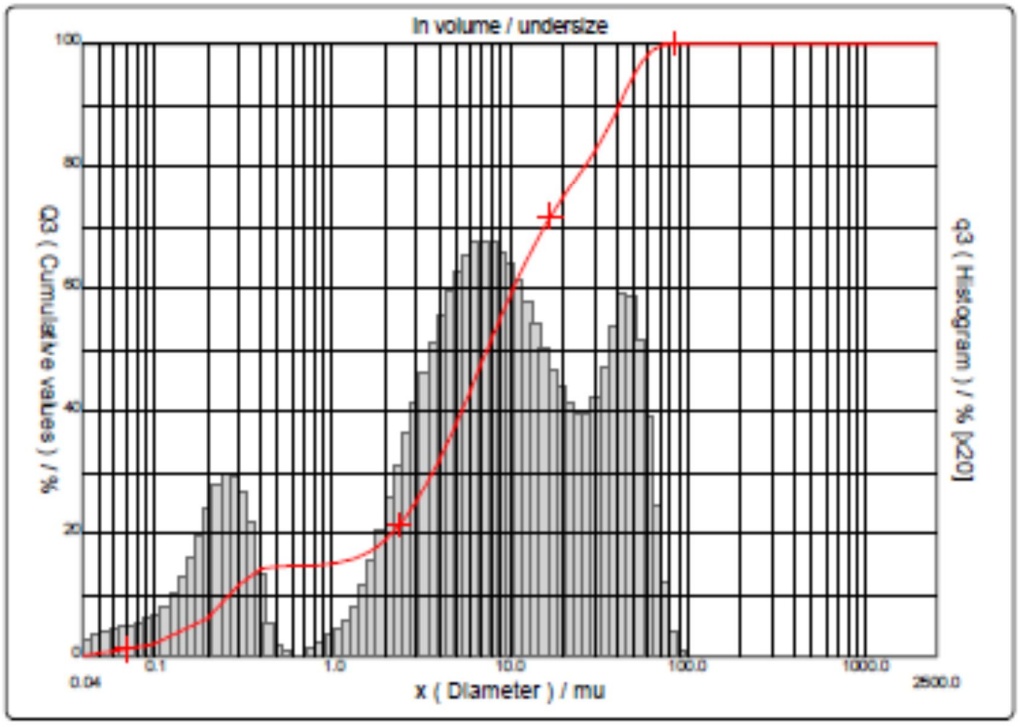
PARTICLE SIZE DISTRIBUTION

CILAS 1180 Liquid

Range : 0.04 mu - 2500.00 mu / 100 Classes

Sample Ref	: Isoflavonas de soja
Type produit	: Pó branco
Client	: LDG
Comments	:
Liquid	: Silicone oil (dimethyl)
Dispersing agent	:
Operator	: Malu
Company	:
Location	:
Date : 30/05/2011	Time : 11:30:03
Index meas.	: 639

Ultrasounds	: 60	s (+during)
Concentration	: 138	
Diameter at 10%	: 0.26	mu
Diameter at 50%	: 7.44	mu
Diameter at 90%	: 41.30	mu
Mean diameter	: 14.32	mu
Fraunhofer		
Density/Factor	———	
Specific surface	———	
Automatic dilution	: No / No	
Meas./Rins.	: 60/60/3	
SOP : LACER		



Serial nb : 570

FiguraA4. Análise de tamaho de partícula da fração rica em isoflavonas na forma de agliconas (IEF) por difração a *Laser*

