

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

**Estudo de pré-formulação do kaempferol e seus complexos com ciclodextrina
com vistas ao desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais**

GABRIELA DE LIMA MELCHIADES

PORTO ALEGRE, 2019

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

**Estudo de pré-formulação do kaempferol e seus complexos com ciclodextrina
com vistas ao desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais**

Dissertação a ser apresentada por
Gabriela de Lima Melchiades para
obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Leticia Scherer Koester

PORTO ALEGRE, 2019

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

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Froehlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Thiago Caon
Universidade Federal de Santa Catarina

CIP - Catalogação na Publicação

Melchiades, Gabriela de Lima
Estudo de pré-formulação do kaempferol e seus complexos com ciclodextrina com vistas ao desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais / Gabriela de Lima Melchiades. -- 2019.
130 f.
Orientadora: Letícia Scherer Koester.

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

1. Kaempferol. 2. Compatibilidade. 3. Ciclodextrinas. 4. Análise multivariada. 5. Supersaturação. I. Scherer Koester, Letícia, orient. II. Título.

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

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG), empregando também equipamentos da Central Analítica e do Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF) pertencentes à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES pelo período de um ano.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Letícia Scherer Koester pela oportunidade, incentivo, confiança, sabedoria e dedicação com que orientou esse trabalho.

Aos professores e funcionários desta universidade que contribuíram para minha formação e, conseqüentemente, para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do LGD, pelo auxílio, amizade e, dentre eles, aos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A Mariana Colombo, que se tornou uma grande amiga, pelo apoio e incentivo nas situações boas e ruins, além dos momentos de descontrações, emoções, risadas e grandes alegrias.

A Luana Michels, que em pouco tempo se tornou uma grande amiga, pelo seu apoio e carinho sempre com muita leveza, descontração e boas risadas.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram nas minhas decisões e sempre acreditaram em mim, com demonstrações de incentivo e reconhecimento.

Aos meus sogros, Eduardo e Maristela, pela força e incentivo.

Ao meu esposo, Eduardo, por todo apoio, dedicação, paciência e companheirismo sempre.

Ao meu irmão, Luis Henrique, pelo apoio nas minhas decisões e pelos os maravilhosos momentos de descontração e alegria.

Aos meus pais Sérgio e Ana, pelo apoio incondicional sempre, ensinando-me, principalmente, o valor de uma grande conquista através do próprio esforço.

RESUMO

Introdução: O Kaempferol (KPF) é um flavonoide com uma ampla gama de propriedades farmacológicas que se mostra um candidato a fármaco promissor com vistas à administração oral, a despeito de suas reduzidas solubilidade aquosa e biodisponibilidade. Para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais é recomendável realizar um estudo de pré-formulação para a obtenção de um produto final adequado. Neste sentido, o estudo de compatibilidade entre fármaco e excipientes é de grande relevância, assim como o uso de estratégias farmacêuticas a fim de incrementar a hidrossolubilidade do KPF, como a complexação com ciclodextrinas. **Objetivo:** Avaliar, pela primeira vez, a compatibilidade do KPF com alguns dos excipientes mais utilizados em formas farmacêuticas sólidas e avaliar o aumento da dissolução do KPF através de sua complexação com ciclodextrina. **Materiais e Métodos:** Para o estudo de compatibilidade foram utilizadas as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA), espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR) com suporte de duas técnicas multivariadas: análise hierárquica de agrupamento (HCA) e análise de componentes principais (PCA), bem como ensaios quantitativos por HPLC após testes de estresse isotérmico (IST). Os estudos foram desenvolvidos com misturas binárias de KPF:excipientes na proporção 1:1 (p/p). Diagramas de solubilidade foram preparados a fim de avaliar a solubilidade aquosa do KPF com β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) em diferentes tempos de análise e, posteriormente, complexos com KPF/ β CD e KPF/HP β CD foram preparados pela técnica de liofilização e caracterizados por métodos espectroscópicos, calorimétrico e microscópico. **Resultados e Discussão:** a partir dos resultados calorimétricos, verificou-se interações do KPF com todos os excipientes, com exceção da celulose microcristalina. Por outro lado, nenhuma incompatibilidade foi observada quando FTIR combinado com análise multivariada foi empregada. Da mesma forma, nenhuma incompatibilidade foi confirmada após análise por IST. A análise dos diagramas de solubilidade do KPF com as ciclodextrinas revelou um aumento da concentração de KPF solubilizada em meio aquoso, assim como a geração de soluções supersaturadas e o efeito *parachute*. Entretanto, os teores de KPF no complexo sólidos foram reduzidos e a forma de complexação não pôde ser completamente elucidada. **Conclusões:** Embora os resultados da análise térmica sugerissem interação física do KPF e dos excipientes analisados, exceto pela celulose microcristalina, isso não significa necessariamente uma incompatibilidade. Com base nos resultados do FTIR e nos dados obtidos das análises de PCA, HCA e IST, foi excluída a possibilidade de incompatibilidade KPF – excipientes, demonstrando a importância do uso combinado de técnicas neste tipo de investigação. As soluções supersaturadas geradas com as ciclodextrinas disponibilizaram altas concentrações de KPF solubilizadas em meio aquoso em pouco tempo de experimento, sugerindo a necessidade de uma maior investigação com vistas a elucidar o mecanismo de complexação o potencial das ciclodextrinas em aumentar a dissolução e biodisponibilidade do KPF.

Palavras chaves: Kaempferol, compatibilidade, excipientes, análise multivariada, ciclodextrina, solubilidade, supersaturação

ABSTRACT

Introduction: Kaempferol (KPF) is a flavonoid with a wide range of pharmacological properties that is increasingly attractive as a drug candidate for oral administration despite its reduced aqueous solubility and oral bioavailability. For the development of solid oral pharmaceutical dosage forms it is necessary to carry out a preformulation study to obtain a suitable final product. In this sense, the compatibility study between drug and excipients is of great relevance, as well as the use of pharmaceutical strategies in order to increase KPF aqueous solubilization, such as complexation with cyclodextrins. **Objective:** To evaluate, for the first time, the compatibility of KPF with some of the most used excipients in solid dosage forms and to evaluate the increase of the aqueous solubility of KPF through the complexes with cyclodextrin. **Materials and Methods:** For compatibility studies the following techniques were employed: differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TGA), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) supported by two multivariate techniques: hierarchical grouping analysis (HCA) and principal component analysis (PCA), as well as quantitative HPLC assays after isothermal stress tests (IST). The studies were developed with binary KPF:excipients blends in the 1:1 (w/w) ratio. Solubility diagrams were prepared in order to evaluate the solubility of KPF with β -cyclodextrin (β CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) at different times, and later on complexes with KPF/ β CD and KPF/HP β CD were prepared by lyophilization technique and characterized by spectroscopic, calorimetric and microscopic methods. **Results and Discussion:** according to the calorimetric results, interactions of the KPF with all the excipients were verified, except with microcrystalline cellulose. On the other hand, no incompatibility was observed when FTIR combined with multivariate analysis was employed. Similarly, no incompatibility was confirmed after IST analysis. The solubility diagrams of KPF with the cyclodextrins demonstrated an increase in the concentration of KPF solubilized in aqueous medium, as well as the generation of supersaturated solutions and a parachute effect. However, KPF content in the freeze-dried powders were low and the real mechanism by KPF complexation with CD was not clarified. **Conclusions:** Although the results of the thermal analysis suggested physical interaction of KPF and the excipients analyzed, except for microcrystalline cellulose, this does not necessarily mean an incompatibility. Based on the results of the FTIR and the data obtained from the analysis of PCA, HCA and IST, the possibility of KPF-excipients incompatibility was excluded, demonstrating the importance of using multiple techniques in this approach. The supersaturated solutions generated with the cyclodextrins provided high concentrations of KPF solubilized in aqueous medium in short time of experiment, suggesting that further studies are necessary to clarify both the mechanism of KPF complexation and the potential of cyclodextrins to increase KPF dissolution and bioavailability.

Keywords: Kaempferol, compatibility, excipients, multivariate analysis, cyclodextrin, solubility, supersaturation

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura Química do Kaempferol.....	32
Figura 2. Rota de síntese do Kaempferol.	35
Figura 3. Fatores que afetam a compatibilidade fármaco-excipiente.....	44
Figura 4. Estrutura das ciclodextrinas naturais.....	47
Figura 5. Representação esquemática da disposição das hidroxilas na estrutura da CD.....	48

CAPÍTULO II

Figura 1. Chemical structure of Kaempferol.....	66
Figura 2. Representative thermograms of DCS analysis.....	71
Figura 3. Representative thermograms of TGA analysis.....	72
Figura 4. FTIR spectrum of pure KPF.....	74
Figura 5. Chromatograms FTIR spectra of KPF, excipients and binary mixtures.....	75
Figura 6. Graphic representation of Principal Component Analysis.....	78
Figura 7. Graphic representation of Hierarchical Components Analysis.....	79
Figura 8. Results of qualitatively analysis of KPF and KPF-excipient mixtures before and after of storage.....	80
Figura 9. Results of the retention times and peak shapes observed by HPLC analysis.....	81

Figura 10. Results of HPLC analysis of the content KPF and KPF-exciptient mixtures after of storage.....	81
---	----

CAPÍTULO III

Figura 1. Chemical structure of Kaempferol, β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin.....	94
Figura 2. Phase solubility diagrams.....	99
Figura 3. Graphic representation of the spring and parachute effect of KPF and KPF/HP β CD complex	102
Figura 4. Representative thermograms of DCS analysis.....	105
Figura 5. Representative thermograms of TGA analysis.....	106
Figura 6. Chromatograms FTIR spectra of KPF, HP β CD and KPF/HP β CD complexes.....	107
Figura 7. Representative NMR spectra of KPF, HP β CD and KPF/HP β CD complexes.....	108
Figura 8. MEV - Photomicrographs obtained by scanning electron microscopy (A) KPF, (B) HP β CD, (C) KPF:HP β CD complex 2h, (D) KPF:HP β CD complex 24h.....	109

DISCUSSÃO GERAL

Figura 1. Representação esquemática teórica das curvas geradas em sistemas supersaturados.....	119
---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Diferentes classes de derivados de flavonoides, assim como sua classificação estrutural e possíveis substituições.....32
- Tabela 2.** Lista com algumas espécies de plantas que contém kaempferol e/ou kaempferol na sua forma glicosídica.....37
- Tabela 3.** Técnicas de triagem de compatibilidade de excipientes, vantagens e desvantagens.....46
- Tabela 4.** Propriedades físico-químicas de algumas ciclodextrinas.....49

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** General characterization of kaempferol and the excipients used.....70
- Tabela 2.** Results of DSC and TGA of KPF and their binary mixtures.....73
- Tabela 3.** Results of FTIR of KPF and the mixtures.....76
- Tabela 4.** Results of principal components and eigen value for the physical mixtures of kaempferol and excipients.....77
- Tabela 5.** Comparative analysis of the results of all the analyzed techniques.....82

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Values of constant of apparent stability and complexing efficiency corresponding to the phase solubility studies.....100
- Tabela 2.** Resultados das análises de teor pelo HPLC.....104

SUMÁRIO

Introdução	21
Objetivos	27
Capítulo I – Revisão da Literatura	29
Flavonoides.....	31
Kaempferol.....	33
Compatibilidade fármaco – excipientes.....	42
Complexos com ciclodextrina.....	47
Referências.....	50
Capítulo II – Investigação da compatibilidade entre o Kaempferol e excipientes pelos métodos térmicos, espectroscópicos e quimiométricos	61
Publicação 1: Investigation of the compatibility between kaempferol and excipients by thermal, spectroscopic and chemometric methods.....	65
Capítulo III – Complexação do Kaempferol com ciclodextrinas e o efeito <i>spring-parachute</i>	89
Publicação 2: Supersaturable complex of kaempferol with cyclodextrin: the spring and parachute effect.....	93
Discussão geral	115
Conclusões gerais	123
Perspectivas	125
Referências	127

INTRODUÇÃO

Flavonoides são um grupo de compostos polifenólicos, metabólitos secundários de plantas, que se distribuem amplamente no reino vegetal e são regularmente consumidos pelos seres humanos, pois são constituintes comuns de frutas, legumes e chás (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2011) (RAJENDRAN et al., 2014)(ZHANG et al., 2015).

O Kaempferol (KPF, 3,5,7-tri-hidroxi-2-(4hydroxyphenyl)-4H-1-benzopiran-4-ona) é um composto flavonoide, de cor amarela, e que apresenta variadas propriedades farmacológicas, entre elas, atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiapoptótica e neuroprotetora (ILK; SAGLAM; ÖZGEN, 2016; KIM; CHOI, 2013; ZHANG et al., 2015). Devido a essa gama de atividades farmacológicas, esse composto vem se destacando, tornando seu uso cada vez mais atrativo e procurado, o que permite então classificá-lo como uma molécula de interesse farmacêutico.

No entanto, o KPF apresenta uma biodisponibilidade oral relativamente baixa devido à sua baixa solubilidade aquosa, o que limita sua aplicação na clínica (CHEN et al., 2010; GUPTA et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Com isso, verifica-se que para o desenvolvimento de uma formulação sólida contendo KPF deve-se aliar o uso de adjuvantes ou estratégias farmacotécnicas que promovam o aumento da solubilidade e de sua absorção oral.

A via oral, dentre as vias usadas para a administração de fármacos, destaca-se pelas suas vantagens como maior aceitação pelo paciente, segurança, possibilidade de apresentar efeito sistêmico e baixo custo (AULTON, M. E., 2016). Contudo, o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais exige cuidado e envolve muitas etapas, dentre elas um estudo de pré-formulação. Este por sua vez abrange um estudo de compatibilidade fármaco-excipiente para obtenção de um produto final adequado, já que a incompatibilidade entre fármaco e excipientes pode alterar a estabilidade e biodisponibilidade de fármacos, e assim, afetar a sua segurança e eficácia (WANG; JING, 2013). No entanto, algumas interações são planejadas com o objetivo de aumentar a solubilidade e/ou a biodisponibilidade do ativo, como por exemplo, a complexação fármaco-ciclodextrina ou a formulação de dispersões sólidas (MONAJJEMZADEH et al., 2009).

A utilização de ciclodextrinas (CD), que são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir da transglicosilação intramolecular do amido, apresenta-se como uma alternativa para melhorar a solubilidade de moléculas como o Kaempferol. Isso porque sua estrutura espacial cônica com a orientação de grupos hidroxílicos para o exterior conferem propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas (PINHO; GROOTVELD; HENRIQUES, 2014; CRINI, 2014; SZEJTLI, 1998; DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

O uso de ciclodextrina como estratégia para aumentar a solubilidade do kaempferol já foi descrito na literatura, e diferentes métodos foram utilizados para preparar e caracterizar seus complexos (BERGONZI et al., 2007; FORTEA; GABALDÓN, 2010; PÉREZ-ABRIL et al., 2017; YOU et al., 2018). Os autores JULLIAN e colaboradores (2011) e MERCADER-ROS e colaboradores (2010) são os únicos, até o presente momento, que relataram a investigação da complexação de KPF isolado com CD. O primeiro avaliou a melhora da atividade antioxidante do KPF após inclusão em complexos com as ciclodextrinas 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e 2,6-dimetil- β -ciclodextrina (DM β CD) e caracterizou os complexos apenas pela técnica de RMN. Já o segundo, utilizou as β -, G2- β -, and HP- β -ciclodextrinas, e comparou os valores das constantes de complexação pelos métodos enzimático, de solubilidade e fluorimétrico em pH 9,0. Entretanto, é importante ressaltar que, até o presente momento, ainda não foram publicados trabalhos que aprofundassem a caracterização de complexos KPF:CD fazendo uso de técnicas calorimétricas, espectroscópicas e microscópicas. Também não foram realizados estudos visando o desenvolvimento de uma forma sólida oral com esses complexos.

Tendo em vista o disposto acima, este trabalho teve como objetivos avaliar de forma inédita a compatibilidade do KPF com excipientes e investigar o efeito de sua complexação com as ciclodextrinas β CD e HP β CD com vistas à produção de uma forma farmacêutica sólida oral.