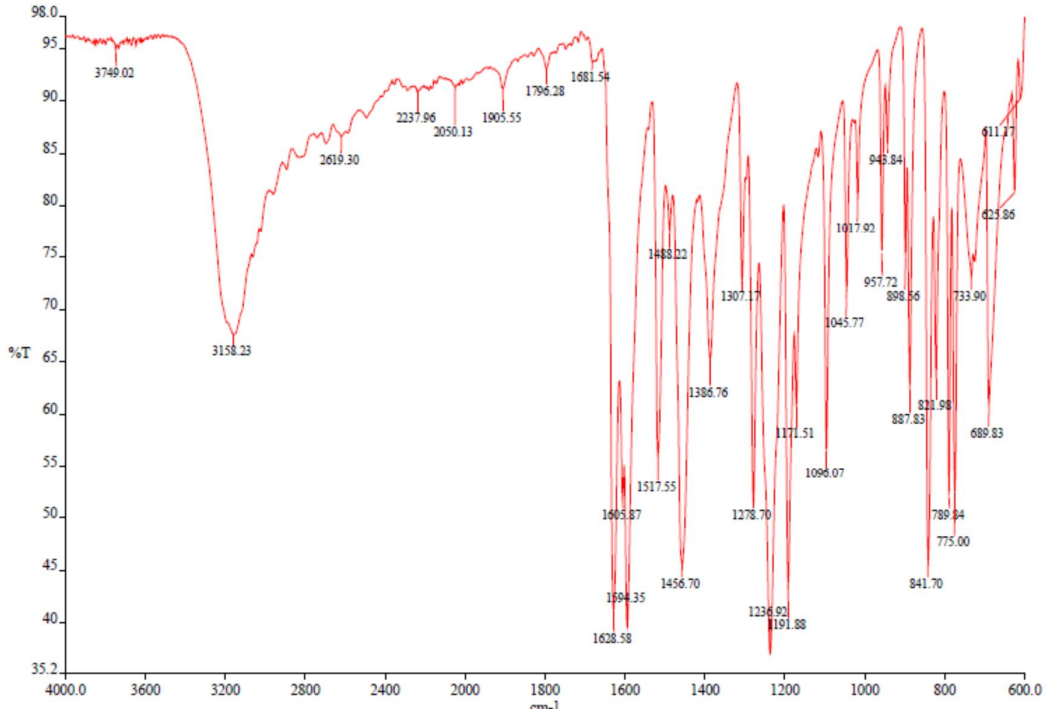


Figura A5. Espectro de infravermelho da daidzeína

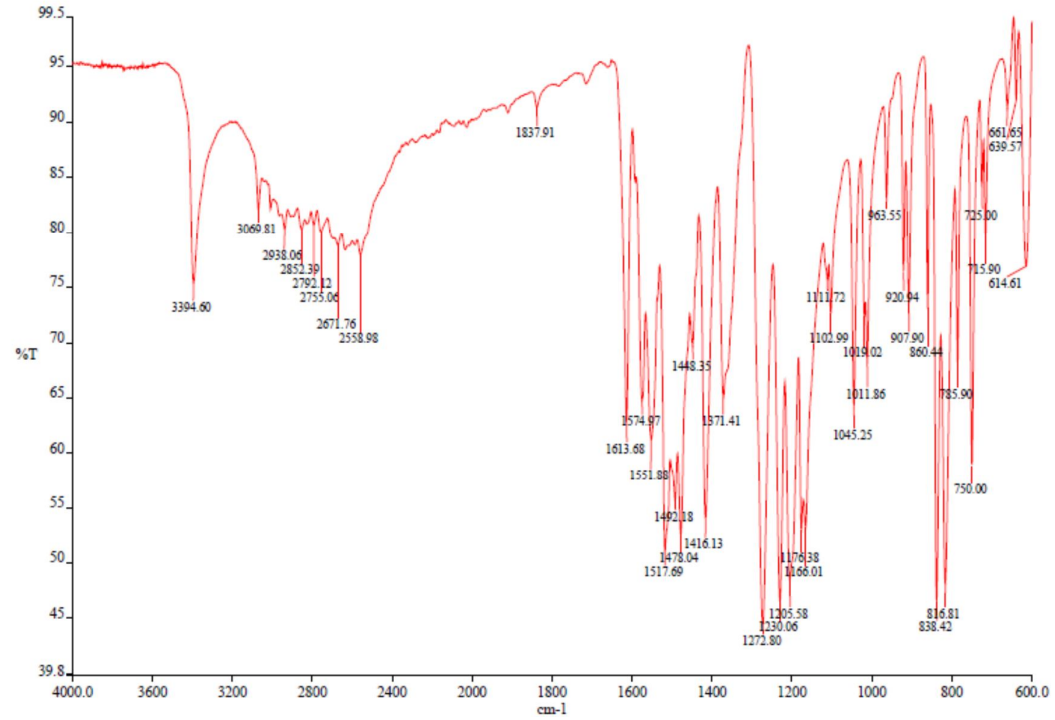


Figura A6. Espectro de infravermelho da gliciteína

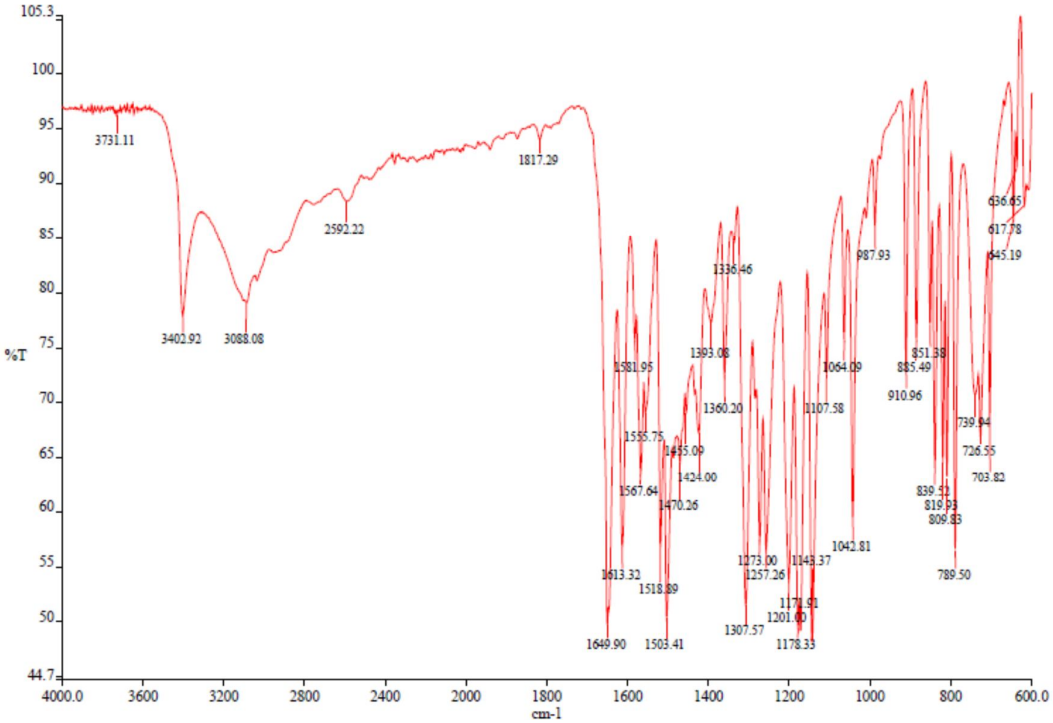


Figura A7. Espectro de infravermelho da genisteína

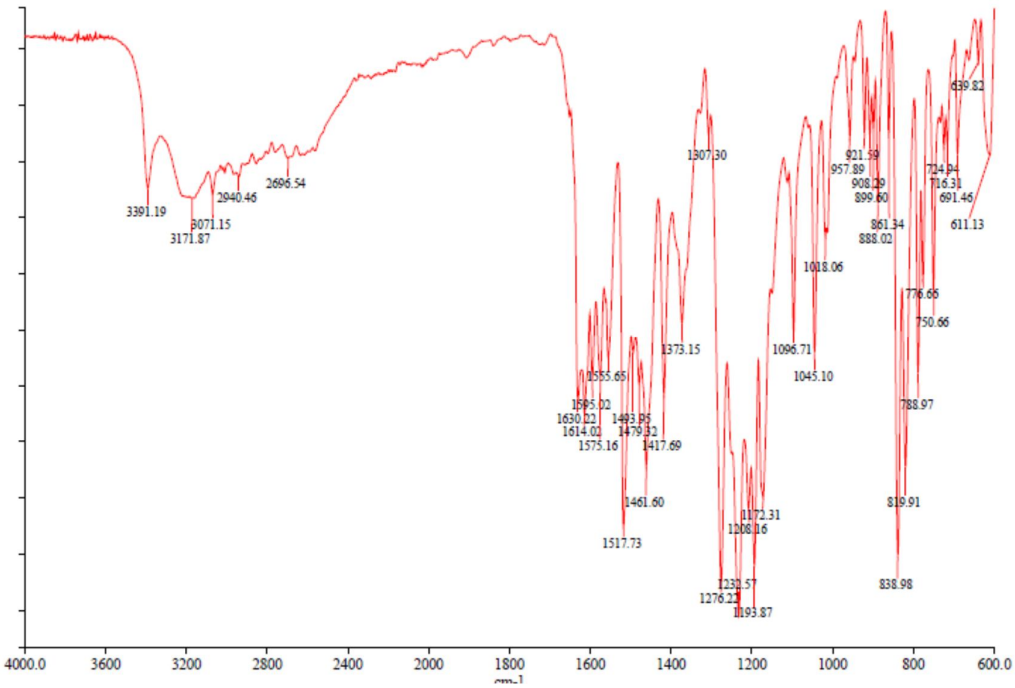


Figura A8. Espectro de infravermelho da fração rica em isoflavonas agliconas

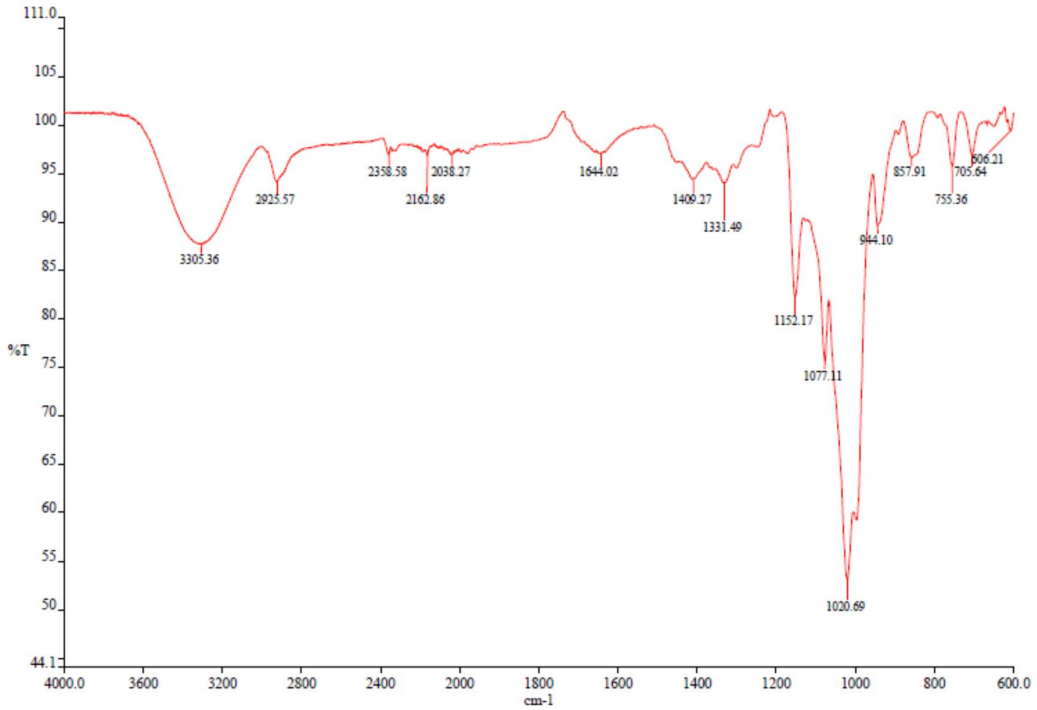


Figura A9. Espectro de infravermelho da β-ciclodextrina

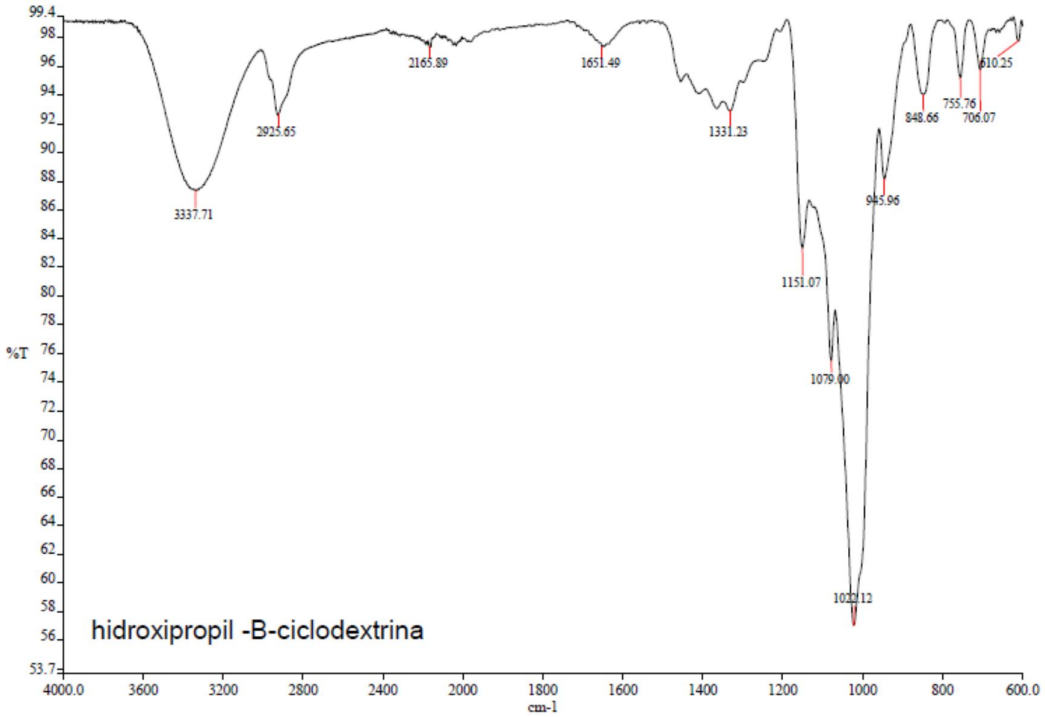


Figura A10. Espectro de infravermelho da 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD)

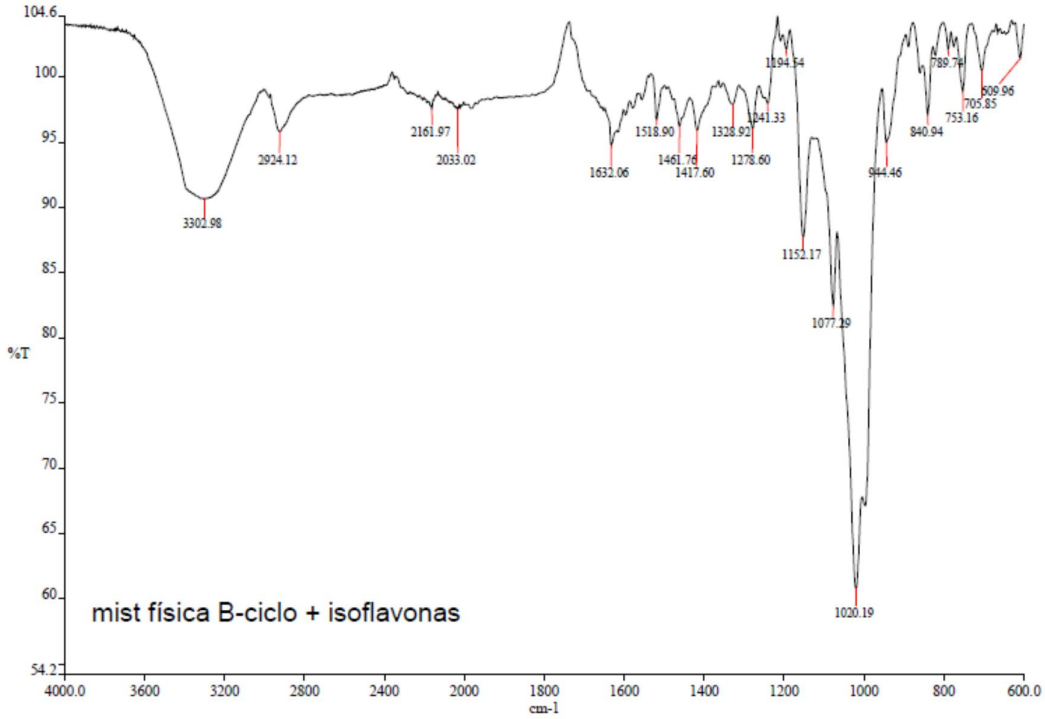


Figura A11. Espectro de infravermelho da mistura física de fração rica em isoflavonas agliconas com a β-ciclodextrina na proporção 1:1