Esta dissertação está estruturada em três capítulos como segue:

- O capítulo I trata da revisão da literatura acerca do tema da dissertação, resumindo os principais aspectos tratados ao longo do trabalho, flavonoides, kaempferol, ciclodextrinas, interação entre fármaco e excipientes;
- O capítulo II apresenta um estudo de pré-formulação que avalia a compatibilidade do kaempferol com alguns dos excipientes mais utilizados no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas;
- O capítulo III apresenta os resultados experimentais relativos à formação de complexos kaempferol-ciclodextrinas, sua caracterização, assim como a avaliação da melhora da sua solubilidade aquosa após a complexação;

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a compatibilidade entre kaempferol e excipientes e desenvolver complexos entre o kaempferol e ciclodextrinas tendo como perspectiva o delineamento de formas farmacêuticas sólidas orais com melhor perfil de absorção.

Objetivos específicos

- Avaliar a compatibilidade entre kaempferol e excipientes selecionados, por diferentes técnicas (calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier associada a análises estatísticas multivariadas e teste de estresse isotérmico);
- Avaliar o efeito da complexação do kaempferol com hidroxipropil- β -ciclodextrina e β -ciclodextrina sobre sua solubilidade aquosa;
- Caracterizar os complexos obtidos em estado sólido quanto a suas propriedades físicas, químicas e físico-químicas de forma a elucidar a forma de interação entre o kaempferol e as ciclodextrinas e as perspectivas de incorporação em uma forma sólida oral.

Capítulo I
Revisão bibliográfica

FLAVONOIDES

Compostos naturais e seus derivados químicos têm representado fontes inestimáveis de agentes terapêuticos consagrados assim como de novos agentes terapêuticos. Um recente relatório da OMS (Organização Mundial da Saúde) mostrou que mais de 80 % da população mundial faz uso de extratos vegetais totais ou fitocompostos isolados para suas necessidades básicas de saúde (CORINA et al., 2017) e estes são representados, na sua grande maioria, pela classe dos flavonoides.

Os flavonoides constituem um grupo de compostos polifenólicos produzidos por diferentes espécies de plantas como metabólitos secundários. Estes possuem baixo peso molecular, as cores podem variar do branco ao amarelo e estão presentes em uma grande variedade de frutas, vegetais, chás, cereais, vinhos, sucos e grãos (PARK, 2016; SANTOS et al., 2015).

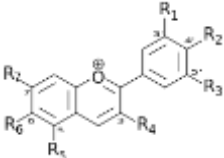
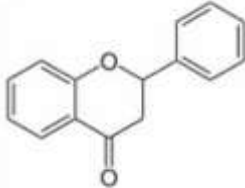
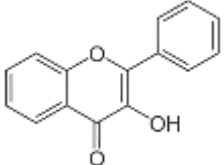
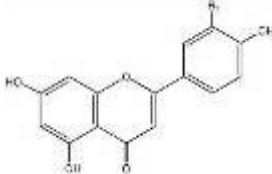
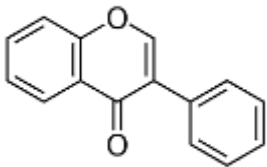
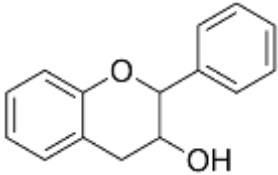
Sua estrutura molecular é caracterizada por um anel heterocíclico com um substituinte fenil em C-2, que é denominado fenilbenzopirona ou difenilpropano, com fórmula molecular (C₆-C₃-C₆) (FANG et al., 2017; PARK, 2016). Os flavonoides normalmente são divididos em várias subclasses, de acordo com os substituintes no anel fenólico (anel C) e a presença ou não de uma dupla ligação entre C2 e C3, e são categorizados como antocianinas, flavononas, flavonois, flavonas, isoflavonas e flavanois (flavan-3-ols) (FANG et al., 2017; PARK, 2016; VIDAK; ROZMAN; KOMEL, 2015). A Tabela 1 apresenta as classificações estruturais e as possíveis substituições para cada tipo de subclasse.

As atividades biofarmacêuticas dos flavonoides dependem principalmente da sua classe estrutural, grau de hidroxilação, além de outras substituições e conjugações (IMRAN et al., 2018). Eles apresentam benefícios à saúde devido a sua variada gama de atividades biológicas, tais como ações anti-inflamatórias, antioxidantes, antivirais e antitumorais (CHEN; CHEN, 2013; FANG et al., 2017; SANTOS et al., 2015). IMRAN e colaboradores (2018) relata que os flavonoides exibem atividade antioxidante e neutralizam os efeitos dos radicais livres devido à presença de grupos hidroxila. É descrito por PARK (2016) que os flavonoides também contribuem para a proteção contra raios UV.

Recentemente foram descritas descobertas epidemiológicas sugerindo que a elevada ingestão dietética de flavonoides pode estar inversamente associada ao risco de mortalidade (GODOS et al., 2018; IMRAN et al., 2018), assim como de diabetes

(LIU et al., 2014), doenças cardiovasculares (HOOPER et al., 2008), certos tipos de câncer (GROSSO et al., 2017) e transtornos de humor depressivos (CHANG et al., 2016; GODOS et al., 2018).

Tabela 1. Classificação estrutural e possíveis substituições nas diferentes classes de exemplos de derivados de flavonoides.

Classe	Estrutura geral	Flavonoide	Possível substituição
Antocianinas		Apigenina Cianidina	5,7,4' – OH 3,5,7,4' – OH, 3,5-OMe
Flavononas		Naringenina Taxifolina Hesperidina	5,7,4' – OH 3,5,7,3',4' – OH 5,7,3' – OH, 4' – OMe, 7 rutinoside
Flavonois		Kaempferol Quercetina Miricetina	3,5,7,4' – OH 3,5,7,3',4' – OH 3,5,7,3',4',5' - OH
Flavona		Crisina Rutina Luteolina	5,7 – OH 5,7,3',4' – OH, 3 rutinoside 5,7,3',4' - OH
Isoflavonas		Genistina Genisteína Daidzeína	5,4' – OH, 7-glicose 5,7,4' – OH 7,4' - OH
Flavanois (flavan-3-ols)		(+)Catequina (-)Epicatequina	3,5,7,3',4' – OH 3,5,7,3',4' - OH

Adaptado de PINHO; GROOTVELD; HENRIQUES, 2014.

Os flavonoides apresentam diversos usos potenciais como medicamentos e nutracêuticos (FANG et al., 2017; PARK, 2016; RAJENDRAN et al., 2014; TRIVEDI et

al., 2008). No entanto, sua baixa biodisponibilidade oral (~2 %) é um fator limitante para sua aplicação na clínica. Esta biodisponibilidade oral insatisfatória dos flavonoides é devido à sua baixa solubilidade aquosa, que tem sido associada a interações dos flavonoides em diversos estágios do processo de digestão, absorção e distribuição, sendo fortemente afetados por suas estruturas moleculares (FANG et al., 2017).

A literatura traz relatos de que as estruturas moleculares desempenham importante papel na absorção dos flavonoides, incluindo a posição de substituição do grupo hidroxila e alquila (TAMMELA et al., 2004), grupo fenil (MUKAI et al., 2013), grupo metoxila (WALLE et al., 2007) e grupo glicosídico (HOLLMAN et al., 1999).

KAEMPFEROL

O flavonoide kaempferol (KPF, 3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopirano-4-ona, Fig.1), de cor amarela, possui baixo peso molecular (286,24 g/mol) e é amplamente distribuído no reino vegetal. Este composto é encontrado na dieta humana principalmente em cebola, chá, cenoura, brócolis, feijão, tomate, morangos, uvas entre outros (CALDERON-MONTANO et al., 2011; IMRAN et al., 2018).

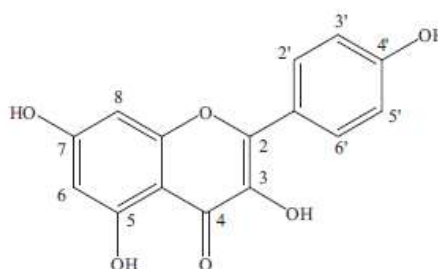


Figura 1. Estrutura Química do Kaempferol

A molécula do kaempferol é composta por uma estrutura de difenilpropano (C6-C3-C6), assim como os demais flavonoides. A sua síntese ocorre pela condensação de três moléculas de malonil-CoA (C6) com uma molécula de 4-cumaril-CoA (C3-C6). Esta reação é catalisada pela enzima chalcona sintase, que resulta na formação do flavonoide naringenina chalcona (C6-C3-C6), sendo este transformado na flavonona naringenina, que catalisa o fechamento do anel C3 pela enzima chalcona isomerase.

O grupo hidroxila em C3 na naringenina é introduzido pela enzima flavonona 3-dioxigenase para formar o dihidrokaempferol. Por fim, a ligação dupla em C2-C3 no dihidrokaempferol é introduzida pela enzima flavonol sintase produzindo, então, o kaempferol (Figura 2)(CALDERON-MONTANO et al., 2011; WINKEL-SHIRLEY, 2001, 2002). Uma das explicações para este flavonoide ser abundantemente distribuído no reino vegetal está na grande frequência com que são encontradas as enzimas envolvidas na sua biossíntese no vegetal.

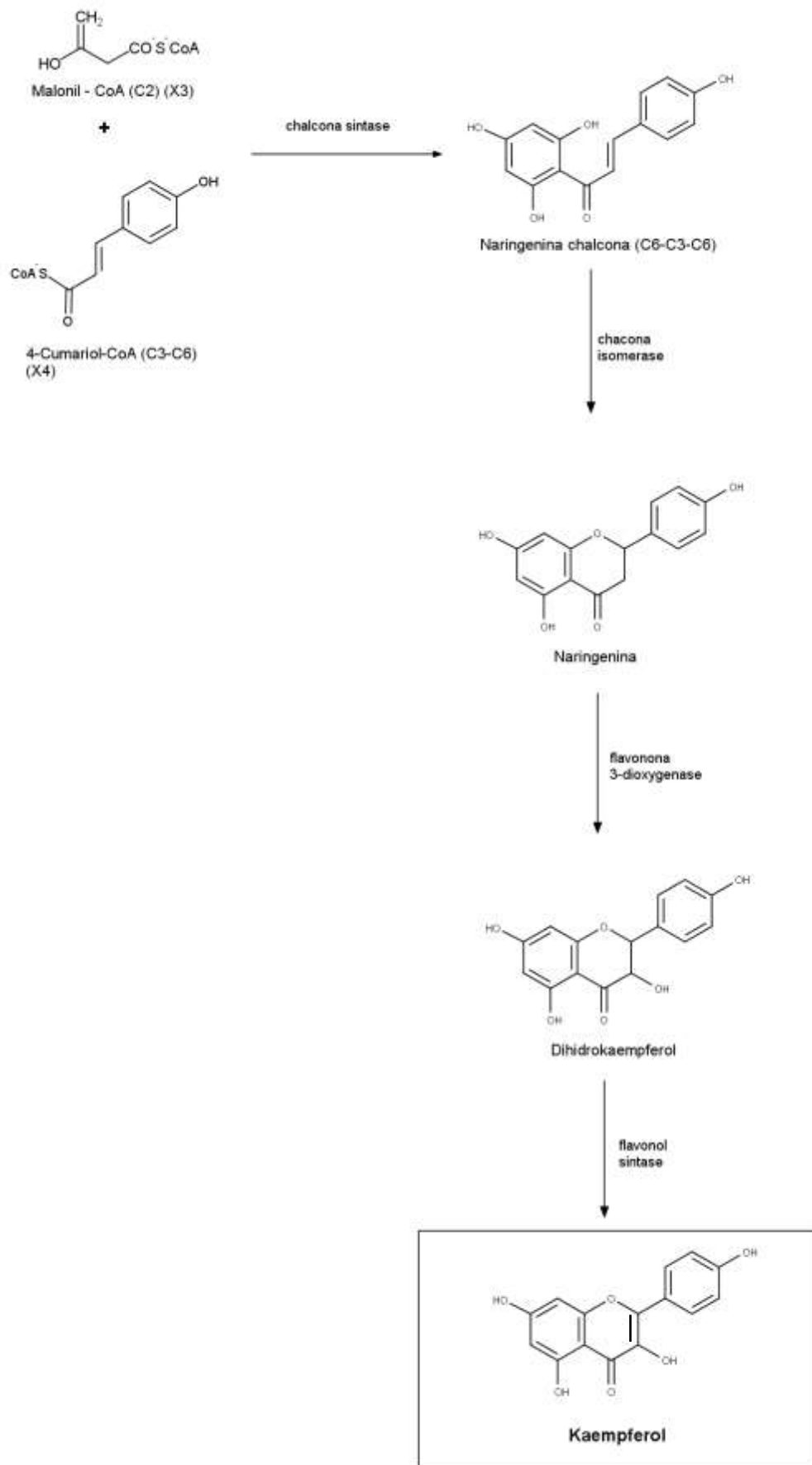


Figura 2. Rota biosintética do Kaempferol. (Figura elaborada no Software MarvinSketch®)

O Kaempferol também pode se apresentar na forma glicosídica, e entre os açúcares normalmente utilizados para esta ligação podemos destacar a glicose, ramnose, galactose e rutinose. Na natureza, são comumente encontrados glicosídeos do KPF como o kaempferol-3-O-glucoside, também chamado de astragalina, pois para que ocorra sua biossíntese apenas mais uma enzima, que é bem difundida na natureza, se faz necessária, o flavonol-3-O-glicosiltransferase. Uma enorme variedade de espécies de plantas já foi identificada com a presença do KPF ou KPF-glicosídico (Calderon-Montano et al., 2011).

Na Tabela 2, estão compiladas algumas espécies de plantas que contém o KPF, assim como a família botânica, o tipo de glicosídeo, atividades farmacológicas descritas na literatura e a forma com que é encontrada na natureza.

Tabela 2. Espécies de plantas que contém kaempferol e/ou kaempferol na sua forma glicosídica.

Família	Espécie	Encontrado na natureza/nome popular	Compostos	Atividades farmacológicas	Referência
Leguminosae	<i>Acacia nilotica</i>	Acácia egípcia “Jurema do Egito”	Kaempferol	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Antidiabéticos ♣ Hipolipidêmico ♣ Antileishmaniais 	(RATHER; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, 2015)
Alliaceae	<i>Allium cepa</i>	Cebolas	Kaempferol	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Antioxidante 	(RODRÍGUEZ GALDÓN; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ; DÍAZ ROMERO, 2008)
Asphodelaceae	<i>Aloe vera</i>	Aloe vera (suculenta)	Kaempferol	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Antioxidante 	(KEYHANIAN; STAHL-BISKUP, 2007)
Amaranthaceae	<i>Alternanthera tenella</i>	“Perpétua do campo”	Kaempferol	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Ingredientes funcionais para alimentos ♣ Antidiabéticos ♣ Antioxidante ♣ Anti-inflamatórias ♣ Cardioprotetoras ♣ Quimiopreventivas ♣ Neuroprotetoras 	(DELADINO et al., 2017)
Amaranthaceae	<i>Amaranthus spinosus</i>	“Bredo-branco” “Bredo-de-espinho” “Caruru-de-espinho”	Kaempferol glicosídeo	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Analgésicas ♣ Anti-inflamatórias ♣ Antimaláricas ♣ Antidepressivas ♣ Antidiabéticas ♣ Antioxidantes 	(RJEIBI; BEN SAAD; HFAIEDH, 2016)
Brassicaceae	<i>Bunias orientalis</i>	Nabo	Kaempferol Kaempferol glicosídeo	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Antioxidantes ♣ Cardioprotetoras ♣ Quimiopreventivas ♣ Imunoprotetoras 	(BENNETT et al., 2006)

Tabela 2. Cont.

<p>Apiaceae</p>	<p><i>Centella asiatica</i></p>	<p>“centella” “centella asiática” “gotu – kola”</p>	<p>Kaempferol Kaempferol 3-O- β-D-glicosídeo</p>	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Neuroprotetor ♣ Imunomodulador ♣ Antidepressivo ♣ Gastroprotetor ♣ Cardioprotetor ♣ Quimiopreventivas ♣ Antimicrobiano ♣ Anticicatrizante ♣ Anti-inflamatório ♣ Antidiabético ♣ Antioxidante 	<p>(SABARAGAMUWA; PERERA; FEDRIZZI, 2018)</p>
<p>Ebenaceae</p>	<p><i>Diospyros lotus</i></p>	<p>“data-ameixa” persimomo caqui caqui lilás”</p>	<p>Kaempferol</p>	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Antioxidante ♣ Anti-inflamatório ♣ Analgésico e antipirético ♣ Anti-hipertensivo ♣ Cardioprotetor ♣ Antidiabético ♣ Neuroprotetor ♣ Citotoxicidade ♣ Antimicrobiano ♣ Antiprotozoário ♣ Inseticida ♣ Sedativo hipnótico 	<p>(RAUF et al., 2017)</p>
<p>Myrtaceae</p>	<p><i>Eucalyptus spp</i></p>	<p>Eucalipto</p>	<p>Kaempferol</p>	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Antibacteriano ♣ Antifúngico ♣ Analgésico ♣ Anti-inflamatório ♣ Antioxidante 	<p>(MAALOUL et al., 2019)</p>

Tabela 2. Cont.