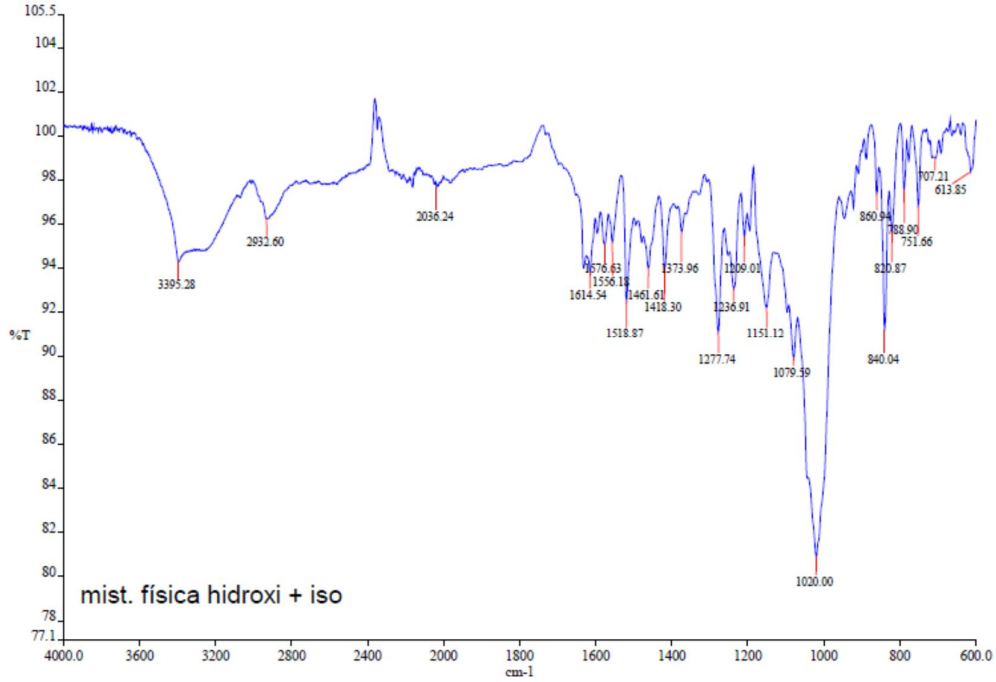


Figura A12. Espectro de infravermelho da mistura física de fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) na proporção 1:1

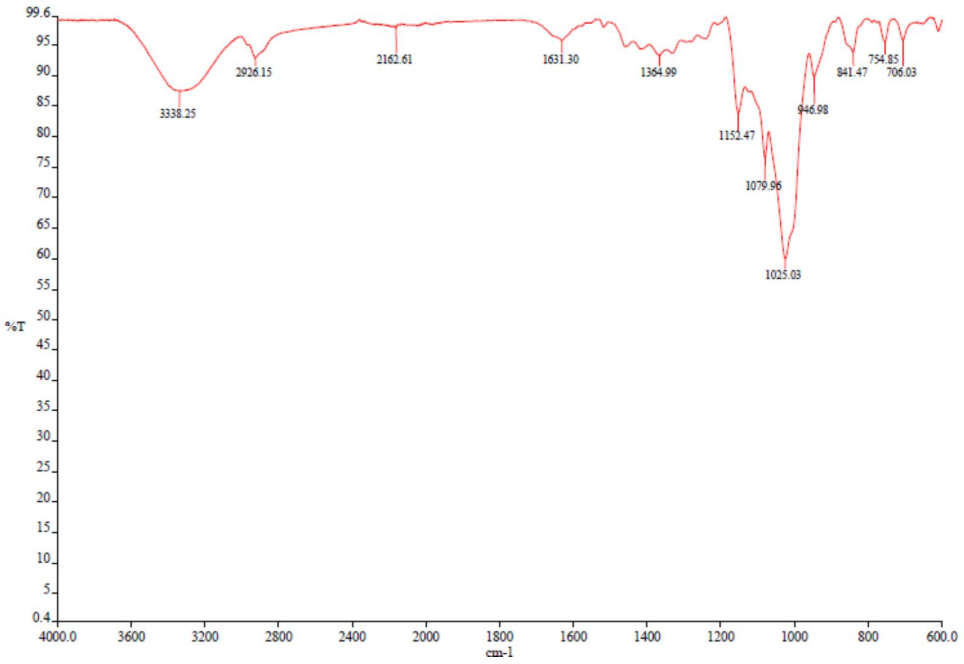


Figura A13. Espectro de infravermelho do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de liofilização

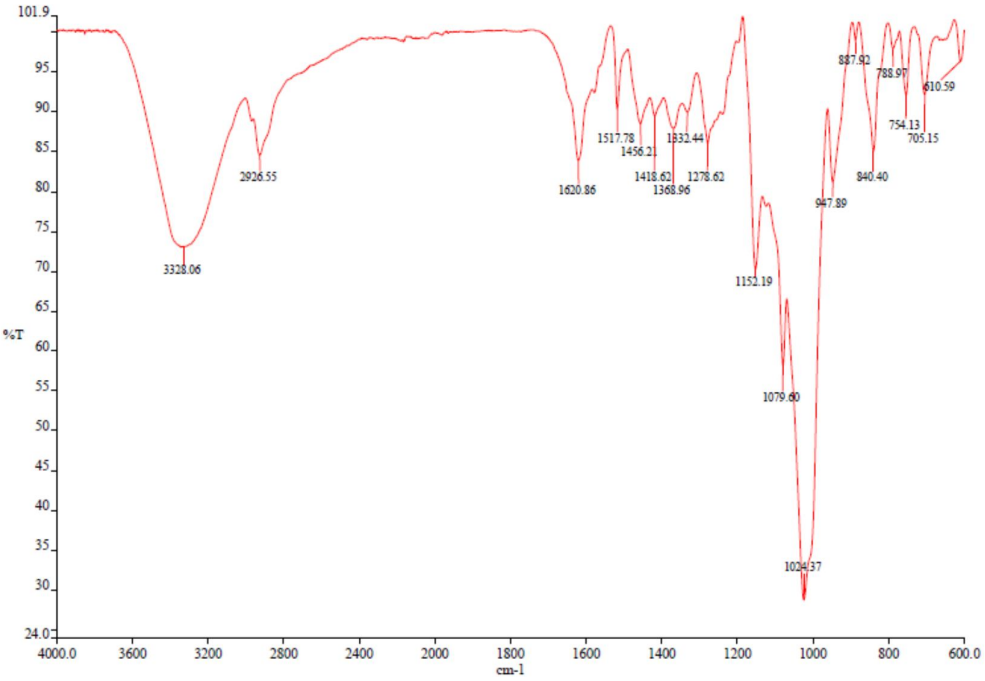


Figura A14. Espectro de infravermelho do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de *spray drying*

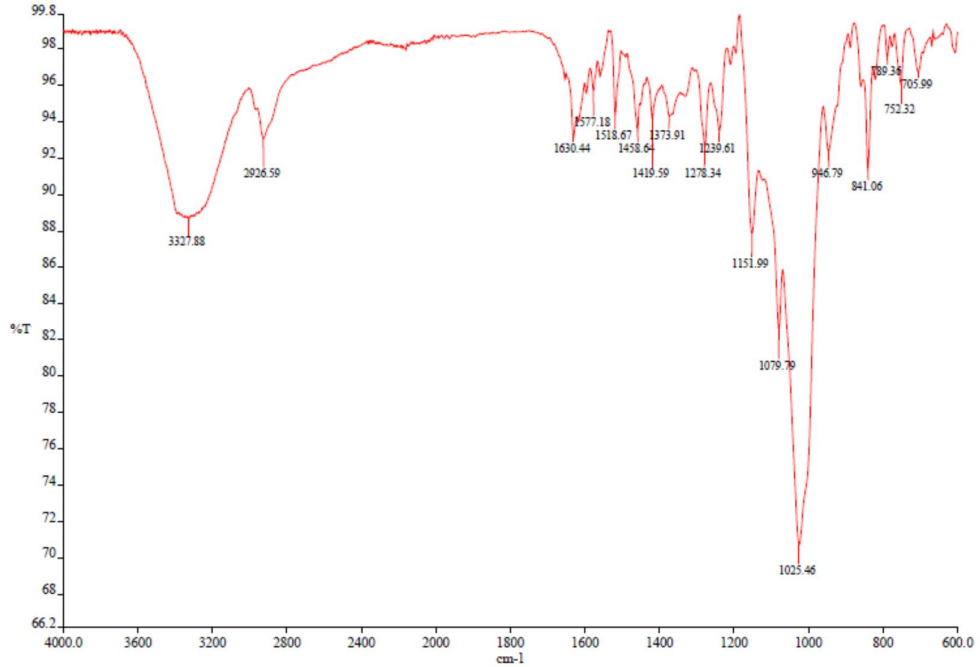


Figura A15. Espectro de infravermelho do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de pasta/micro-ondas

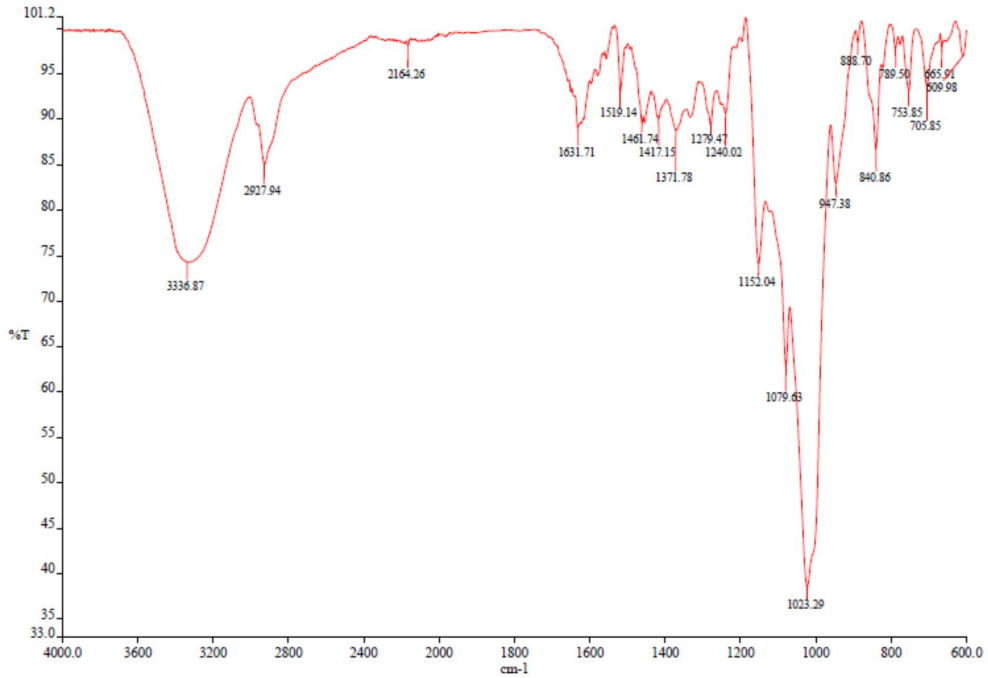


Figura A16. Espectro de infravermelho do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de micro-ondas