Clusiaceae	<i>Hypericum perforatum</i>	“Erva de São João” “Hipérico verdadeiro”	Kaempferol	♣ Antidepressivo ♣ Cardioprotetor	(MA et al., 2019)
Oleaceae	<i>Olea europaea</i>	Azeitona Oliva Oliveira	Kaempferol	♣ Antioxidante	(ROSSI et al., 2016)
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	Uva	Kaempferol Kaempferol 3- glucoside Kaempferol 3 galactosídeo Kaempferol 3- glucuronídeo	♣ Antidiabético ♣ Osteoprotetor ♣ Quimiopreventivas	(ABDELSALAM; SAMAK; ALSEMEH, 2019)

Assim, como pode ser observado na Tabela 2, o KPF é amplamente distribuído no reino vegetal e apresenta uma diversificada gama de atividades farmacológicas já estudadas. Entre estas pode-se destacar as propriedades como antioxidante, anti-inflamatória, quimiopreventiva e neuroprotetora, cardiovascular, antidiabético e antimicrobiana.

Relatos na literatura descrevem que a presença da ligação dupla em C2-C3 em conjugação com o grupamento cetona em C4, juntamente com a presença de grupos hidroxilas em C3, C5 e C4' são características estruturais importantes implicando na atividade antioxidante do KPF (ANG et al., 2006; RICE-EVANS; RICE-EVANS, 2001).

ANG et al., 2006 avaliaram a atividade de diversos flavonoides e descobriram que o KPF foi um dos que apresentou maior capacidade de eliminar radicais hidroxila produzidos pela reação de Fenton, com um IC₅₀ de 0,5 µM. (ROSSI et al., 2016). ÖZYÜREK; BEKTAS; GÜC. (2009) ainda relatam a capacidade do KPF, também, de inibir a atividades de enzimas que gerem espécies reativas de oxigênio, como a enzima xantina oxidase.

Alguns trabalhos também descrevem sobre a potencial atividade anti-inflamatória do KPF. Esta atividade pode ser mediada por diversos mecanismos de ação. O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e enzimas, como por exemplo, TNF-α, COX-2, iNOS, IL-1, IL-6 e IL-8 é devido a ativação do fator nuclear kappa B (NF – KB) e diversos trabalhos mostraram que o KPF inibe a atividade do NF – KB (IMRAN et al., 2011; KIM; LEE; KIM, 2010; LIN et al., 2010; PARK et al., 2009). Outros autores também relatam que o KPF pode inibir a expressão de IL-1 e IL-8 (LEE et al., 2009) e a atividade do TNF-α (RAO; FANG; TZENG, 2008).

Em relação à capacidade antineoplásica é demonstrado na literatura o efeito anticancerígeno do KPF isolado contra vários tipos diferentes de neoplasias malignas (IMRAN et al., 2011). NIESTROY e colaboradores (2011) relata que o KPF inibe o crescimento *in vitro* de células cancerígenas de camundongos com câncer de colo de útero. A capacidade antioxidante do KPF tem sido implicada na prevenção da carcinogênese, principalmente quando induzida por produtos químicos. Este potencial levou a numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* que forneceram ampla evidência de que o KPF pode prevenir a carcinogênese e inibir

a origem do tumor através de diferentes mecanismos moleculares (CHEN; CHEN, 2013; CORINA et al., 2017; IMRAN et al., 2011; NIESTROY et al., 2011; TRIVEDI et al., 2008).

O efeito citoprotetor do KPF também vem sendo estudado para doenças como diabetes mellitus tipo II (DM2), considerando que é uma das principais causas de aparecimento e progressão do DM2 a perda de massa e função das células β , devido aos elevados níveis de ácidos graxos livres (lipotoxicidade) e glicose (glicotoxicidade) (BUTLER et al., 2003). Recentemente, VARSHNEY; GUPTA; ROY. (2017) relataram a capacidade de proteção contra a morte das células β pancreáticas, induzida pelo ácido palmítico através da modulação da autofagia via sinalização AMPK/mTOR. Esses pesquisadores relatam que o KPF promove um aumento na viabilidade celular e nas atividades de morte celular apoptótica e melhora as expressões da proteína LC3-II, sugerindo que o KPF exerce um papel citoprotetor contra lipotoxicidade pela ativação da autofagia através da via da AMPK / mTOR.

Uma avaliação do impacto benéfico do consumo dietético do KPF foi elucidada por Y.LIU, J. ZHAN. (2014). A partir de uma meta-análise para encontrar a relação entre o início do diabetes e o consumo de flavonoides, os resultados mostraram uma relação inversa, em que quanto maior o consumo de flavonoides, mais tardio era o início do diabetes (IMRAN et al., 2018; Y.LIU, J. ZHAN, 2014).

Estudos referentes às atividades cardioprotetoras e antimicrobianas também são descritas. SUCHAL e colaboradores (2017) indicam a eficácia do KPF contra lesão por isquemia e reperfusão miocárdica em ratos Wistar diabéticos albinos machos. O KPF e seus derivados glicosídicos podem atuar de forma sinérgica com antibióticos (como rifampicina, vancomicina, eritromicina e clindamicina) contra bactérias resistentes (LIM; KIM; SEO, 2007; TSUKA et al., 2008), sugerindo que o KPF possa ser usado em conjunto com esses fármacos em casos de resistência. GARCÍA-ARRESTO; ARRIAGA; RODRÍGUEZ-FERN. (2016) relatam a atividade antimicrobiana do KPF contra cepas de *Helicobacter pylori*.

Tendo em vista esta variada gama de atividades farmacológicas apresentada pelo KPF conforme relatado nos estudos acima, o seu uso tem se tornado cada vez mais interessante, o que nos possibilita tratar o KPF como uma

promissora molécula para o desenvolvimento de fármacos e/ou suplementos alimentares. Inclusive, já é possível encontrar à venda no Brasil um extrato padronizado de KPF com indicação para auxiliar no gerenciamento de peso e diminuição de glicose na circulação sanguínea. O material informativo descreve que o KPF ativa o hormônio da tireoide, aumentando o consumo energético e promovendo um aumento da sensibilidade à insulina, resultando na prevenção ao diabetes e outras desordens metabólicas (FÊNIX, 2017).

Entretanto, o KPF apresenta baixa biodisponibilidade oral devido à baixa lipossolubilidade e baixa solubilidade, limitando sua aplicação na clínica (RJEIBI; BEN SAAD; HFAIEDH, 2016; RODRÍGUEZ GALDÓN; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ; DÍAZ ROMERO, 2008; TSUKA et al., 2008). Como observado por LIM; KIM; SEO. (2007), após a administração de KPF em ratos, observou-se uma absorção de baixa a moderada, com baixa biodisponibilidade relativa (~2 %), e com extenso metabolismo de primeira passagem. O log P do KPF foi calculado em aproximadamente 2,78 (YANG et al., 2014).

Desta forma, verifica-se que para o desenvolvimento de uma formulação contendo KPF, deve-se aliar o uso de adjuvantes ou estratégias farmacotécnicas que promovam o aumento da solubilidade aquosa e de sua absorção oral.

COMPATIBILIDADE FÁRMACO – EXCIPIENTE

Sabe-se que o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas exige muito cuidado e envolve muitas etapas. Dentro do estudo de pré-formulação é necessária a realização de um estudo de compatibilidade fármaco-excipientes para obtenção de um produto final adequado, já que a incompatibilidade entre fármaco e excipientes pode alterar a estabilidade e biodisponibilidade de medicamentos, e assim, afetar a sua segurança e eficácia (CHADHA; BHANDARI, 2014; WANG; JING, 2013).

Interações entre fármaco-excipientes em formas farmacêuticas podem originar alterações na natureza química, física, solubilidade e resposta terapêutica. Assim, é de extrema importância o estudo de interação entre fármaco e excipientes no estado sólido durante a formulação de novos medicamentos, ou

mesmo a reformulação de medicamentos já existentes e seu armazenamento (CHADHA; BHANDARI, 2014; LEDETI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016).

Essas interações do fármaco com excipientes ou outros ativos que conduzem a alterações nas propriedades químicas, físicas e terapêuticas da forma farmacêutica são denominadas incompatibilidades. No entanto, algumas interações são planejadas com o objetivo de aumentar a solubilidade e/ou a biodisponibilidade do ativo, por exemplo, a complexação fármaco-ciclodextrina e a inclusão do fármaco em dispersões sólidas (CHADHA; BHANDARI, 2014; MONAJJEMZADEH et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2016).

Interação/incompatibilidade química envolve uma reação química direta entre o excipiente e a molécula do medicamento. Adicionalmente, vestígios de impurezas presentes nos excipientes podem reagir com o fármaco ou outros excipientes funcionais (CHADHA; BHANDARI, 2014; ILK; SAGLAM; ÖZGEN, 2016). A existência de incompatibilidade química entre substâncias ativas e com excipientes podem se manifestar em efeitos indesejáveis que podem ser tóxicos (formação de produtos de degradação) ou resultar em comprometimento da eficácia clínica (perda de potência) (CHADHA; BHANDARI, 2014; JOSHI; PATIL; POKHARKAR, 2002; MONAJJEMZADEH et al., 2009). A compatibilidade entre os componentes de uma formulação pode ser afetada por diferentes fatores, mostrados na Figura 3.

O rastreamento das compatibilidades envolve a utilização de misturas físicas de fármaco com um ou mais excipientes. A proporção de excipiente nas misturas é usualmente elevada (fármaco: excipiente, 1:1, p/p) para maximizar a proporção de espécies excipiente/reagentes, aumentando assim a probabilidade de incompatibilidade (MONAJJEMZADEH et al., 2009). As misturas físicas podem ser analisadas por várias técnicas termoanalíticas e espectroscópicas antes e depois do equilíbrio (CHADHA; BHANDARI, 2014; MONAJJEMZADEH et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2016; SILVA et al., 2016).

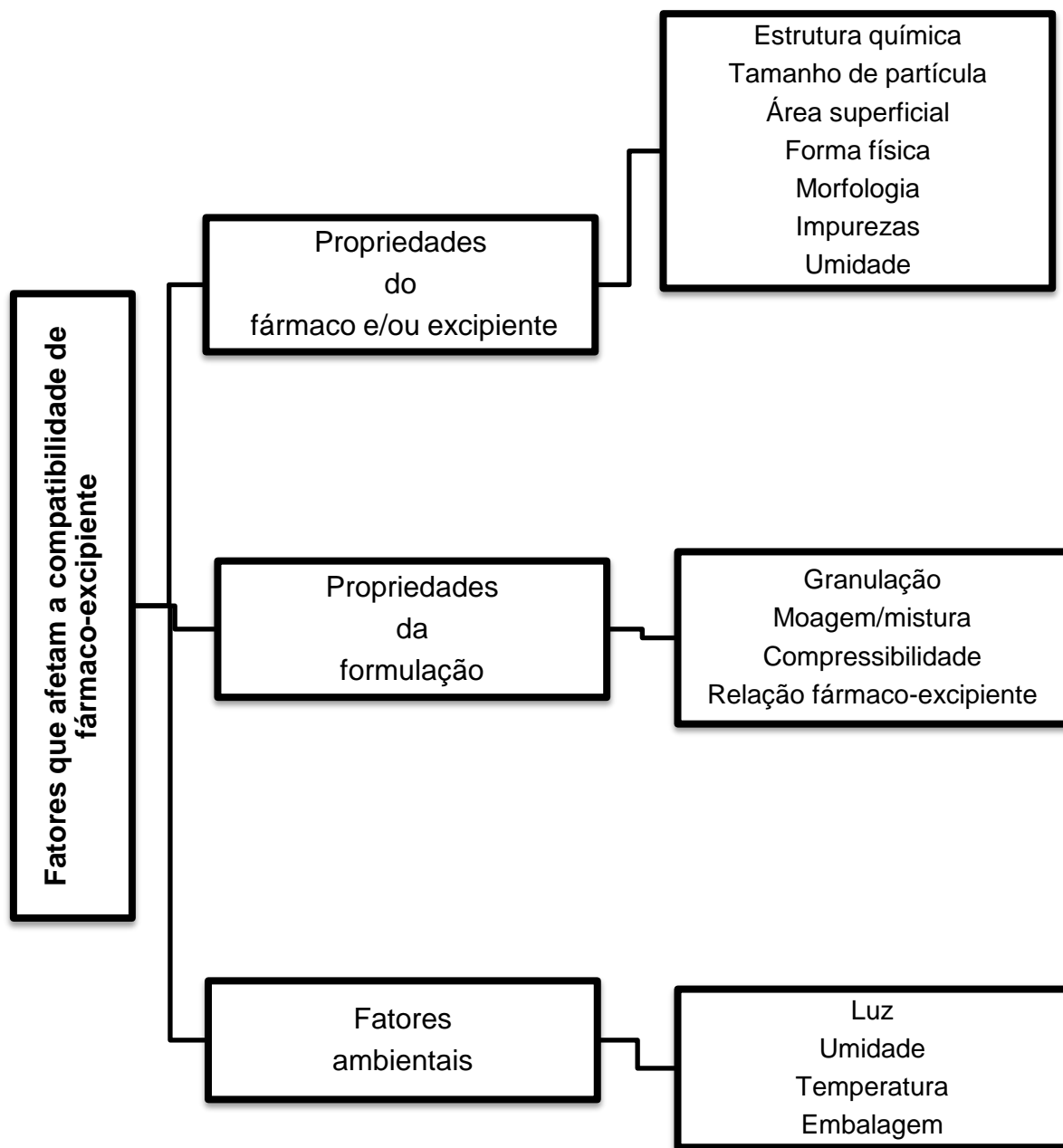


Figura 3. Esquema dos fatores que afetam a compatibilidade fármaco excipiente (adaptado de SCHMITT et al., 2001).

A utilização de métodos termoanalíticos como a calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria são consideradas essenciais pela indústria farmacêutica por serem de rastreio rápido e fácil manuseio (OLIVEIRA et al., 2016; ROUMELI; TSIAPRANTA, 2013; SILVA et al., 2016). Ainda, técnicas espectroscópicas como espectroscopia no infravermelho e cromatografia líquida de alta eficiência auxiliam e complementam a interpretação dos resultados. A Tabela 3 mostra as técnicas utilizadas para a realização deste trabalho, assim como suas principais vantagens e desvantagens (CHADHA; BHANDARI, 2014; MONAJJEMZADEH et al., 2009).

Tabela 3. Técnicas de triagem de compatibilidade de excipientes, suas vantagens e desvantagens potenciais.

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Comentários
Teste de estresse isotérmico (IST) (análise por HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> ↪ Permite a detecção e quantificação de impurezas durante a incompatibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> ↪ Longo tempo para realização dos experimentos (o fármaco e os excipientes são submetidos à temperatura e umidade elevadas (aceleradas) para permitir que haja reação suficiente entre eles) ↪ Desenvolvimento de método de ensaio para cada fármaco é necessário para a análise por HPLC 	<ul style="list-style-type: none"> ↪ Os resultados são confiáveis
Calorimetria Exploratória diferencial (DSC)	<ul style="list-style-type: none"> ↪ Método rápido ↪ É necessária uma pequena quantidade de amostra ↪ Fácil detecção de interações físicas como mudança na forma polimórfica, conversão da forma cristalina em forma amorfa 	<ul style="list-style-type: none"> ↪ Se as alterações térmicas forem muito pequenas esta técnica não é muito adequada ↪ Não aplicável se o material de teste exibir propriedades que dificultem a interpretação dos dados ↪ Método destrutivo (a amostra é destruída durante a análise devido as elevadas temperaturas) ↪ Não é possível resolver eventos térmicos sobrepostos à mesma temperatura ↪ Não é possível detectar as incompatibilidades que ocorreram após o armazenamento em longo prazo 	<ul style="list-style-type: none"> ↪ Os resultados de incompatibilidade obtidos devem ser confirmados utilizando-se outros métodos não térmicos
Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	<ul style="list-style-type: none"> ↪ Detecção fácil de incompatibilidade devido a bandas únicas/deslocamento de pico. ↪ Informações químicas espaciais com configurações de imagem ↪ Pequena quantidade de amostra é necessária ↪ Captação de dados relativamente rápida ↪ Disponibilidade de bibliotecas espectrais 	<ul style="list-style-type: none"> ↪ Interferência da umidade ambiental 	<ul style="list-style-type: none"> ↪ A aparência de bandas extras devido à umidade ambiental deve ser negligenciada

Adaptado de RENU CHADHA; SWATI BHANDARI, 2014.