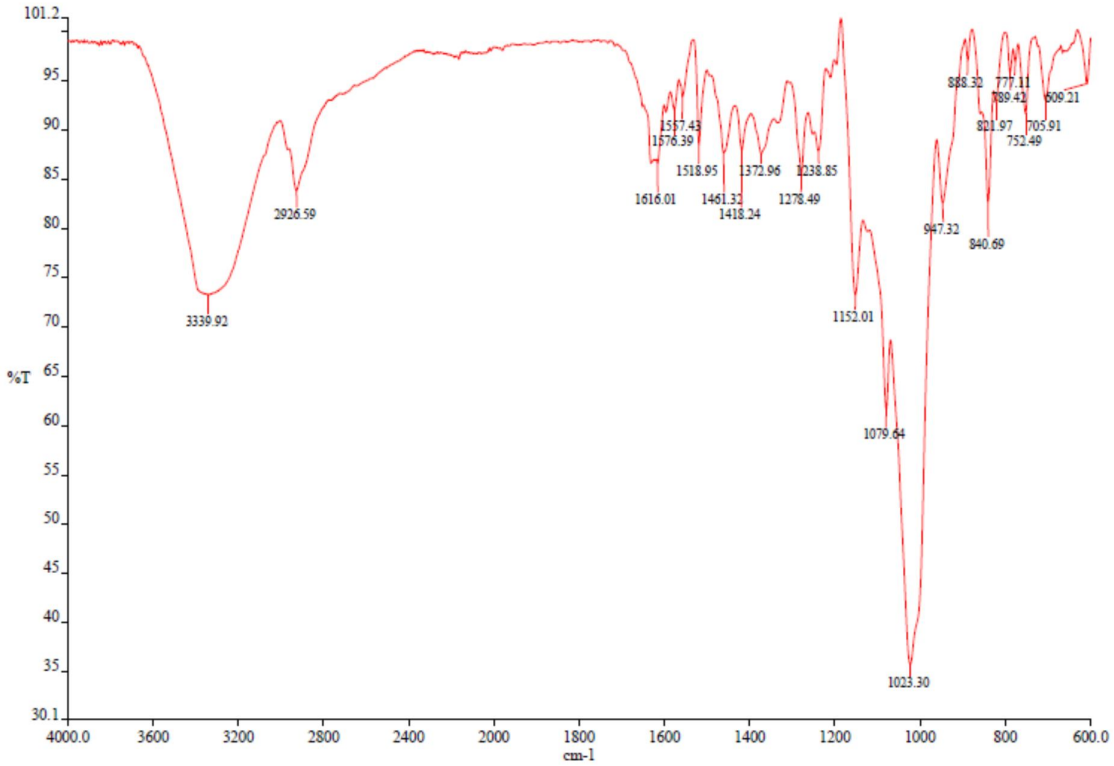


Figura A17. Espectro de infravermelho do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de co-evaporação

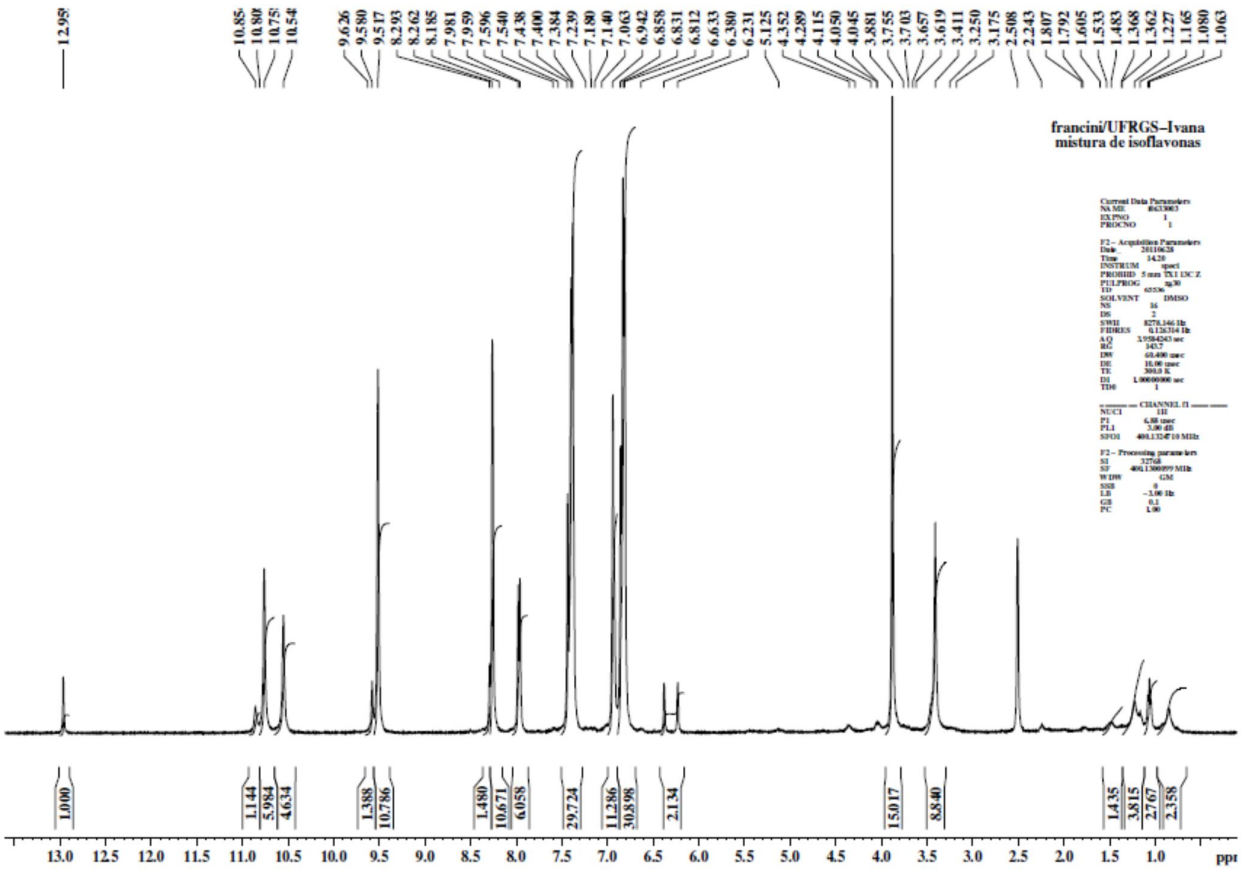


Figura A18. Espectro de ressonâcia magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^{1}H) da fração rica em isoflavonas agliconas 300 K (400 MHz, DMSO-d_6)

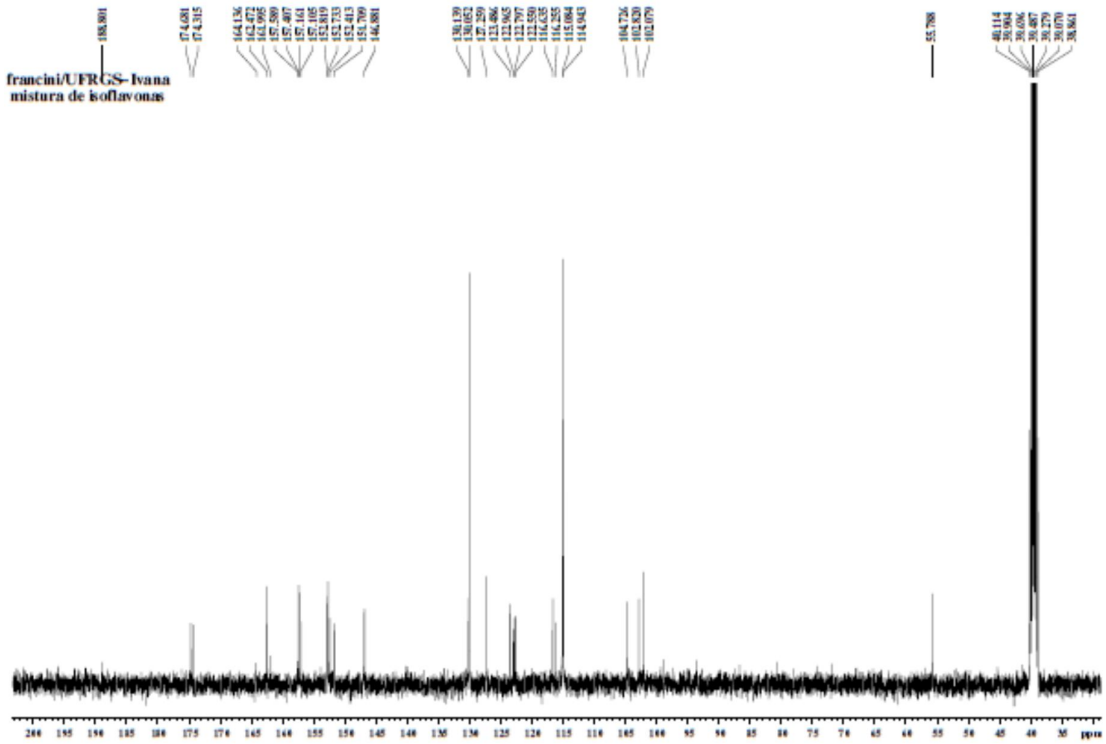


Figura A19. Espectro de ressonâcia magnética nuclear (RMN) de carbono (^{13}C) da fração rica em isoflavonas agliconas 300 K (100 MHz, DMSO-d_6)

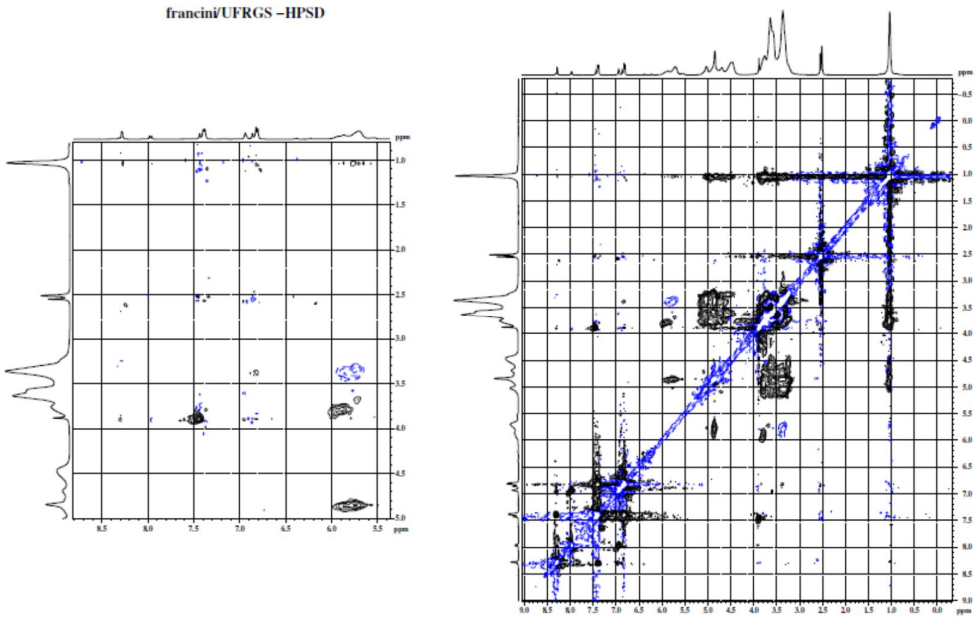


Figura A20. Espectro de ressonâcia magnética nuclear 2D-ROESY (400 MHz, D_2O) do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de *spray drying*