COMPLEXOS COM CICLODEXTRINA

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir da transglicosilação intramolecular do amido compostas por unidades de D-glucopiranosose conectadas por ligações α (1 \rightarrow 4), que originam estruturas cíclicas tronco-cônicas. As CDs obtidas com maior rendimento, conhecidas como naturais, contém seis, sete e oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrina (α CD), β -ciclodextrina (β CD) e γ -ciclodextrina (γ CD), respectivamente (CRINI, 2014; SZEJTLI, 1998).

A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a capacidade de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas. Portanto, eles são capazes de formar complexos com moléculas pouco solúveis em água (tais como polifenóis), melhorando a solubilidade das moléculas (PINHO; GROOTVELD; HENRIQUES, 2014).

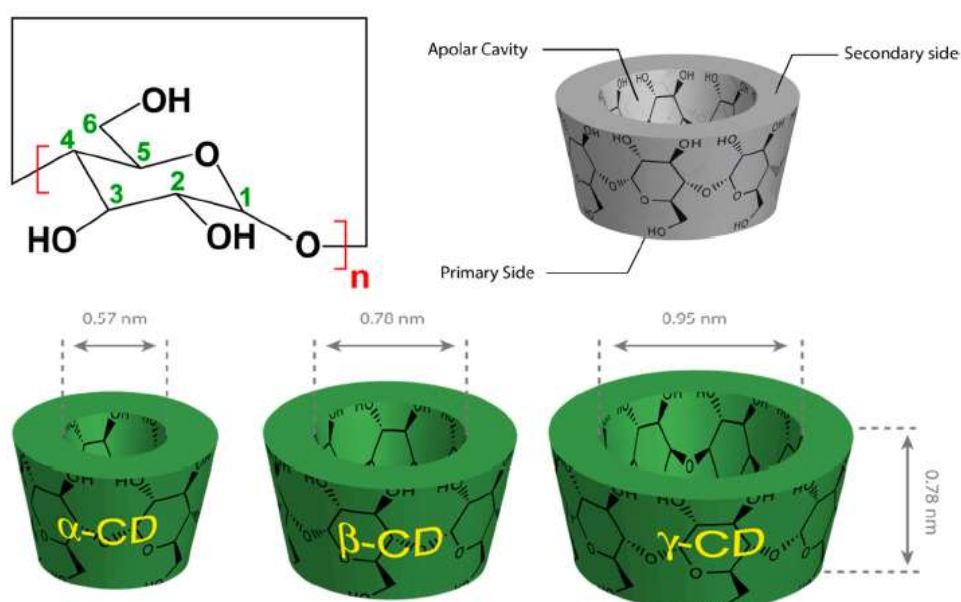


Figura 4. Estrutura da α CD, β CD e γ CD, respectivamente. Adaptado de CRINI, 2014

A estrutura das ciclodextrinas apresentam dois grupos hidroxílicos, os primários, que se encontram na extremidade mais estreita e ligados ao carbono 6, e os secundários se localizam na extremidade mais larga, ligados aos átomos de carbono C2 e C3 (Figura 5). A presença de grupos hidroxílicos nas extremidades favorece a solubilidade das ciclodextrinas em água. O interior da sua cavidade é delineado pelos átomos de hidrogênio H3 e H5 e pelas pontes de oxigênio glicosídicas, e a disposição dos pares de elétrons que estão voltados para o interior da cavidade que produzem um ambiente com caráter extremamente hidrofóbico. Já a disposição dos hidrogênios dos grupos hidroxilas H1, H2 e H4 voltados para o exterior da cavidade torna a superfície externa hidrofílica (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

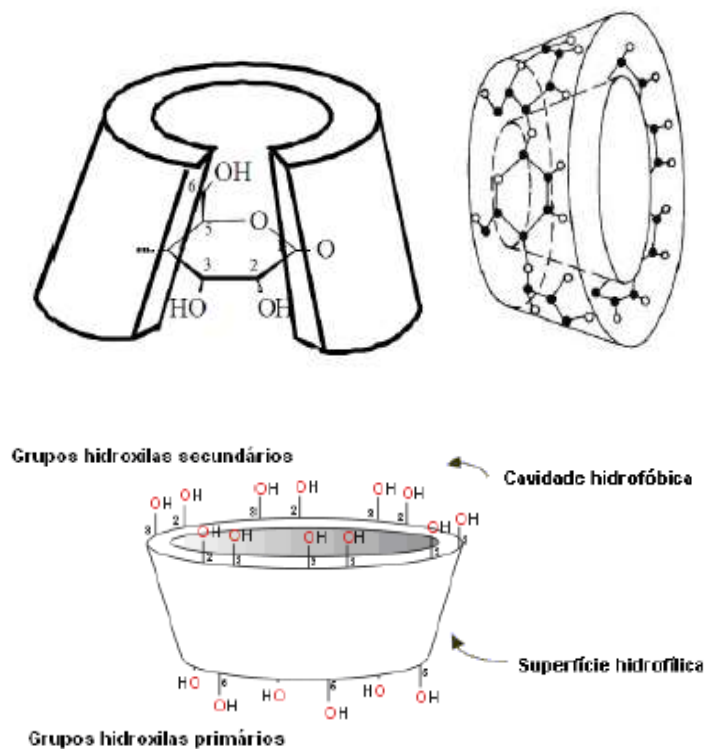


Figura 5. Esquema da disposição das hidroxilas na estrutura da CD

O uso farmacêutico das ciclodextrinas naturais (α CD, β CD e γ CD) vem sendo substituído pelos seus derivados semissintéticos, onde ocorre a substituição dos grupos hidroxílicos por grupos funcionais, sendo classificadas em derivados hidrofílicos, hidrofóbicos, anfifílicos e derivados iônicos, que oferecem maior capacidade de inclusão, solubilidade aquosa, estabilidade e menor toxicidade, devido às alterações das suas propriedades físico-químicas originais (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). Na tabela 4 são apresentadas algumas propriedades dos principais derivados de ciclodextrina de interesse farmacêutico.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas de algumas ciclodextrinas de interesse farmacêutico (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018)

Ciclodextrinas	R	MM (g/mol)	S _{água} (mg/mL)
α - Ciclodextrina (α CD)	-H	972,8	130
β - Ciclodextrina (β CD)	-H	1135	18,5
2- hidroxipropil β CD (HP β CD)	-CH ₂ CHOHCH ₃	1460	>600
Sulfobutil-éter β CD (SB β CD)	-(CH ₂) ₄ SO ₃ Na ⁺	2163	>500
β CD aleatoriamente metilada (RM β CD)	-CH ₃	1312	>600
γ - Ciclodextrina (γ CD)	-H	1297	249
2- hidroxipropil γ CD (HP γ CD)	-CH ₂ CHOHCH ₃	1576	>500

R = radical da substituição

MM = massa molecular (g/mol)

S_{água} = Solubilidade em água (mg/mL)

A utilização de ciclodextrina (CD) apresenta-se como uma alternativa para melhorar a solubilidade de fármacos já que sua estrutura confere propriedades físico-químicas únicas, sendo capaz de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas, como o Kaempferol (PINHO; GROOTVELD; HENRIQUES, 2014).

Existem poucos relatos na literatura do uso de ciclodextrina com Kaempferol isolado, principalmente em relação ao aumento de solubilidade. Os autores JULLIAN e colaboradores (2011) e MERCADER-ROS e colaboradores (2010) são os únicos, até o presente momento, que relataram o uso do Kaempferol isolado com CD. O primeiro avalia a melhora da atividade antioxidante do Kaempferol após inclusão em complexos com as ciclodextrinas 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e 2,6-dimetil- β -ciclodextrina (DM β CD) e caracteriza os complexos apenas pela técnica de RMN. Já o segundo utiliza as β -, G2- β -, e HP- β -ciclodextrinas, e compara os valores das constantes de complexação pelos métodos enzimático, de solubilidade e fluorimétrico em pH 9,0. Conclui que o melhor método para determinar o Kc é o enzimático, pela alta especificidade das enzimas, mas quando este método não pode ser aplicado, o estudo de solubilidade é um método potencial para calcular os valores de Kc. No entanto, a HP β CDs é a CD mais eficaz para complexar o KPF, independentemente do método de cálculo Kc utilizado.

Desta forma, mostra-se importante investigar de forma mais aprofundada a complexação do KPF com CDs a fim de compreender o impacto dessa estratégia no aumento da solubilidade do KPF com vistas a produzir formas sólidas orais.

REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, H. M.; SAMAK, M. A.; ALSEMEH, A. E. Synergistic therapeutic effects of *Vitis vinifera* extract and Silymarin on experimentally induced cardiorenal injury: The pertinent role of Nrf2. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. October 2018, p. 37–46, 2019.
- ANG, L. I. S. U. W. et al. Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. p. 9798–9804, 2006.
- BENNETT, R. N. et al. Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis eruroides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish rocket). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 4005–4015, 2006.
- BERGONZI, M. C. et al. Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins. v. 17, p. 5744–5748, 2007.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers ☆. v. 59, p. 645–666, 2007.

BUTLER, A. E. et al. Humans With Type 2 Diabetes. v. 52, n. January, 2003.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298–344, 2011.

CALDERON-MONTANO, J. M. et al. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298–344(47), 2011.

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

CHANG, S. C. et al. Dietary flavonoid intake and risk of incident depression in midlife and older women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 3, p. 704–714, 2016.

CHEN, A. Y.; CHEN, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food Chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2099–2107, 2013.

CHEN, Z. P. et al. Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of Ginkgo biloba extracts, Ginkgo biloba extract phospholipid complexes and Ginkgo biloba extract solid dispersions in rats. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1045–1052, 2010.

CORINA, D. et al. Physico-chemical and Biological Evaluation of Flavonols: Fisetin, Quercetin and Kaempferol Alone and Incorporated in beta Cyclodextrins. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 615–626, 2017.

CRINI, G. Review : A History of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 10940–10975, 2014.

DA CUNHA FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências**

Farmacéuticas Básica e Aplicada, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2007.

DELADINO, L. et al. Betalains and phenolic compounds of leaves and stems of *Alternanthera brasiliana* and *Alternanthera tenella*. **Food Research International**, v. 97, n. April, p. 240–249, 2017.

FANG, Y. et al. Study of structure and permeability relationship of flavonoids in caco-2 cells. **Nutrients**, v. 9, n. 12, 2017.

FÊNIX, O. Padronizado em 50% de Kaempferol. **LITERATURA TÉCNICA - Insumo Fitoterápico**, p. 1–2, 2017. <http://www.opcaofenix.com.br/opcao/wp-content/uploads/2017/03/KPF.pdf>. Acesso em 05.03.2019.

FORTEA, M. I.; GABALDÓN, J. A. Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 769–773, 2010.

GARCÍA-ARMESTO, M. R.; ARRIAGA, D. DE; RODRÍGUEZ-FERN, P. Antimicrobial activity of kaempferol and resveratrol in binary combinations with parabens or propyl gallate against *Enterococcus faecalis*. v. 61, p. 213–220, 2016.

GODOS, J. et al. Dietary polyphenol intake and depression: Results from the mediterranean healthy eating, lifestyle and aging (MEAL) study. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1–15, 2018.

GROSSO, G. et al. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 4, p. 1–10, 2017.

GUPTA, A. et al. Formulation , characterization , and evaluation of ligand-conjugated biodegradable quercetin nanoparticles for active targeting. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, n. October 2014, p. 1–11, 2015.

HOLLMAN, P. C. H. et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radical Research**, v. 31, n. 6, p. 569–573, 1999.

HOOPER, L. et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 1, p. 38–50, 2008.

ILK, S.; SAGLAM, N.; ÖZGEN, M. Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agent. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2016.

IMRAN, M. et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 138, n. 4, p. 85–93, 2011.

IMRAN, M. et al. Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, n. September, p. 1–13, 2018.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, 2018.

JOSHI, B. V.; PATIL, V. B.; POKHARKAR, V. B. Compatibility studies between carbamazepine and tablet excipients using thermal and non-thermal methods. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 687–694, 2002.

JULLIAN, C. et al. Cyclodextrins-kaempferol inclusion complexes: Spectroscopic and reactivity studies. **Journal of Solution Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 727–739, 2011.

KEYHANIAN, S.; STAHL-BISKUP, E. Phenolic constituents in dried flowers of Aloe vera (*Aloe barbadensis*) and their in vitro antioxidative capacity. **Planta Medica**, v. 73, n. 6, p. 599–602, 2007.

KIM, J. M.; LEE, E. K.; KIM, D. H. Kaempferol modulates pro-inflammatory NF- κ B activation by suppressing advanced glycation endproducts-induced NADPH oxidase. p. 197–208, 2010.

KIM, S.; CHOI, K. Anti-cancer Effect and Underlying Mechanism (s) of Kaempferol, a Phytoestrogen, on the Regulation of Apoptosis in Diverse Cancer Cell Models. **Toxicological Research**, v. 29, n. 4, p. 229–234, 2013.

LEDETI, I. et al. Compatibility study between antiparkinsonian drug Levodopa and excipients by FTIR spectroscopy, X-ray diffraction and thermal analysis. **Journal of**

Thermal Analysis and Calorimetry, v. 130, n. 1, p. 433–441, 2017.

LEE, S. et al. Inhibitory effects of flavonoids on TNF- α -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. **BMB reports**, p. 265–270, 2009.

LIM, Y.; KIM, I.; SEO, J. In vitro Activity of Kaempferol Isolated from the Impatiens balsamina alone and in Combination with Erythromycin or Clindamycin against Propionibacterium acnes. v. 45, n. 5, p. 473–477, 2007.

LIN, C. et al. 12- O -Tetradecanoylphorbol-13- Acetate-Induced Invasion / Migration of Glioblastoma Cells Through Activating PKC α / ERK / NF- κ B-dependent MMP-9 Expression. n. April, p. 472–481, 2010.

MA, H. et al. Effects of nitrogen substitute and Hypericum perforatum extract on the ethanol fermentation of traditional Chinese medicine dregs. **Industrial Crops and Products**, v. 128, n. March 2018, p. 385–390, 2019.

MAALOUL, A. et al. Effect of treated wastewater on growth and secondary metabolites production of two Eucalyptus species. **Agricultural Water Management**, v. 211, n. March 2018, p. 1–9, 2019.

MERCADER-ROS, M. T. et al. Kaempferol complexation in cyclodextrins at basic pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4675–4680, 2010.

MONAJJEMZADEH, F. et al. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 3, p. 404–413, 2009.

MUKAI, R. et al. Prenylation Enhances Quercetin Uptake and Reduces Efflux in Caco-2 Cells and Enhances Tissue Accumulation in Mice Fed Long-Term. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 10, p. 1558–1564, 2013.

NIESTROY, J. et al. Toxicology in Vitro Single and concerted effects of benzo [a] pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 3, p. 671–683, 2011.

OLIVEIRA, G. G. G. DE et al. Compatibility study of paracetamol , chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in physical mixtures. **Saudi**

Pharmaceutical Journal, p. 0–4, 2016.

ÖZYÜREK, M.; BEKTAS, B.; GÜC, K. *Analytica Chimica Acta* Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. v. 636, p. 42–50, 2009.

PARK, M. J. et al. The Anti-Inflammatory Effect of Kaempferol in Aged Kidney Tissues : The Involvement of Nuclear Factor- κ B via Nuclear Factor-Inducing Kinase / I κ B Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. v. 12, n. 2, p. 351–358, 2009.

PARK, S. Cyclic glucans enhance solubility of bioavailable flavonoids. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–10, 2016.

PEREIRA, E. et al. Compatibility study between atorvastatin and excipients using DSC and FTIR. p. 933–939, 2016.

PÉREZ-ABRIL, M. et al. Systematic investigation and molecular modelling of complexation between several groups of flavonoids and HP- β -cyclodextrins. v. 36, p. 122–131, 2017.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. v. 101, p. 121–135, 2014.

RAJENDRAN, P. et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 103–112, 2014.

RAO, Y. K.; FANG, S.; TZENG, Y. Antiinflammatory Activities of Flavonoids and a Triterpene Caffeate Isolated from *Bauhinia variegata*. v. 962, n. September 2007, p. 957–962, 2008.

RATHER, L. J.; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, F. *Acacia nilotica* (L.): A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 2, p. 12–30, 2015.

RAUF, A. et al. Diospyros, an under-utilized, multi-purpose plant genus: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 714–730, 2017.

RICE-EVANS, C.; RICE-EVANS, C. Flavonoid Antioxidants. p. 797–807, 2001.

RJEIBI, I.; BEN SAAD, A.; HFAIEDH, N. Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats: The protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 853–860, 2016.

RODRÍGUEZ GALDÓN, B.; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, E. M.; DÍAZ ROMERO, C. Flavonoids in onion cultivars (*Allium cepa* L.). **Journal of Food Science**, v. 73, n. 8, 2008.

ROSSI, L. et al. Salt stress induces differential regulation of the phenylpropanoid pathway in *Olea europaea* cultivars Frantoio (salt-tolerant) and Leccino (salt-sensitive). **Journal of Plant Physiology**, v. 204, p. 8–15, 2016.

ROUMELI, E.; TSIAPRANTA, A. Compatibility study between trandolapril and natural excipients used in solid dosage forms. p. 2109–2115, 2013.

SABARAGAMUWA, R.; PERERA, C. O.; FEDRIZZI, B. Centella asiatica (Gotu kola) as a neuroprotectant and its potential role in healthy ageing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, n. July, p. 88–97, 2018.

SANTOS, B. L. et al. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 123–138, 2015.

SCHMITT, E. A. et al. Rapid, practical and predictive excipient compatibility screening using isothermal microcalorimetry. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 175–184, 2001.

SILVA, D. et al. Evaluation of carvedilol compatibility with lipid excipients for the development of lipid-based drug delivery systems. v. 1, p. 2337–2344, 2016.

SUCHAL, K. et al. Molecular Pathways Involved in the Amelioration of Myocardial Injury in Diabetic Rats by Kaempferol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 2–17, 2017.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chem. Rev.**, v. 98, n. 97, p. 1743–1753, 1998.

TAMMELA, P. et al. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids

and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 425, n. 2, p. 193–199, 2004.

TRIVEDI, R. et al. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 289, n. 1–2, p. 85–93, 2008.

TSUKA, N. O. et al. Anti-methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Compounds Isolated from Laurus nobilis. v. 31, n. 9, p. 1794–1797, 2008.

VARSHNEY, R.; GUPTA, S.; ROY, P. Molecular and Cellular Endocrinology Cytoprotective effect of kaempferol against palmitic acid-induced pancreatic b -cell death through modulation of autophagy via AMPK / mTOR signaling pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 448, p. 1–20, 2017.

VIDAK, M.; ROZMAN, D.; KOMEL, R. Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells. p. 19406–19432, 2015.

WALLE, T. et al. Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids-Methylated versus unmethylated flavones. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 9, p. 1288–1296, 2007.

WANG, Y.; JING, Y. L. Selection of excipients for dispersible tablets of itraconazole through the application of thermal techniques and Raman spectroscopy. 2013.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 485–493, 2001.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of strWinkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218–223. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 218–223, 2002.

Y.LIU, J. ZHAN, X. L. ET AL. Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis of prospective cohort studies. **Clinical Nutrition**, v. 97, n. 19, p. 59–63, 2014.

YANG, Y. et al. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity:

An evaluation using the blood-brain barrier cell and Caco-2 cell models. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 3, p. 388–396, 2014.

YOU, G. et al. LWT - Food Science and Technology Comprehensive evaluation of solubilization of flavonoids by various cyclodextrins using high performance liquid chromatography and chemometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 94, n. January, p. 172–177, 2018.

ZHANG, K. et al. Preparation and evaluation of kaempferol-phospholipid complex for pharmacokinetics and bioavailability in SD rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 168–175, 2015.

Capítulo II
Investigação da compatibilidade entre o Kaempferol e excipientes pelos métodos
térmicos, espectroscópicos e quimiométricos

Artigo a ser submetido a periódico de circulação internacional

Neste segundo capítulo teve-se por objetivo avaliar, pela primeira vez, a compatibilidade do KPF com alguns dos excipientes mais utilizados em formas farmacêuticas sólidas (amido, celulose microcristalina, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, lactose, lauril sulfato de sódio e polivinilpirrolidona). A partir de misturas binárias 1:1 foram realizadas análises térmicas por calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria, análises espectroscópicas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com interpretação auxiliada por análises estatísticas multivariadas por análise de componente principal e análise hierárquica de clusters e, por fim, teste de estresse isométrico. Os resultados obtidos a partir das análises térmicas mostraram uma possível ocorrência de interação e/ou incompatibilidade entre o KPF e os excipientes analisados, com exceção da celulose microcristalina. Por outro lado, quando analisados os resultados espectroscópicos, multivariados e de estresse isotérmico essas interações e/ou incompatibilidades não foram confirmadas. Baseado nos resultados obtidos é plausível sugerir a possibilidade do desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida do KPF com os excipientes estudados já que as interações e/ou incompatibilidades foram descartadas

INVESTIGATION OF THE COMPATIBILITY BETWEEN KAEMPFEROL AND EXCIPIENTS BY THERMAL, SPECTROSCOPIC AND CHEMOMETRIC METHODS

**Gabriela de Lima Melchiades¹, Valéria Weiss Angeli², Mariana Colombo¹,
Letícia Scherer Koester^{1*}**

¹Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, Universidade de Caxias do Sul - Campus-Sede, Caxias do Sul, RS, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed:

leticia.koester@ufrgs.br

Keywords: Kaempferol, Excipients, Compatibility, Thermal analysis, Cluster analysis, Principal component analysis

ABSTRACT

Compatibility is an important step in pre-formulation studies during the development of solid dosage forms. In the present study, we used thermal analysis, isothermal stress testing followed by high performance liquid chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy complemented by two multivariate techniques (hierarchical cluster analysis and principal component analysis) to detect potential incompatibilities between kaempferol and commonly used solid dosage form excipients in binary mixtures 1:1. The excipients that were studied were: starch, microcrystalline cellulose, magnesium stearate, hydroxypropylmethylcellulose, lactose, sodium lauryl sulfate and polyvinylpyrrolidone. The thermal analyses indicated interactions occurred between kaempferol and all excipients except microcrystalline cellulose. However, isothermal stress testing and infrared spectroscopy complemented by multivariate analysis indicated compatibility between kaempferol and all excipients. Our study demonstrates the importance of combining different techniques and multivariate data analysis for pre-formulation drug-excipient analysis.

1. Introduction

The quality of a pharmaceutical formulation depends not only on the choice of active substance and the production process, but also on the appropriate selection of excipients (PANI; NATH; ACHARYA, 2011; PEREIRA et al., 2014; WANG et al., 2014). In the pre-formulation stage of development, the study of drug-excipient compatibility is one of the most important steps as it enhances the understanding of drug-excipient interactions and highlights changes in the physical or chemical properties of the drug and/or therapeutic response (CHADHA; BHANDARI, 2014; MATOS et al., 2017; PEREIRA et al., 2014). Compatibility screening involves the analysis of mixtures of the drug with one or more excipients.

Thermoanalytical techniques such as differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG) are used for a quick screening due to their ease of use (FULIAS et al., 2011; ROJEK; WESOLOWSKI, 2016). Although spectroscopic techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) are also easily conducted, the volumes of data that are generated limit their use as interpretation is labor intensive. Quantitative assay after isothermal stress test (IST) is another tool that is used in to detect drug-excipient interactions (CHADHA; BHANDARI, 2014; MONAJJEMZADEH et al., 2009; ROJEK; WESOLOWSKI, 2016).

Chemometrics is currently employed to assist the complex interpretation of a large variety of data, and uses common mathematical and statistical methods to maximize the information that is extracted from chemical data (RAJALAHTI; KVALHEIM, 2011). Chemometrics can be used to support many techniques, including infrared spectroscopy (WESOLOWSKI; ROJEK, 2013). Principal component analysis (PCA) is a method of multivariate data treatment that reduces the dimensionality of data while maintaining the variation present in the data group (ROJEK; WESOLOWSKI, 2016; SOUZA et al., 2013). On the other hand, hierarchical cluster analysis (HCA) measures the similarity between samples and classifies them into groups with similar spectral characteristics using the Euclidean distance (MAREK WESOLOWSKI, BARBARA ROJEK, 2012; ROJEK; WESOLOWSKI, 2017; ROJEK; WESOLOWSKI; SUCHACZ, 2013).

Flavonoids are polyphenolic compounds synthesized naturally by plants and widely distributed in the plant kingdom and contained in common human diet (WANG; CHEN; WANG, 2009; ZHANG et al., 2015). Kaempferol (KPF, 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one, Fig. 1) (DEVI et al., 2015) is a flavonoid with a wide range of pharmacological properties including anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antifungal, antiapoptotic and antioxidant properties (CHEN et al., 2010; KIM; CHOI, 2013).

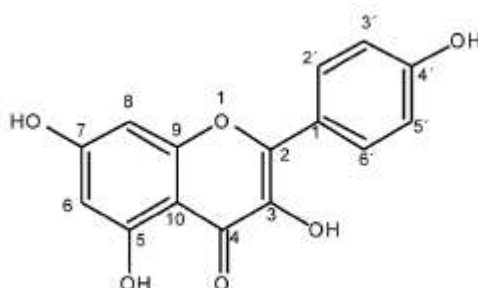


Figure 1. Chemical structure of Kaempferol

However, the clinical application of KPF is limited by its poor water solubility and low bioavailability after oral administration (LI et al., 2011; ZHANG et al., 2015). Strategies to increase the solubility and bioavailability of KPF *in vitro* and *in vivo* have been developed (BARVE et al., 2009; CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2011; CAO et al., 2010; CHEN et al., 2010; LI et al., 2011; TRIVEDI et al., 2008, 2009; ZHANG et al., 2015). Due to the wide range of pharmacological properties the kaempferol is an attractive ingredient for the development of solid dosage forms, meaning that this flavonoid can be classified as a drug candidate. However, prior to the development of new pharmaceutical forms, drug-excipient compatibility studies must be carried out.

The aim of this study was, therefore, to evaluate the compatibility of KPF with selected excipients commonly used in the development of solid dosage forms. The excipients studied were starch, microcrystalline cellulose, magnesium stearate, hydroxypropylmethylcellulose, lactose, sodium lauryl sulfate and polyvinylpyrrolidone; and the mixtures were assessed using thermal analysis (DSC and TG), IST and spectroscopic techniques (FTIR), the last combined with PCA and HCA. To our knowledge, this is the first time that such studies have been carried out on KPF.

2. Experimental

2.1 Materials

Stocks of KPF (98.18% purity) were purchased from ShaanXi HuiKe Botanical (Xi'an, China). The pharmaceutical excipients were purchased from different manufactures: corn starch (STR) from Corn Products (São Paulo, Brazil), microcrystalline cellulose 101 (MCC) from Minitai Chemical CO., LTD (Taiwan, China), magnesium stearate (MS) from Forlab (Rio de Janeiro, Brazil), hydroxypropylmethylcellulose (HPMC, methocel K100) from Colorcon (PA, USA), lactose monohydrate M-200 (LAC) from Milkaut (Pcia. de Santa Fé, Argentina), sodium lauryl sulfate (SLS) from CQA (São Paulo, Brazil), polyvinylpyrrolidone (PVP) from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Formic Acid 96% and Methanol HPLC grade (used for the preparation of the mobile phase) were obtained from Tedia (Rio de Janeiro, Brazil). Ultrapure water was produced with a Milli-Q system (Millipore, Billerica, USA). All other used reagents were of analytical grade.

2.2 Methods

2.2.1 Preparation of KPF-excipient binary mixtures

Mixtures of KPF with each of the seven excipients were prepared in 1:1 ratios (w/w KPF:excipient) in glass vials, then homogenized by vortexing for 3 minutes.

2.2.2 Differential scanning calorimetry

The DSC curves of KPF, excipients and binary mixtures were obtained using a Shimadzu Calorimeter Model DSC-60A (Kyoto, Japan) calibrated with an indium standard (156.6 ± 0.3 °C). The samples were weighed directly in aluminum pans (the mass of samples that were used were 1–2 mg), sealed and scanned under a dry atmosphere of nitrogen ($50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) with a heating flow rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ in the temperature range of 10–400 °C.

2.2.3 Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis of KPF alone and the binary mixtures was carried out using a Shimadzu Thermogravimetric Model TGA-50 (Kyoto, Japan) under a nitrogen atmosphere ($50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) with a heating flow rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ in the temperature range $23\text{--}800 \text{ }^\circ\text{C}$. The mass of samples that were used were approximately 10 mg.

2.2.4 Fourier transform infrared spectroscopy

The FTIR spectra of KPF, the excipients and the binary mixtures were obtained using a spectrophotometer (Perkin-Elmer, Model BX/RX, Connecticut, USA) in the range $4,000\text{--}600 \text{ cm}^{-1}$, with a resolution of 2 cm^{-1} over 40 scans.

2.2.5 Multivariate analysis

The PCA and HCA analyses were performed using SPSS Statistics 22 ® software (IBM Corp. Released 2013) (IBM®, 2013). From the FTIR spectra of the samples, a data matrix with a size of $15 \times 2,000$ was obtained, where 15 is the number of columns (KPF, excipients and their binary mixtures) and 2,000 is the number of lines (absorbance values of samples). All data acquired from the FTIR spectra were normalized between the limits of zero and one, corrected using the multiple scatter correction method (MSC) and Savitky-Golay method from data centered on the mean (MONAJJEMZADEH et al., 2009; ROJEK; WESOLOWSKI; SUCHACZ, 2013).

2.2.6 Isothermal stress testing

The drug and excipient samples were weighed directly in glass vials ($n = 3$) and mixed using a vortex for 3 minutes. Stressed samples were produced by adding water (10 % w/w), sealing each vial using a teflon-lined screw cap and storing in a hot air oven at $50 \text{ }^\circ\text{C}$. After 3 weeks, the samples were diluted appropriately to $5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ then quantitatively analyzed using HPLC and qualitatively through assessment

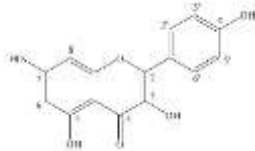
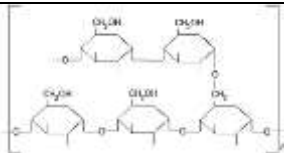
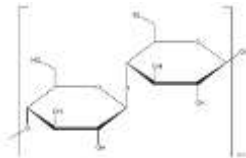
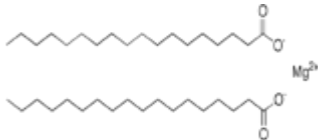

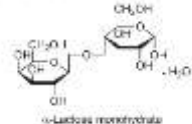
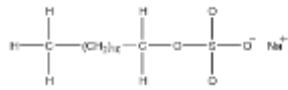
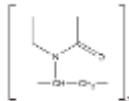
of color change. The KPF-excipient mixtures were stored undiluted in a refrigerator at 4 °C to serve as controls (control samples) (FULIAS et al., 2011; PANI; NATH; ACHARYA, 2011). Analysis of the KPF-excipient mixtures was performed on an HPLC apparatus (Shimadzu LC-10A system, Kyoto, Japan) equipped with a model LC-20AT pump, an SPD-20AV UV-VIS variable wavelength detector, a DGU-20A5 degasser, a CBM-20A system controller and SIL-20A injection valve with a 100 µL loop. The KPF sample was analyzed using a XTerra® RP18 column (250 mm ×4.6 mm, 5 µm particle size) (Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase was a 75:25 (v/v) mixture of methanol and 0.1 % formic acid in water. The injection volume was 20 µL and the HPLC system was operated at an isocratic flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, with detection at 368 nm and temperature of 35 °C (COLOMBO et al., 2017).

3. Results and Discussion

3.1 Thermal Analyses

Basic information about the thermal profiles of KPF and the excipients are presented in Table 1.