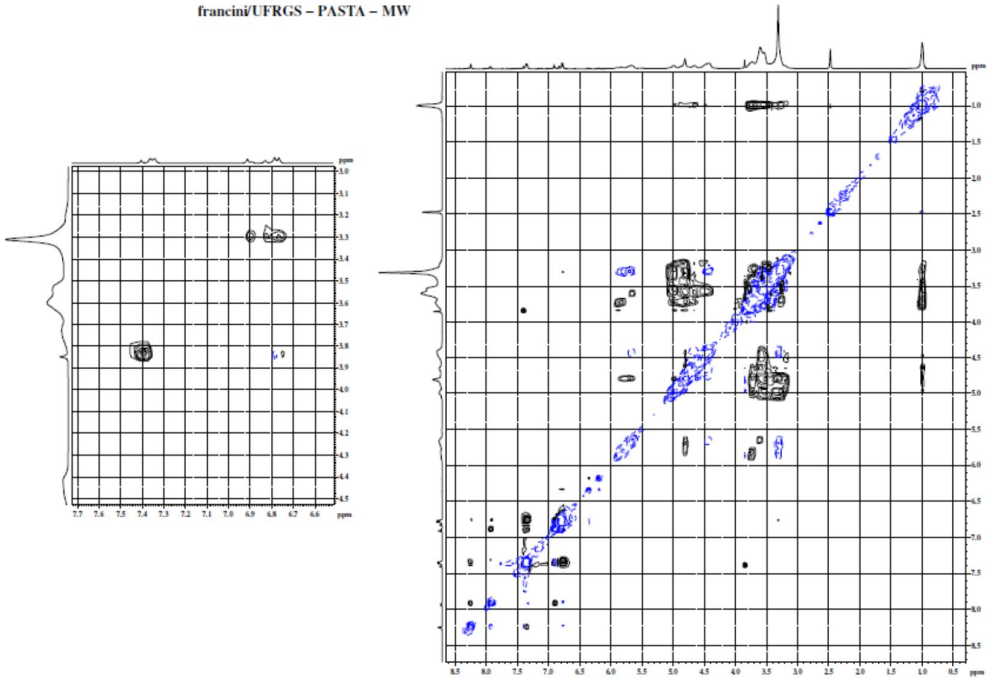


Figura A21. Espectro de ressonâcia magnética nuclear 2D-ROESY (400 MHz, D_2O) do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de pasta/micro-ondas

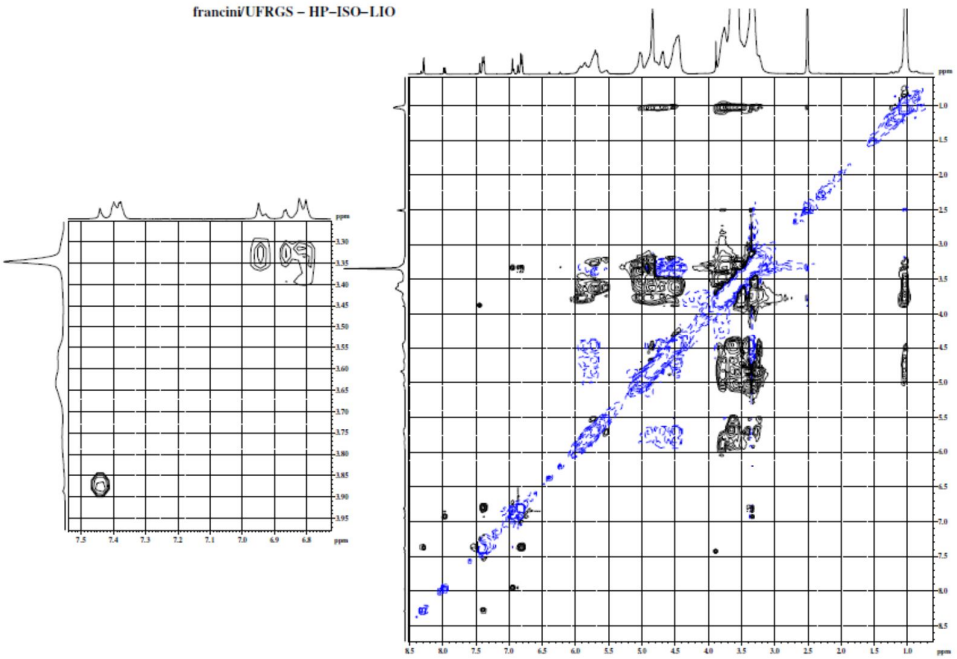


Figura A22. Espectro de ressonâcia magnética nuclear 2D-ROESY (400 MHz, D_2O) do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de liofilização

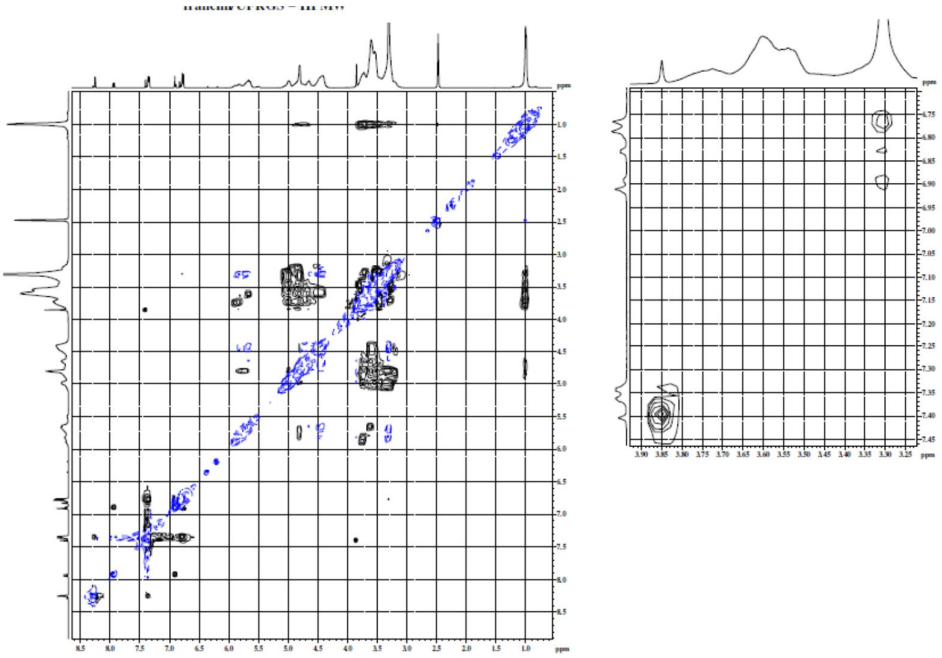


Figura A23. Espectro de ressonâcia magnética nuclear 2D-ROESY (400 MHz, D_2O) do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de micro-ondas

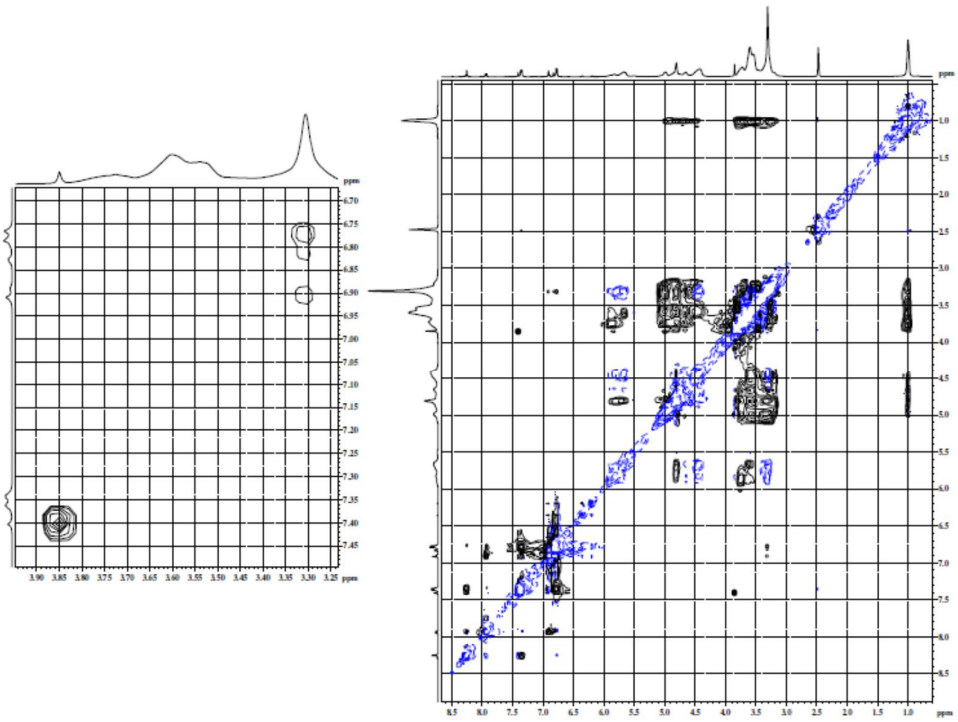


Figura A24. Espectro de ressonâcia magnética nuclear 2D-ROESY (400 MHz, D_2O) do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de co-evaporação