Table 1. General characterization of kaempferol and the excipients used

Samples	M.F. M.M.	Chemical structure	Heat changes of kaempferol and excipients	
			DSC data	References
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ 286.24		Melt peak, 287.89 °C	Melt peak, 285.5 °C (TZENG et al., 2011);
STR	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n (164.12) _n		Dehydration, 65.89 °C Decomposition, 299.08 °C	Dehydration, 72 °C Decomposition, 285; 315 °C (PEREIRA et al., 2014)
MCC	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n ; n≈220 (162.141) _n		Dehydration, 50.28 °C Decomposition, 353.98 °C	Dehydration, 50 °C Decomposition, 315 °C (FULIAS et al., 2011) Dehydration, 53 °C Decomposition, 332; 357 °C (PEREIRA et al., 2014)
MS	(C ₁₈ H ₃₅ O ₂) ₂ Mg 591.24		Melt peak, 110.85 °C	Melt peak, 115 °C (PEREIRA et al., 2014)
HPMC	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₁ R ₆ R = H or, CH ₃ or, CH ₃ CH(OH)CH ₂ 10.000-1.500.00		Dehydration, 56.88 °C Decomposition, 337.99 °C	Dehydration, 66.22 °C (WANG et al., 2014)
LAC	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ · H ₂ O 360.31		Dehydration, 147.22 °C Melt peak, 217.85 °C Decomposition, 242.34; 355.20 °C	Dehydration, 152.7 °C Melt peak, 218.38 °C (MONAJJEMZADEH et al., 2009) Dehydration, 145.00 °C Melt peak, 215.00 °C (FULIAS et al., 2011)
SLS	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S 288.38		Dehydration, 104.42 °C Melt peak, 190.15 °C Decomposition, 271.34 °C	Dehydration, 95; 107 °C Melt peak, 192 °C Decomposition, 223 °C (PEREIRA et al., 2014)
PVP	(C ₆ H ₉ NO) _n (111.14) _n		Melt peak, 73.20 °C Decomposition, 376.52 °C	Melt peak, 82 °C (FULIAS et al., 2011)

M.F.: Molecular formula
M.M: Molar mass

The thermal profile of pure KPF presented a single step melting process with no dehydration step (Fig. 2).

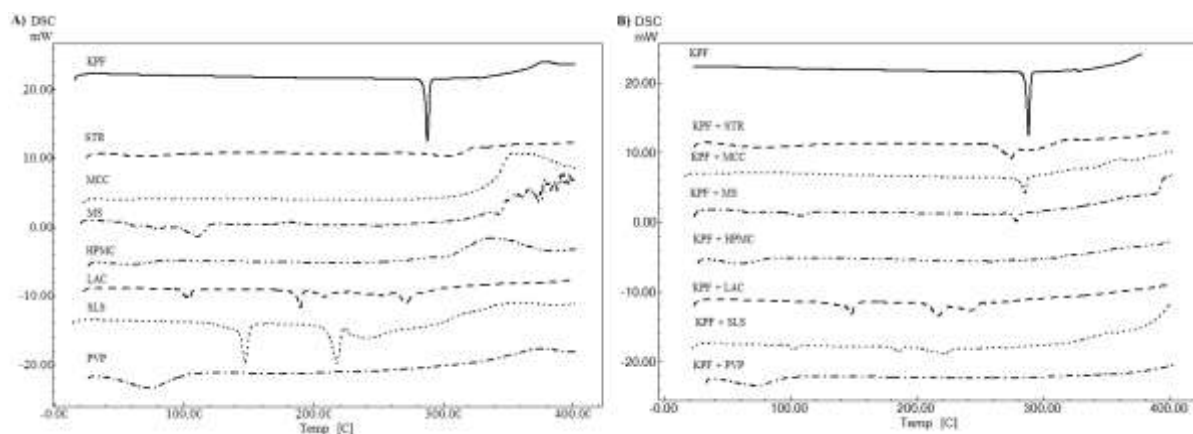


Figure 2. (a) DSC curves of KPF and the excipients alone; (b) DSC curves of KPF and binary mixtures 1:1 at 10–400 °C; heating rate 10 °C·min⁻¹; atmosphere of nitrogen, 50 mL·min⁻¹

The DSC curve showed a sharp endothermic peak at 287.89 °C, indicating the melting point of KPF, which is in agreement with the literature (WANG; CHEN; WANG, 2009). In the TG curve mass losses relating to KPF decomposition were observed in three events: 32.15 % at 318–324 °C, 39.30 % at 450–550 °C and 31.60 % at 780 °C (Fig. 3). Both MS and SLS melted at 100–200 °C; LAC melted above 200 °C and STR, MCC, HPMC and PVP start to decompose above 200 °C which led to charring.

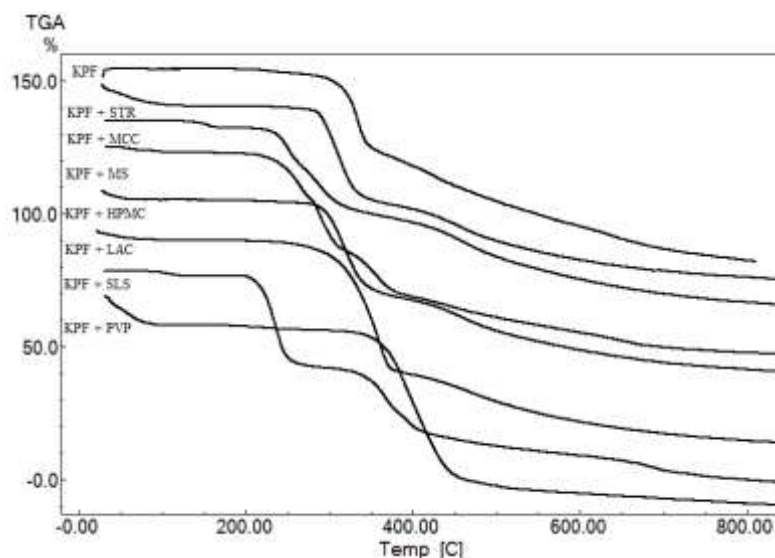


Figure 3. TG curves of KPF and binary mixtures 1:1 at 10–800 °C, heating rate $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; atmosphere of nitrogen, $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

The heat effects associated with physical or chemical changes of a sample can be observed with DSC. The appearance or disappearance of one or more peaks and changes in melting temperature when a substance is analyzed as part of a mixture are considered indicative of interactions between components (ROJEK; WESOLOWSKI, 2016; WESOLOWSKI; ROJEK, 2013).

The DSC curves obtained in this study revealed KPF to have an endothermic melting peak of $285.29\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the KPF-MCC mixture. This is not significantly different to the melting point of KPF alone, which suggests that there was no interaction between MCC and KPF. However, DSC analysis of all other mixtures indicated that KPF-exciipient interactions were occurring. In the case of STR and MS, the endothermic peak was shifted and the peak size was reduced. The HPMC-, LAC-, SLS- and PVP-KPF curves showed no endothermic melting peak of KPF, which suggests interaction between them (Fig. 2 and Table 2).

Table 2. Thermoanalytical data of KPF and their binary mixtures 1:1 with kaempferol

Samples	Dehydration				Fusion			Decomposition			
	DSC		TG		DSC			DSC		TG	
	T _{peak} / °C	ΔH _{corr} /J g ⁻¹	ΔT/°C ^a	Δm/%	T _{onset} (fusion) °C	T _{peak} /° C	ΔH _{corr} /J g ⁻¹	T _{peak} /° C	ΔH _{corr} /J g ⁻¹	ΔT/°C ^a	Δm/%
KPF	-	-	318-242	32.15	285.70	287.89	-134.69	370	-151.69	318-324 450-550;	32.15 39.30;
KPF + STR	76.72	- 276.22	42-85	5.95	273.31	274.38	-86.64	301.32	111.1	290-329; 420-558	36.26; 28.29
KPF + MCC	40.48	-12.40	36-58	2.32	281.69	285.29	-101.82	339.48 391.09	29.74 57.92	324-371; 381-576	51.40; 24.85
KPF + MS	69.25 259.64	-47.43 -26.85	50-75; 238-269	1.97; 15.59	274.83	278.52	-64.71	285.21 392.87	-8.61 -198.62	284-301; 340-387	22.79; 25.66
KPF + HPMC	59.05	-202.47	37-52	1.93	-	-	-	320.48	-93.18	293-338; 458-549	35.44; 30.07
KPF + LAC	147.70	-176.54	146- 161	2.81	-	-	-	240.60	-104.47	236-286; 439-487	32.16; 22.00
KPF + SLS	102.24	-33.94	80-117	1.91	-	-	-	221.12 375.22 -	-145.92 58.19 -	220-248; 347-394; 643-713	34.48; 29.38; 12.52
KPF + PVP	72.70	-381.98	51-77	7.83	-	-	-	244.25 379.66	-35.67 -74.05	219-246; 370-446	01.60; 43.43

ΔH_{f corr} = ΔH obs/%drug in sample x 100

^aΔT ranges between T_{onset} and T_{endset}

Variations in the shape of TG curves may be considered to indicate drug-excipient interactions, but the changes are not usually as drastic as those observed by DSC. Because TG curves reveal mass losses which accompany phase transitions (for example, sublimation and evaporation) that occur in analyzed mixtures, it was not possible to confirm whether ingredients of the mixtures were compatible (Table 2). Thus, it is verified that this technique must be evaluated in combination with other thermal analysis techniques (Fig. 3)(WESOLOWSKI; ROJEK, 2013).

The results of DSC and TG analyses indicated that KPF-excipient interactions were occurring in the case of STR, MS, HPMC, LAC, SLS and PVP. However, these results may be attributed to the high temperatures used during the experiment. In these conditions the excipients may melt and influence the solubility of KPF, which can interfere with the reading (WANG et al., 2014). Due to the potential limitations of thermal techniques, complementary methods of analysis were carried out to aid the interpretation of data and acquire as much information as possible.

3.2 Fourier transform infrared Analysis

Among the spectroscopic methods, FTIR has the advantages of requiring only a small amount of sample and being less destructive than other methods. Therefore, it is an attractive approach for the analysis of solid dosage forms, since the materials are not subjected to thermal or mechanical energies during preparation and solid-state phase transformations are avoided (PEREIRA et al., 2014). Drug-excipient interactions can usually be identified by the appearance of new absorption bands and the broadening and/or changes of band intensities compared with individual component spectra (MONAJJEMZADEH et al., 2009; ROJEK; WESOLOWSKI, 2016). The FTIR spectrum of KPF is show in Fig. 4.

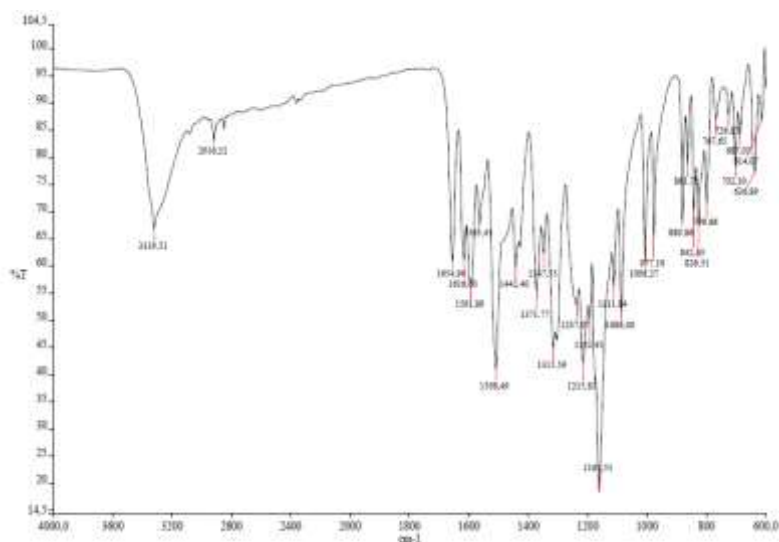


Figure 4. FTIR spectrum of pure KPF

The characteristic bands were as follows: (1) a strong and wide band at $3,319\text{ cm}^{-1}$ attributed to the four hydroxyls (stretching vibration of O-H); (2) a $1,654\text{ cm}^{-1}$ displaced carbonyl band due to the inductive effect of the resonance of α - and β -unsaturated ketones (C=O); (3) a band at $1,616\text{ cm}^{-1}$ indicating aromatic compounds (C=C); (4) a band at $1,508\text{ cm}^{-1}$ due to benzene ring vibrations; (5) a band at $1,371\text{ cm}^{-1}$ attributed to the C-OH bond and (6) a strong band at $1,161\text{ cm}^{-1}$ attributed to the stretching vibration of C-O (HAYTON; ALLEN; SCARPELLO, 2004; LI et al., 2011). The spectra of the KPF-excipient mixtures showed that the

characteristic KPF bands were practically unchanged (Table 3), indicating that the chemical structure of KPF remained unchanged (Fig 5).

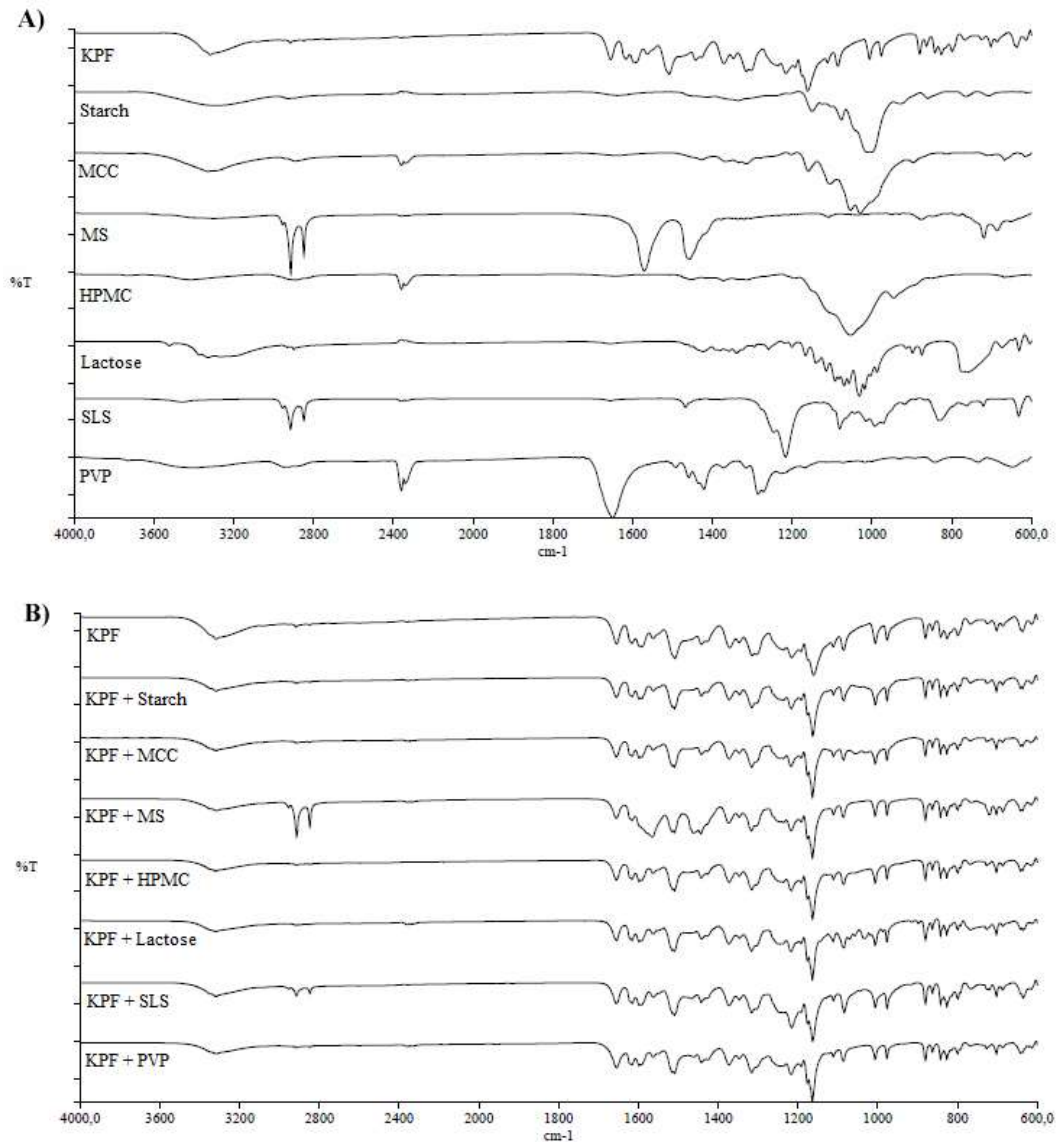


Fig. 5. Overlapping FTIR spectra of (a) KPF and excipients; (b) KPF and binary mixtures 1:1

Table 3. Values of the bands obtained by FTIR of KPF and the mixtures carried out.

Sample	Characteristic FTIR bands/cm ⁻¹					
	O-H	C=O	C=C aromatic	Vibrations of the benzene ring	C-OH	C-O
KPF	3319.51	1654.96	1616.00	1508.45	1371.77	1161.55
KPF + STR	3319.40	1655.64	1615.47	1509.59	1372.52	1163.50
KPF + MCC	3319.92	1655.91	1616.03	1509.83	1372.95	1164.01
KPF + MS	3318.02	1655.64	1616.00	1509.81	1373.79	1164.05
KPF + HPMC	3319.58	1655.57	1616.07	1509.71	1372.87	1163.88
KPF + LAC	3319.49	1655.73	1616.17	1508.89	1373.76	1164.28
KPF + SLS	3319.89	1655.68	1615.70	1509.45	1372.84	1163.48
KPF + PVP	3320.19	1654.89	1616.10	1509.76	1373.32	1164.19

Although FTIR was an important complementary technique to DSC and TG, compatibilities were not able to be fully confirmed by FTIR as the overlap of bands that was observed for the mixtures impaired data interpretation. Therefore, statistical techniques were required to facilitate interpretation of the spectra (MONAJJEMZADEH et al., 2009).

3.3 Multivariate statistics

Two spectral regions (3600–2800 cm⁻¹ and 1800–600 cm⁻¹) were selected for chemometric calculations. The fingerprint region of 1800–600 cm⁻¹ was considered to be the most informative, because this region does not contain major absorption bands of the excipients and can therefore be used to identify structural changes of KPF. The 3600–2800 cm⁻¹ region is complementary to the fingerprint region as it indicates the presence of O-H, C-H and N-H groups in the molecule. In the case of the carbohydrate excipients (starch, microcrystalline cellulose and lactose), characteristic bands of the stretching deformations of O-H and C-H groups were observed in this region (CHEN et al., 2010).

Drug-excipient compatibility can be assessed from the graphical representation of the PCA, based on the distribution of analyzed samples in the bi or three-dimensional plane (ROJEK; WESOLOWSKI; SUCHACZ, 2013). In this case, the eigenvalues and variances were explained by three main components (PC1, PC2 and PC3) for the mixtures studied (Table 4).

Table 4. Results of PCA calculations for the physical mixtures of kaempferol and excipients

Principal component	Eigenvalue	Variance %	Variance (cumulative variance) %
1	7.551	50.339	50.339
2	1.821	12.143	62.483
3	1.580	10.535	73.018
4	1.061	7.073	80.090
5	0.999	6.600	86.690
6	0.922	6.148	92.838

Using these components in the model retains a significant part of the variability, thus, a three-dimensional scatter diagram was appropriate to view the PCA results. Two distinct clusters, one of the excipients and one relating to the mixtures of KPF with every excipient and KPF alone, were observed (Fig. 6).

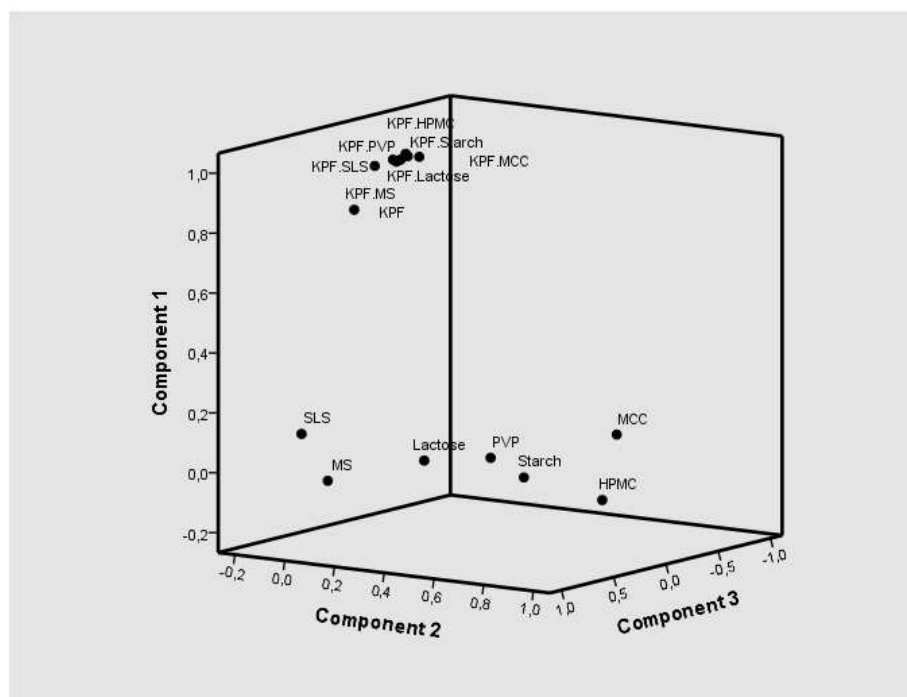


Figure 6. Scatterplot of PCA in three dimensions. KPF and KPF-exciipient mixtures and excipients

The data relating to KPF and the mixtures were located in the most positive region of PC1. Excipients were distributed more broadly, including at the most negative values of PC1, between positive and negative values of PC2 and at positive values of PC3.

The formation of two separate clusters indicates that interactions did not within the mixtures. This separation profile occurs because the main functional groups of KPF persist in the mixture, but are located closer to the structure of KPF than to those of the excipients. Positive interactions occur between the substances but do not annul the structural properties of each. From these data we can conclude that the substances of the mixtures were compatible.

The HCA analysis was performed to complement PCA analysis. This technique groups samples into classes based on FTIR transmittance values at certain wave numbers (ROJEK; WESOLOWSKI; SUCHACZ, 2013). Results are presented as distance coefficients in the form of a dendrogram, and compatibility

between ingredients is indicated when two clusters are formed (IBM®, 2013). The Euclidean distance (a measure of dissimilarity) was used to calculate the distance coefficients (HAYTON; ALLEN; SCARPELLO, 2004). The dendrogram for KPF and the mixtures (Fig. 7) shows two large clusters, one representing KPF and the mixtures and one representing the excipients, thus supporting the PCA data and indicating compatibility between the constituents of mixtures.

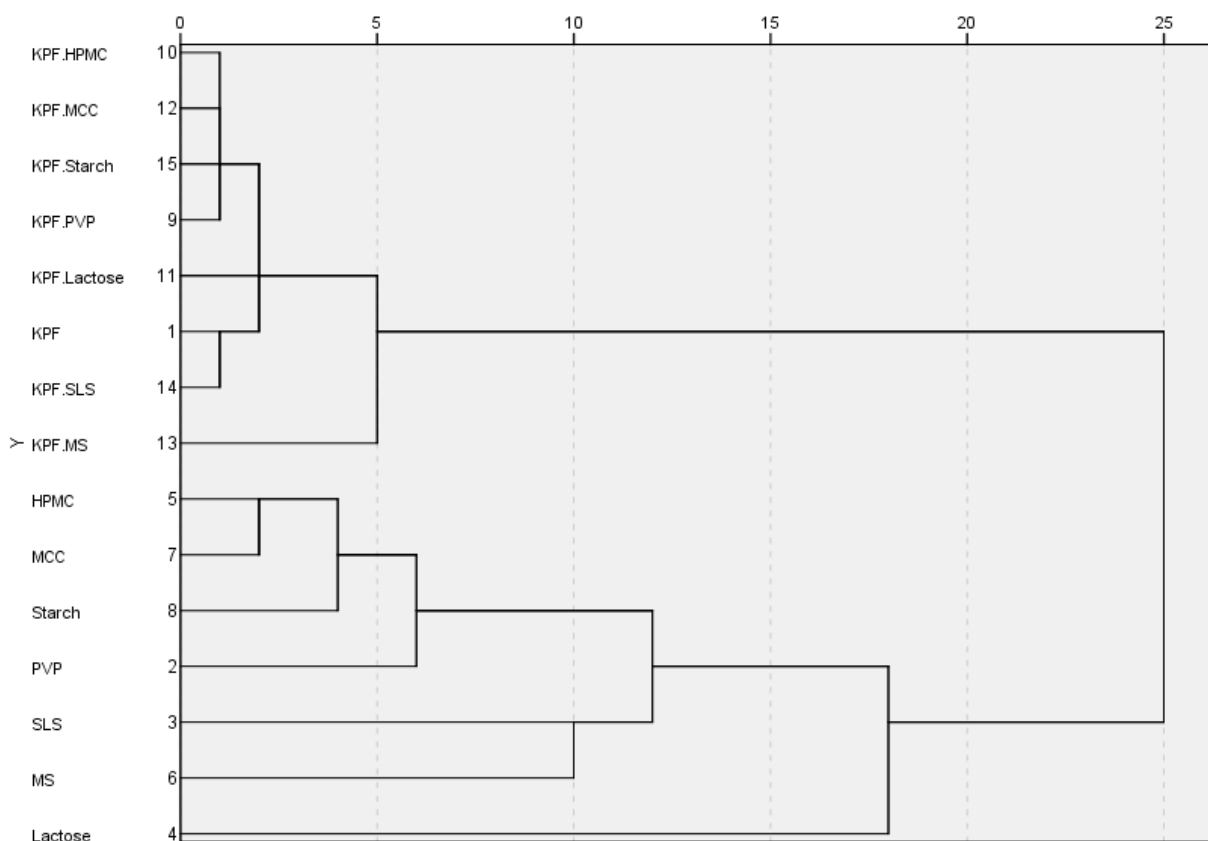


Figure 7. Dendrogram of HCA in three dimensions showing KPF, KPF-exipient mixtures and excipients

3.2. Isothermal Stress Testing Analysis

After three weeks of storage at 50 or 4 °C, the KPF-excipient mixtures were qualitatively analyzed to identify color changes, and assessed by HPLC to verify the KPF content. All of the mixtures as well as KPF alone showed a small decrease in the intensity of the yellow color except KPF-SLS which showed darkening towards a strong yellow (Fig. 8).



Figure 8. Results of qualitatively analysis to identify color changes of KPF and KPF-excipient mixtures before and after 3 weeks of storage. A) Samples analyzes immediately after preparation. B) Samples after 3 weeks of storage at 50 °C

These changes should suggest that there is interaction between the components of the blend. The retention times and peak shapes observed by quantitative HPLC (Fig. 9) indicated that there were no significant changes in the KPF content of any mixture after being submitted to the analysis conditions (Fig. 10) and the PDA peak purity revealed that the purity of all samples was > 0.999.

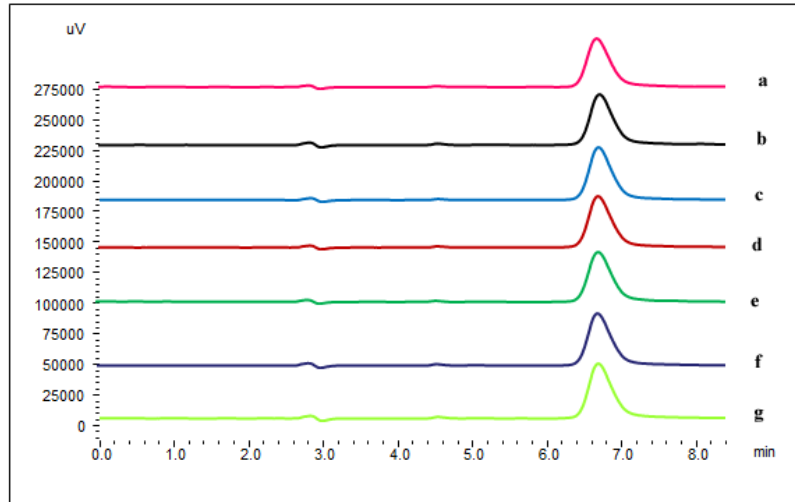


Figure 9. Results of the retention times and peak shapes observed by quantitative HPLC of KPF and KPF-excipient mixtures after 3 weeks of storage at 50 °C.

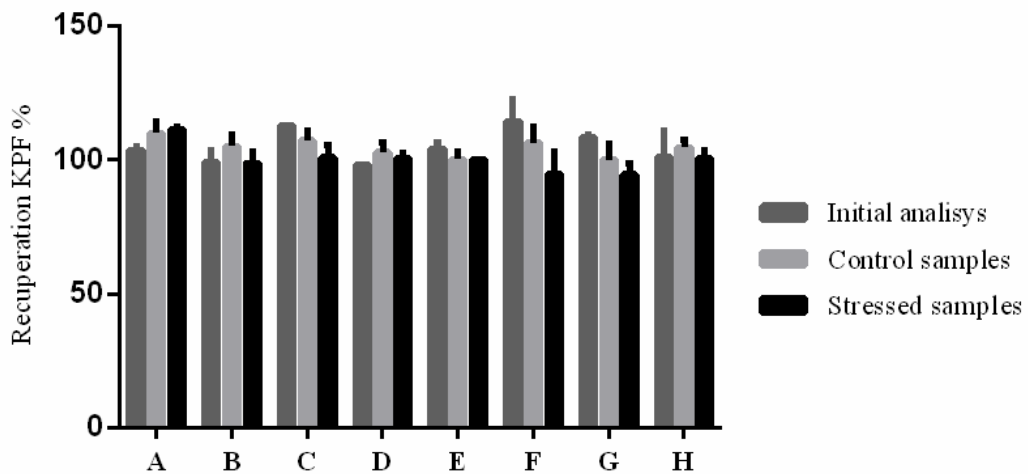


Figure 10. Results of HPLC analysis of the KPF and KPF-excipient mixtures after 3 weeks of storage. Initial analysis: KPF-excipient mixtures analyzed immediately after preparation. Control samples: KPF-excipient mixtures without added water and stored at 4 °C for 3 weeks. Stressed samples: KPF-excipient mixtures with 10 % added water and stored at 50 °C for 3 weeks. Values expressed as average \pm standard deviation. (A: KPF; B: KPF-STR; C: KPF-MCC; D: KPF-MS; E: KPF-HPMC; F: KPF-LAC; G: KPF-SLS; H: KPF-PVP).

The results of thermal, spectroscopic and chemometric analyses are collated in Table 5. Apart from the thermal techniques, all methods indicate compatibility between KPF and each of the excipients compatibility. However, results of DSC and TG should not be dismissed as they can still provide useful information, indicating that physicochemical interactions may have occurred between them during sample heating.

Table 5. Interactions between kaempferol and excipients based on thermal, FTIR spectroscopic and multivariate analysis data. The ingredients of mixtures are compatible (+) or incompatible (-)

Excipients	TG	DSC	FTIR	HCA	PCA	IST
STR	-	-	+	+	+	+
MCC	+	+	+	+	+	+
MS	-	-	+	+	+	+
HPMC	-	-	+	+	+	+
LAC	-	-	+	+	+	+
SLS	-	-	+	+	+	+
PVP	-	-	+	+	+	+

Conclusions

The present work aimed to evaluate, yet unexplored, incompatibilities between KPF and some of the most used excipients in solid dosage forms (starch, microcrystalline cellulose, magnesium stearate, hydroxypropylmethylcellulose, lactose, sodium lauryl sulfate and polyvinylpyrrolidone) using thermal statistical analysis methods, spectroscopic and multivariate analysis. Thermal analysis suggested that interactions were occurring between KPF and the excipients analyzed, except for microcrystalline cellulose. However, based on the results of FTIR and the data obtained from PCA, HCA and IST analysis, the possibility of KPF-

excipient incompatibility was excluded. The statistical methods of PCA and HCA were valuable tools in the interpretation of FTIR spectra. Our study highlights the importance of using multiple techniques in pre-formulation studies.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS (Edital PqG 2017 – T.O. 17/2551-0001).

References

BARVE, A. et al. Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 30, n. 7, p. 356–365, 2009.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298–344, 2011.

CAO, J. et al. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 2, p. 249–255, 2010.

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

CHEN, Z. P. et al. Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of Ginkgo biloba extracts, Ginkgo biloba extract phospholipid complexes and Ginkgo biloba extract solid dispersions in rats. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1045–1052, 2010.

COLOMBO, M. et al. Validation of an HPLC-UV method for analysis of Kaempferol-

loaded nanoemulsion and its application to in vitro and in vivo tests. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 831–837, 2017.

DEVI, K. P. et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 1–10, 2015.