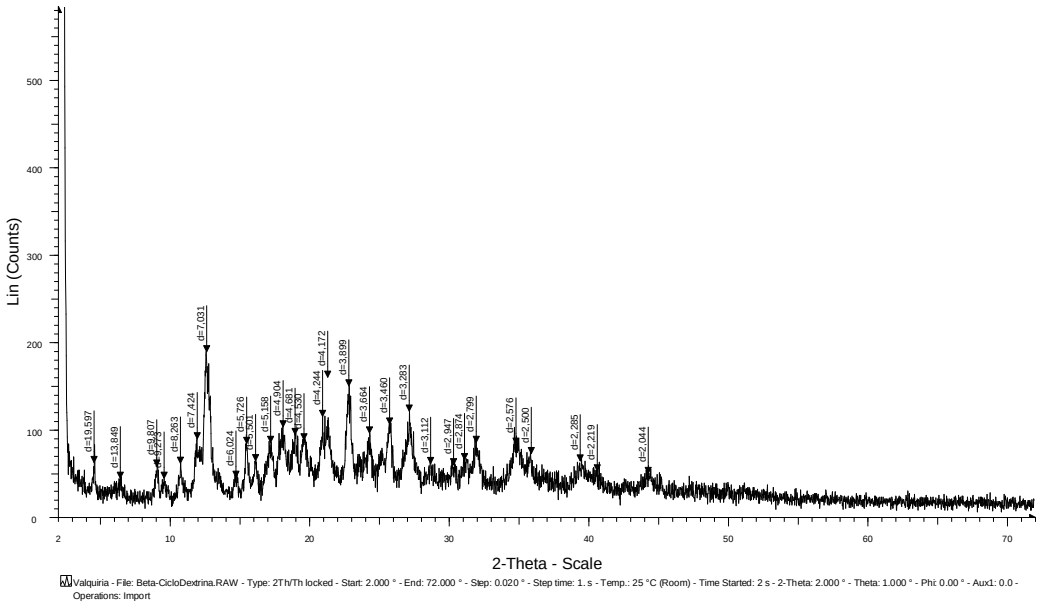


Figura A25. Difratograma de raios X da β-ciclodextrina

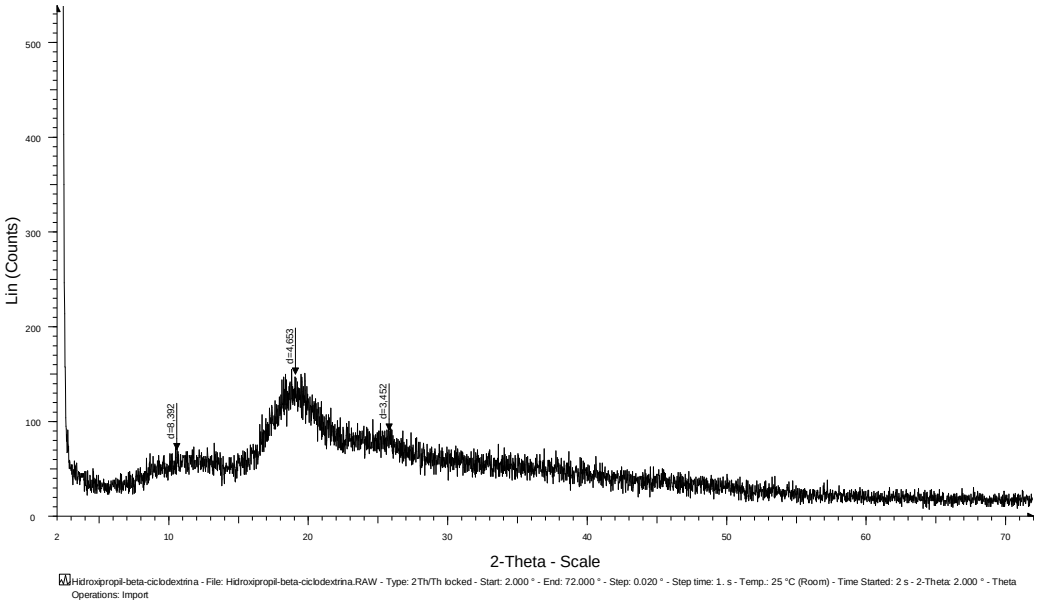


Figura A26. Difratograma de raios X da 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina

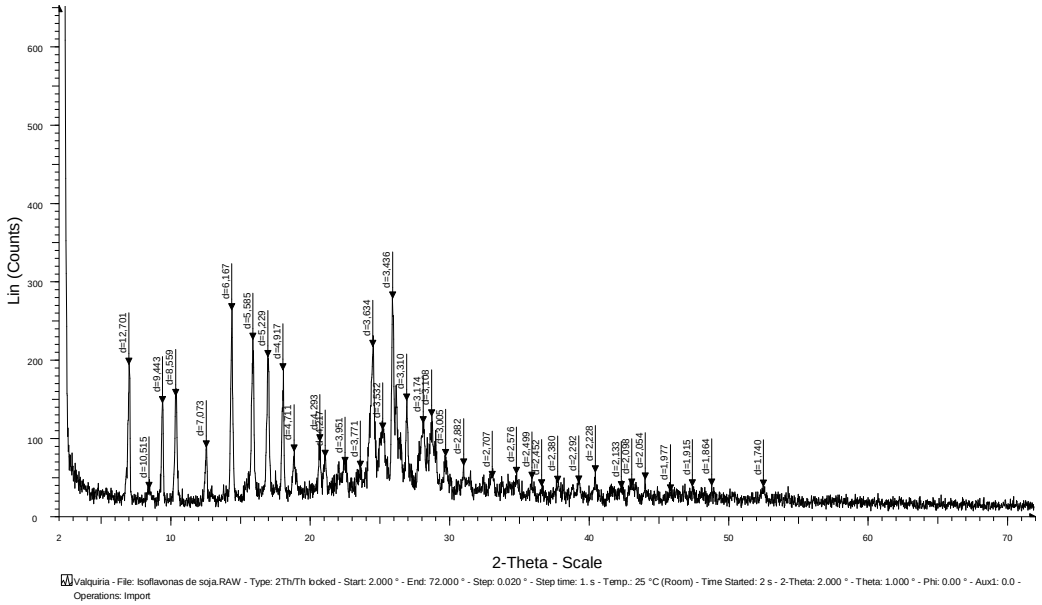


Figura A27. Difratograma de raios X da fração rica em isoflavonas agliconas

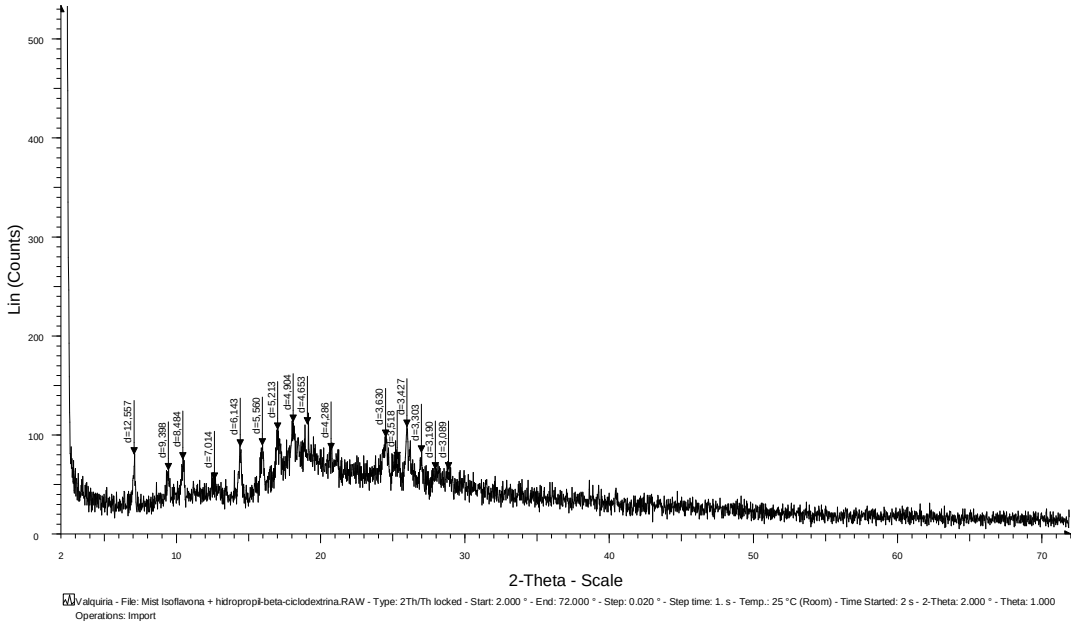


Figura A28. Difratograma de raios X da mistura física da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina na proporção de 1:1

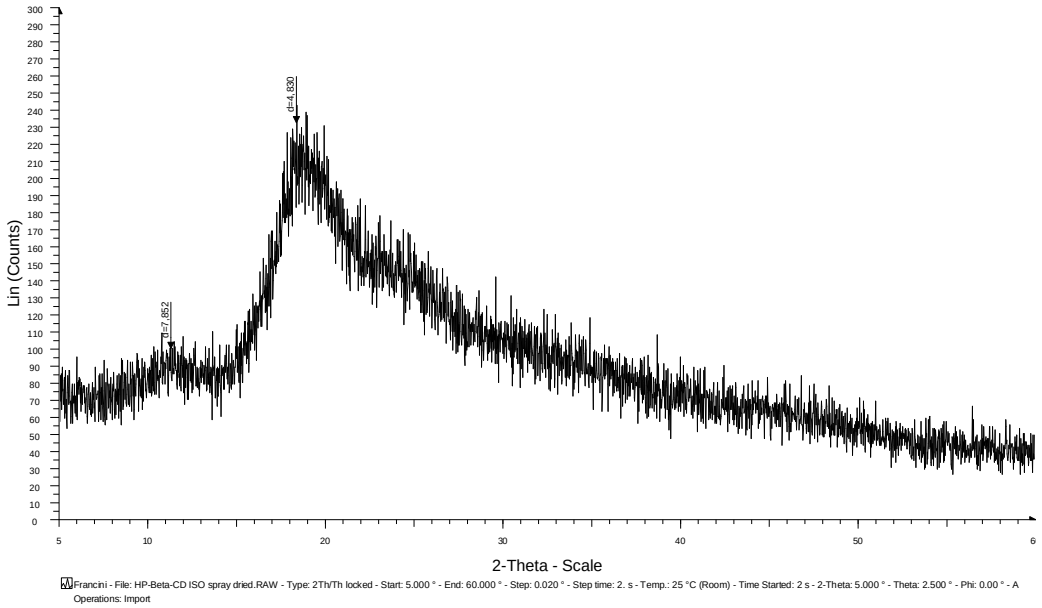


Figura A29. Difratograma de raios X do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de *spray drying*

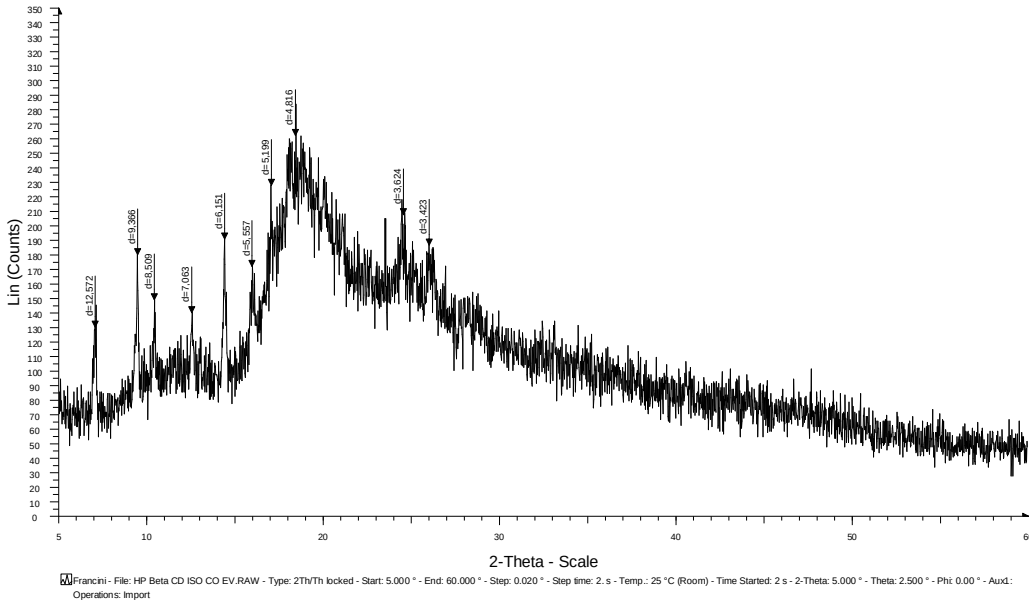


Figura A30. Difratograma de raios X do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de co-evaporação

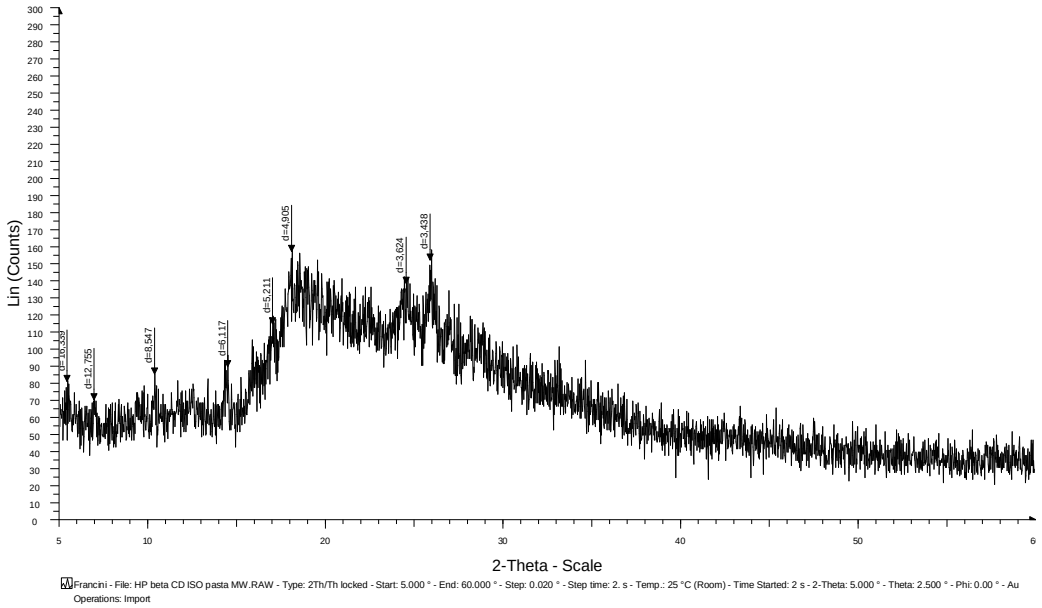


Figura A31. Difratograma de raios X do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de pasta/micro-ondas

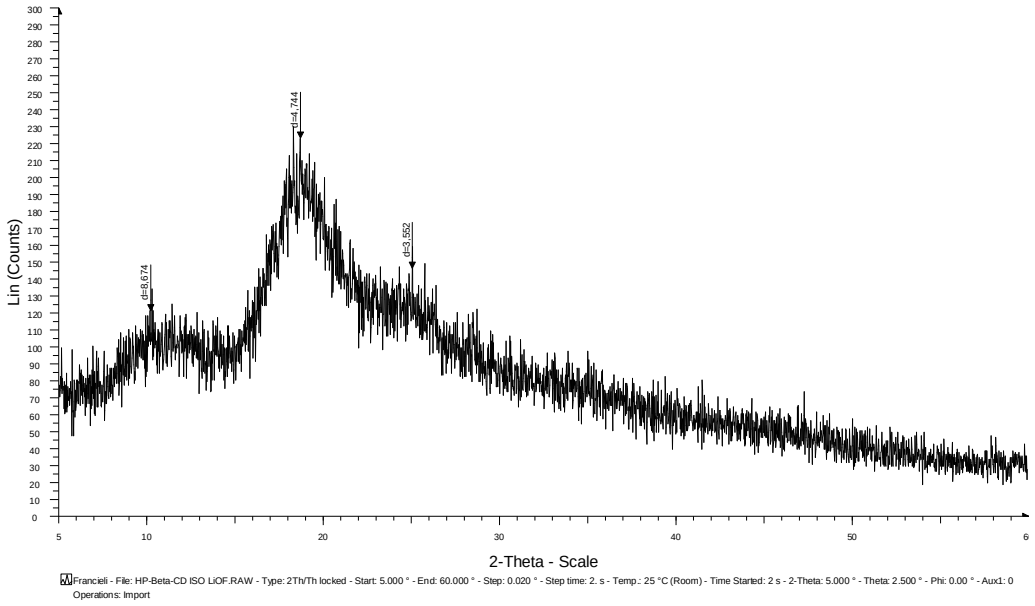


Figura A31. Difratograma de raios X do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de liofilização

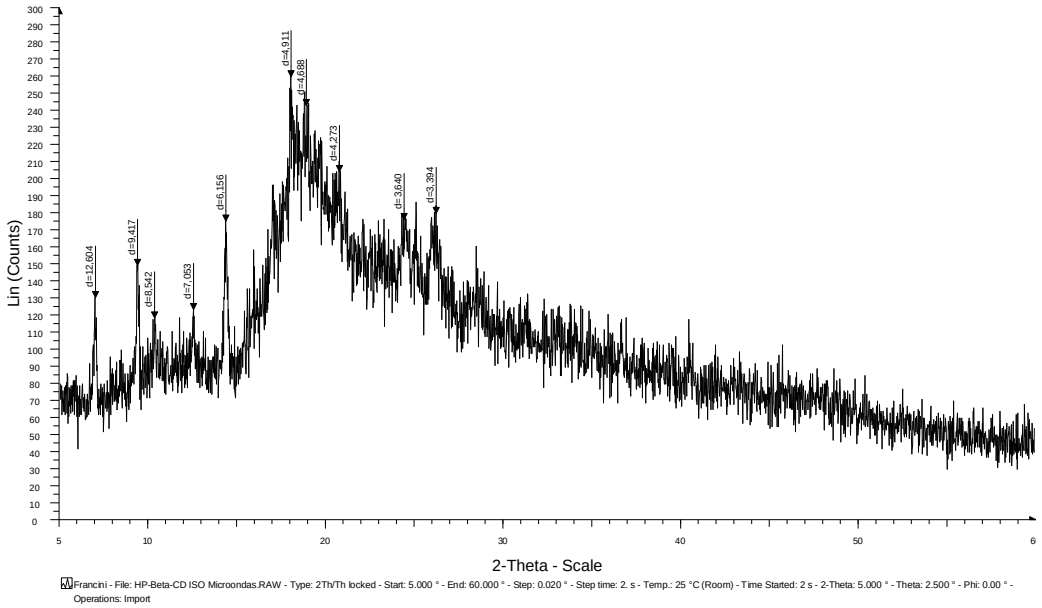


Figura A33. Difratograma de raios X do complexo sólido da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de micro-ondas

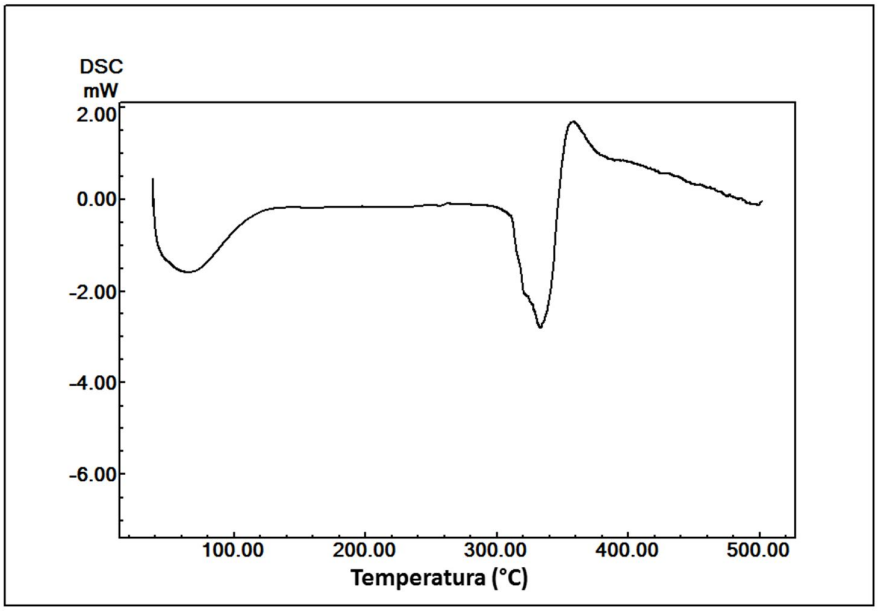


Figura A34. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD)

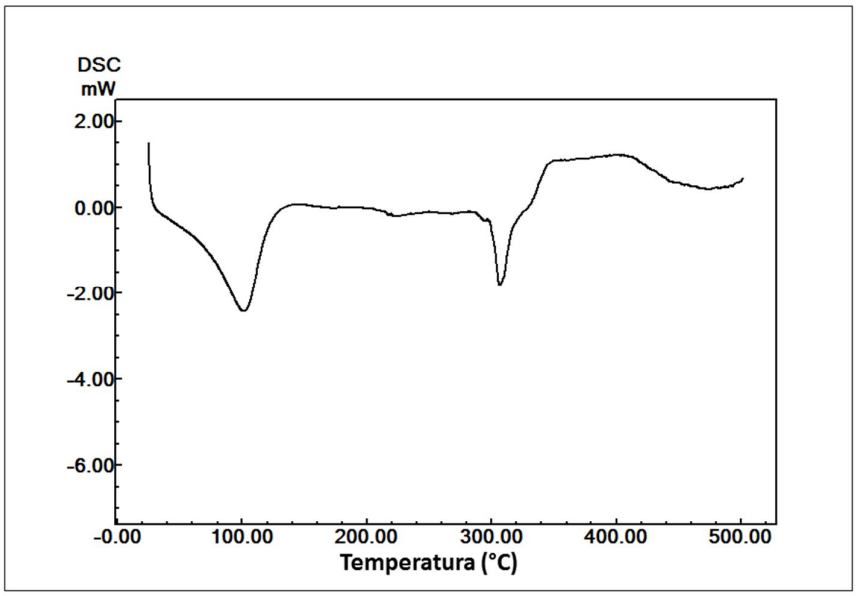


Figura A35. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da 2- β-ciclodextrina (βCD)

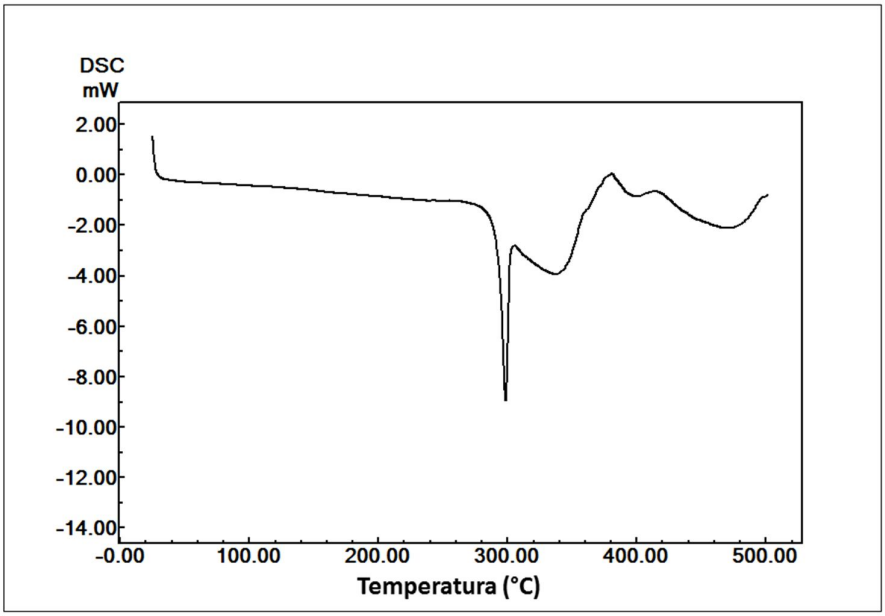


Figura A36. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da fração rica em isoflavonas agliconas

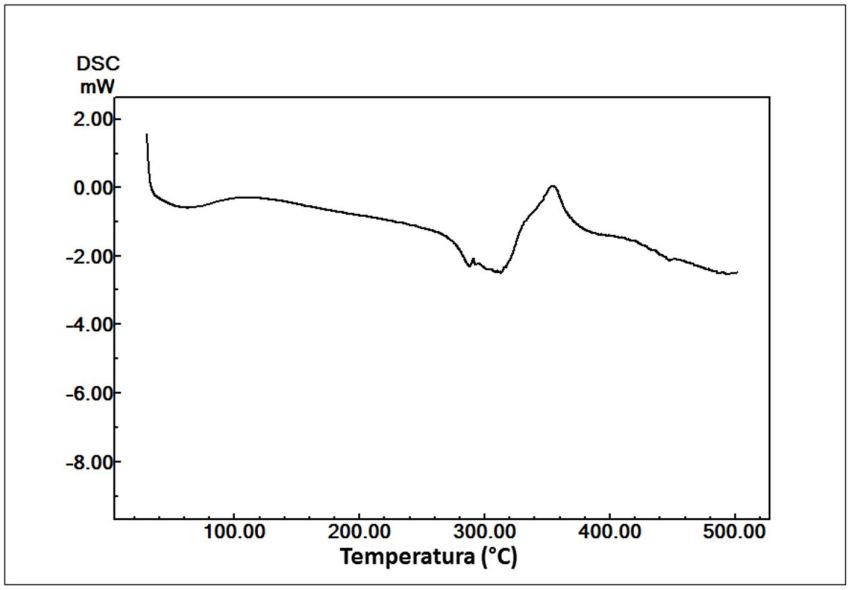


Figura A37. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da mistura física da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina na proporção de 1:1

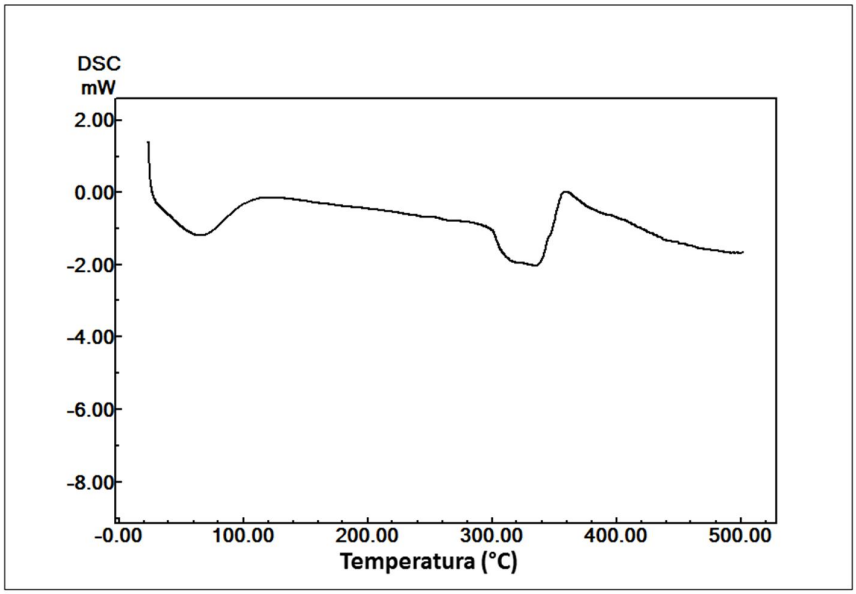


Figura A38. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de liofilização

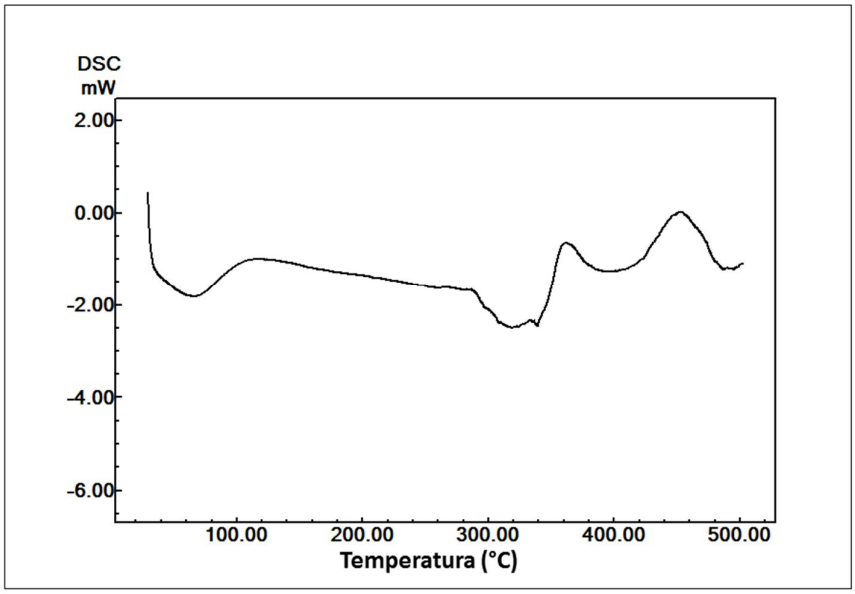


Figura A39. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de *spray drying*

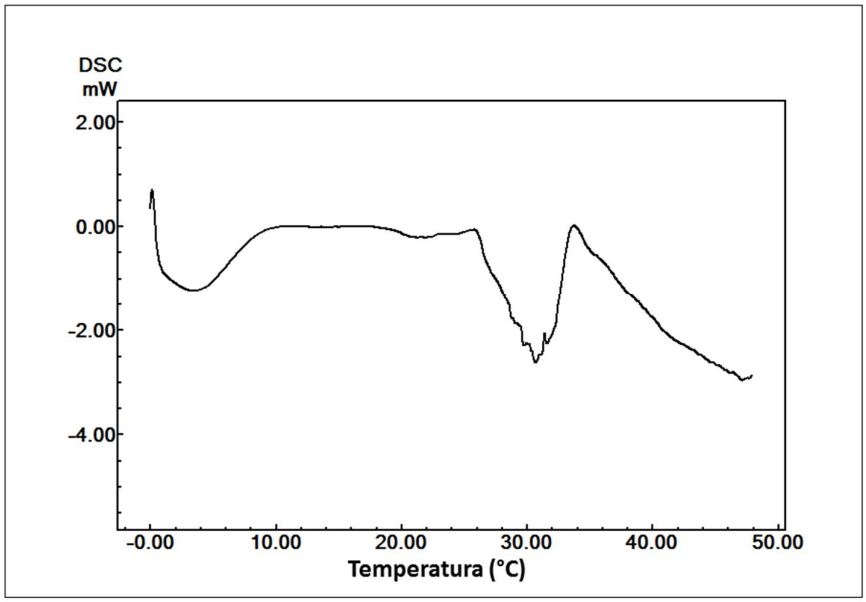


Figura A40. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de co-evaporação

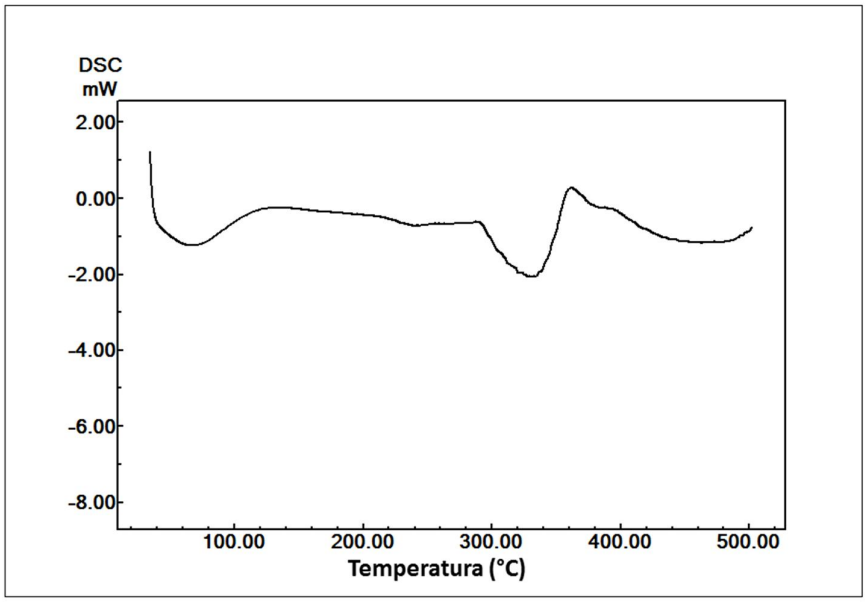


Figura A41. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de micro-ondas

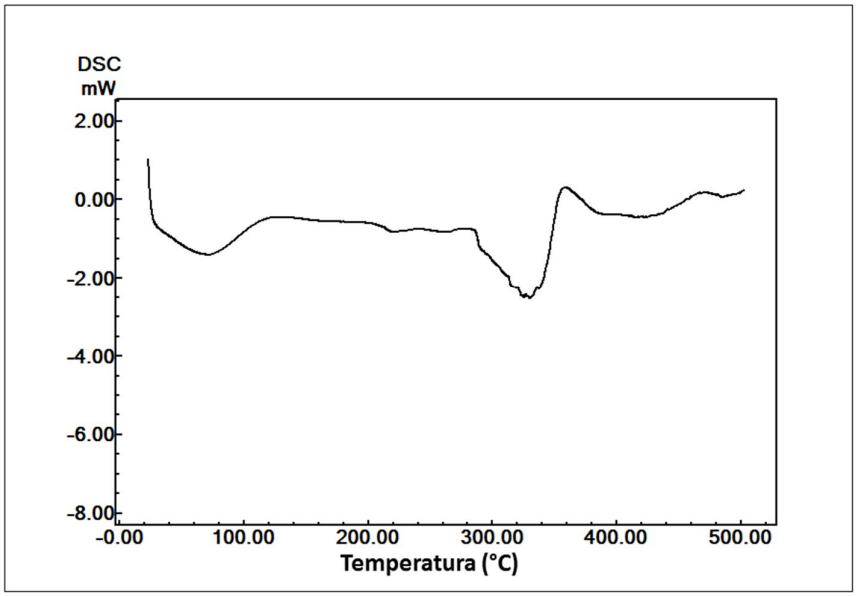


Figura A42. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da fração rica em isoflavonas agliconas com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) obtido pelo método de pasta/micro-ondas