FULIAS, A. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms Bogdan Tit. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 221–227, 2011.

HAYTON, J. C.; ALLEN, D. G.; SCARPELLO, V. **Factor Retention Decisions in Exploratory Factor Analysis: A Tutorial on Parallel Analysis**. [s.l: s.n.]. v. 7

KIM, S. H.; CHOI, K. C. Anti-cancer effect and underlying mechanism(s) of Kaempferol, a phytoestrogen, on the regulation of apoptosis in diverse cancer cell models. **Toxicological Research**, v. 29, n. 4, p. 229–234, 2013.

IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.

LI, W. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system of persimmon leaf extract: Optimization and bioavailability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 161–171, 2011.

MAREK WESOŁOWSKI, BARBARA ROJEK, AND J. P. Application of Chemometrically Processed Thermogravimetric Data for Identification of Baclofen-Excipient Interactions. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 3, p. 691–698, 2012.

MATOS, A. P. S. et al. Compatibility study between diazepam and tablet excipients: Infrared spectroscopy and thermal analysis in accelerated stability conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1675–1682, 2017.

MONAJJEMZADEH, F. et al. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 3, p. 404–413, 2009.

PANI, N.; NATH, L.; ACHARYA, S. Compatibility studies of nateglinide with excipients in immediate release tablets. **Acta Pharmaceutica**, v. 61, n. 2, p. 237–247, 2011.

PEREIRA, M. A. V et al. Compatibility study between chitosan and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1091–1100, 2014.

RAJALAHTI, T.; KVALHEIM, O. M. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: A tutorial review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1–2, p. 280–290, 2011.

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

ROJEK, B.; WESOLOWSKI, M. Compatibility studies of hydrocortisone with excipients using thermogravimetric analysis supported by multivariate statistical analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 1, p. 543–553, 2017.

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

SOUZA, J. et al. Risperidone – Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using thermal and non-thermal techniques. **Thermochimica Acta**, v. 568, p. 148–155, 2013.

TRIVEDI, R. et al. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 289, n. 1–2, p. 85–93, 2008.

TRIVEDI, R. et al. Effects of Egb 761 on bone mineral density, bone microstructure, and osteoblast function: Possible roles of quercetin and kaempferol. **Molecular and**

Cellular Endocrinology, v. 302, n. 1, p. 86–91, 2009.

WANG, S. Y.; CHEN, C.; WANG, C. Y. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. **Food Chemistry**, v. 112, p. 676–684, 2009.

WANG, Y. et al. Selection of excipients for dispersible tablets of itraconazole through the application of thermal techniques and Raman spectroscopy. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2391–2400, 2014.

WESOLOWSKI, M.; ROJEK, B. Thermogravimetric detection of incompatibilities between atenolol and excipients using multivariate techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 1, p. 169–177, 2013.

ZHANG, K. et al. Preparation and evaluation of kaempferol-phospholipid complex for pharmacokinetics and bioavailability in SD rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 168–175, 2015.

Capítulo III

Complexação do Kaempferol com ciclodextrinas e o efeito *spring-parachute*

Artigo a ser submetido a periódico de circulação internacional

Neste segundo capítulo experimental teve-se por objetivo preparar complexos entre o kaempferol e as ciclodextrinas β CD e HP β CD a fim de proporcionar um aumento na sua hidrossolubilidade. Para uma avaliação inicial da solubilidade utilizou-se o diagrama de solubilidade de fase (Higuchi-Connors) e, posteriormente, os complexos no estado sólido foram preparados pela técnica de liofilização. Os resultados obtidos a partir dos diagramas de solubilidade mostraram que quanto menor o tempo de complexação, maior a concentração de kaempferol solubilizado em meio aquoso, sendo que a HP β CD solubilizou em torno de 4,7 vezes mais kaempferol que a β CD. Observou-se também, a partir do diagrama de solubilidade, a ocorrência de um efeito de supersaturação, em que rapidamente uma elevada concentração de kaempferol foi solubilizada e manteve-se neste estado de supersaturação por aproximadamente 12 horas, sendo este efeito conhecido como “spring and parachute”. Os complexos produzidos com HP β CD foram caracterizados por técnicas calorimétricas, espectroscópicas e, também, por microscopia, e apresentaram razão estequiométrica 1:1 KPF:HP β CD.

Supersaturable complex of kaempferol with cyclodextrin: the spring and parachute effect

Gabriela de Lima Melchiades¹, Mariana Colombo¹, Leticia Scherer Koester^{1*}

¹Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed:
leticia.koester@ufrgs.br

Keywords: Kaempferol, Solubility, Cyclodextrin, Phase solubility, Precipitation inhibitors, Supersaturable formulations

ABSTRACT

Kaempferol (KPF) is a flavonoid with a wide range of pharmacological properties (e.g. anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antifungal, antiapoptotic and antioxidant) that becomes increasingly attractive for future application in the clinic. However, KPF has low aqueous solubility and oral bioavailability, which impairs its pharmacological capacity in a solid oral dosage form. In this context, the aim of this work was to produce and characterize KPF complexes with β CD and HP β CD to improve the aqueous solubility of KPF. HP β CD provided the best solubilization of KPF and was selected for the production of solid complexes by lyophilization, which were characterized by content, DSC, TGA, FTIR, NMR and SEM. Cyclodextrin generated supersaturated solutions that achieved high concentrations of solubilized KPF in a few hours, and maintained this supersaturation state stabilized for at least 12 hours, phenomenon known as *spring and parachute* effect. This situation generated by the use of cyclodextrin may prove to be an interesting strategy to be used in the development of a solid dosage form.

1. Introduction

Kaempferol (KPF, 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one, Fig.1) is a flavonoid found in many edible plants such as onion, grapes, cabbage, tea, broccoli, tomato, strawberries and beans. The enzymes involved in KPF biosynthesis are relatively common in the plant kingdom, and this is one of the reasons why this flavonoid is widely distributed in plants (Calderon-Montano et al., 2011; Rajendran et al., 2014). KPF has been identified in many plant species commonly used in traditional medicine (e.g., *Acacia nilotica*, *Aloe vera*, *Centella asiatica*) and presents a wide range of pharmacological properties including anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antifungal, antiapoptotic and antioxidant properties (Calderón-Montaña et al., 2011; Imran et al., 2018; Rajendran et al., 2014). However, owing to its phenolic nature KPF is quite polar but poorly water-soluble, limiting its bioavailability after oral administration [6].

Cyclodextrins (CD) are cyclic oligosaccharides derived from starch degradation via enzymes, consisting of (α -1,4)-linked D-glucopyranose. The natural CDs are the most common, they appear as α -, β - and γ -CDs consisting of 6, 7 and 8 D-glucopyranose units (Jansook et al., 2018; Pérez-abril et al., 2017). CDs have the ability to encapsulate guest hydrophobic molecules of proper polarity and dimension inside their cavities because of their special molecular structure: outer surface is hydrophilic and the inner central cavity is hydrophobic (Park, 2016; Xu et al., 2017).

As a result of the complex formation, the characteristic properties of the included substance can be improved, such as solubility, dissolution rate, bioavailability, and stability (Pérez-abril et al., 2017; Xu et al., 2017; Zhou et al., 2013). However, natural CD exhibits some disadvantages, such as its limited water solubility, a feature that can be improved with the use of its hydrophilic derivatives. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) is a hydroxyl alkylated β -CD derivative that exhibits relatively high solubility, low toxicity and satisfactory inclusion ability (Pérez-abril et al., 2017). The chemical structures of both β CD and HP β CD are shown in Figure 1.

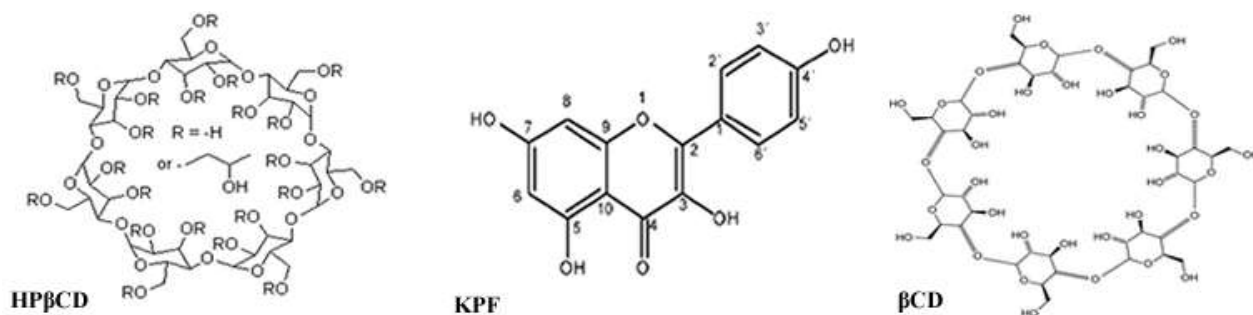


Fig. 1. Chemical structure KPF, HPβCD and βCD

There are few reports in the literature of the use of cyclodextrin to improve KPF solubility. Mercader-Ros et al. (2010) were the first to investigate the complexation of isolated KPF with β-, G2-β-, and HP-β-cyclodextrins and compared the values of the complexation constants by the enzymatic, solubility and fluorimetric methods at pH 9.0. They concluded that the best method to determine K_c is the enzymatic, but when this method cannot be applied, the solubility study is a potential method to calculate K_c values. However, HPβCDs was the most effective CD for complexing KPF, regardless of the K_c calculation method used. Jullian et al. (2011) evaluated the improvement of the antioxidant activity of KPF with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) and 2,6-dimethyl-β-cyclodextrin (DMβCD) and characterized the complexes only by NMR.

KPF:cyclodextrin complexation is also reported along with other flavonoids. Bergonzi et al. (2007) prepared inclusion complexes of the flavonoids galangin, kaempferol and quercetin by the kneading and freeze-drying techniques, and characterized using DSC, IR and NMR. Pérez-abril et al. (2017) evaluated the influence of the molecular structure of flavonoids after complexing with HPβCD on its low solubility and bioavailability through molecular modeling. You et al. (2018) evaluated the solubilization of eight different flavonoids, including kaempferol, by three classes of cyclodextrins by Chemometrics (native CDs, hydrophilic derivatives of CD and derivative from ionic CD). Showed that the effect of solubilization by the chemometric effect was: ionic CD derivative > hydrophilic CD derivatives > native CDs.

Such studies demonstrate the interest on the use of CDs to improve the properties of KPF, but further studies are necessary to both determine the best conditions for KPF complexation in view to obtain a solid oral dosage form and to clarify KPF:CD molecular aggregation mechanism.

Thus, this study investigates the effect of β CD or HP β CD complexation on the aqueous solubilization of KPF and the feasibility of obtaining fully characterized solid complexes obtained by freeze-drying in view to develop solid oral dosage forms.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

KPF (98.18%) was purchased from ShaanXi HuiKe Botanical (Xi'an,China). β -CD and HP β CD were obtained from Roquette Frères (Labonathus, Brazil). Liquid chromatography (LC)-grade methanol and formic acid 96% (Tedia, Rio de Janeiro, Brazil) were used for mobile phase preparation. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Millipore, Billerica, USA). All other used reagents were of analytical grade.

2.2 Methods

2.2.1. High Performance Liquid Chromatography Analysis

The Liquid chromatography (LC) analysis was performed on a HPLC apparatus Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) with a SPD-20AV UV-VIS variable wavelength detector, a model LC-20AT pump, a DGU-20A5 degasser, a CBM-20A system controller and SIL-20A injection valve with a 100 μ L loop. Chromatography separations were performed on an Xterra[®] RP18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m particle size). Mobile phase consisted of methanol and 0.1% formic acid in water in the ratio 75:25 (v/v) under an isocratic flow of 1.0 mL/min. The

detection wavelength, column temperature, and injection volume were 368 nm, 35 °C, and 20 µL (Colombo et al., 2017).

2.2.2. Phase Solubility Studies

Phase solubility studies were investigated based on the method proposed by Higuchi and Connors (Higuchi, T; Connors, 1965). A fixed amount of KPF exceeding its aqueous solubility was added to the aqueous solutions of β-CD or HPβCD (0-10mM) in 5 mL glass vials. Dispersion were magnetically stirred for 2, 6, 12, 24, 48 h, at room temperature (25°C), filtered through 0.45-µm membrane (Millipore, USA) for direct analysis by LC. Each experiment was carried out in triplicate. The solubilizing potential of cyclodextrins was assessed through the determination of the complexation efficiency (CE), stability constant (K_s), which can be obtained from the slope of phase solubility diagrams, according to the following equations:

$$K_s = \frac{\text{slope}}{S_0 \times (1 - \text{slope})} \quad \text{Eq. (A.1)}$$

$$CE = \frac{\text{slope}}{(1 - \text{slope})} \quad \text{Eq. (A.2)}$$

where S_0 is the intrinsic solubility of KPF in water (solubility of KPF in absence of cyclodextrin).

2.2.3. Preparation of inclusion complex and physical mixture

An inclusion complex of KPF with the selected CD was prepared by freeze-drying method. The required amount of KPF and aqueous solution of HPβCD were mixed and stirred at 25 °C for 2, 6, 12, 24 and 48 h. After these periods, the dispersions were filtered through a 0.45µm membrane (Millipore, USA), frozen at -18 °C for 48 h and then dried for 48h by freeze-drying in an Edwards EF4 Modulyo freeze dryer (Edwards, UK). The physical mixture (PM) was prepared by simple mixing KPF and the HPβCD with a 1:1 molar ratio in a vial for 5 min.

2.2.4. Characterization of the solid complex

2.2.4.1. KPF content

To determine KPF content, an accurately weighted amount of 1.0 mg KPF/HP β CD complex was diluted in methanol to obtain a theoretical concentration of 0.2 $\mu\text{g/mL}$, then filtered and analyzed by HPLC method as previously described. All analyses were carried out in triplicate.

2.2.4.2. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC measurements were performed with a Shimadzu Calorimeter Model DSC-60A (Tokyo, Japan). The samples were weighed (1-2 mg) directly in aluminum pans, sealed and scanned under dry atmosphere of nitrogen ($50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) with heating flow rate $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ in the temperature range of 10-400 $^\circ\text{C}$. An empty aluminum crucible served as reference, and indium was used to calibrate the temperature.

2.2.4.3. Thermogravimetric analysis (TGA)

Thermogravimetric analyses were carried out on a TGA-50 equipment (Japão), under a nitrogen atmosphere ($50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) with a heating flow rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ in the temperature range 10-810 $^\circ\text{C}$.

2.2.4.4. Fourier transformed- infrared (FTIR) spectroscopy

Spectra were obtained using a spectrophotometer (Nicolet IS10 – modelo Thermo Scientific) (USA) in the range $4,000\text{--}600 \text{ cm}^{-1}$, with a resolution 4 cm^{-1} and 40 scans.

2.2.4.5. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

NMR spectra of KPF, HP β CD and complexes obtained after 2 and 24 hours of complexation were recorded on a Bruker AVANCE IIIHD spectrometer 400 MHz (Bruker, Switzerland). For the analysis ^1H NMR and 2D-ROESY, KPF was dissolved in MeOH-D (Sigma-Aldrich, USA). The complexes and HP β CD were dissolved in D $_2$ O (Merck, Germany) and filtered before use.

2.2.4.6. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Morphological characteristics of KPF, HP β CD, PM, and complexes were analyzed on a Jeol LV-6060 scanning electron microscope (Tokyo, Japan). Samples were fixed over aluminum stubs with double-sided tape and coated with a smooth layer of gold under vacuum 48 h prior to observation at a voltage of 15 kV.

3. Results and Discussion

3.1. Phase Solubility Studies

The phase solubility diagrams of KPF/ β CD and KPF/HP β CD at different times (2, 6, 12, 24 and 48 h), at room ambient (25 °C) are shown in Fig. 2 A and B, respectively.

The linear relation between KPF solubility with β CD and HP β CD concentrations in all complexation time intervals indicates the production of A $_L$ type phase-diagrams (Higuchi, T; Connors, 1965). Since the slope was less than one in each case, the stoichiometry of the complex was assumed to be 1:1 M (Yatsu et al., 2013).

The K $_s$ determined for all complexation times in both complexes suggest a good interaction between KPF and cyclodextrins. The values of the stability constants (K $_s$) found were higher for the HP β CD complexes. The best performance of the derivatives can be attributed to the hydroxyl groups present which increase the solubilization capacity over the natural cyclodextrins.

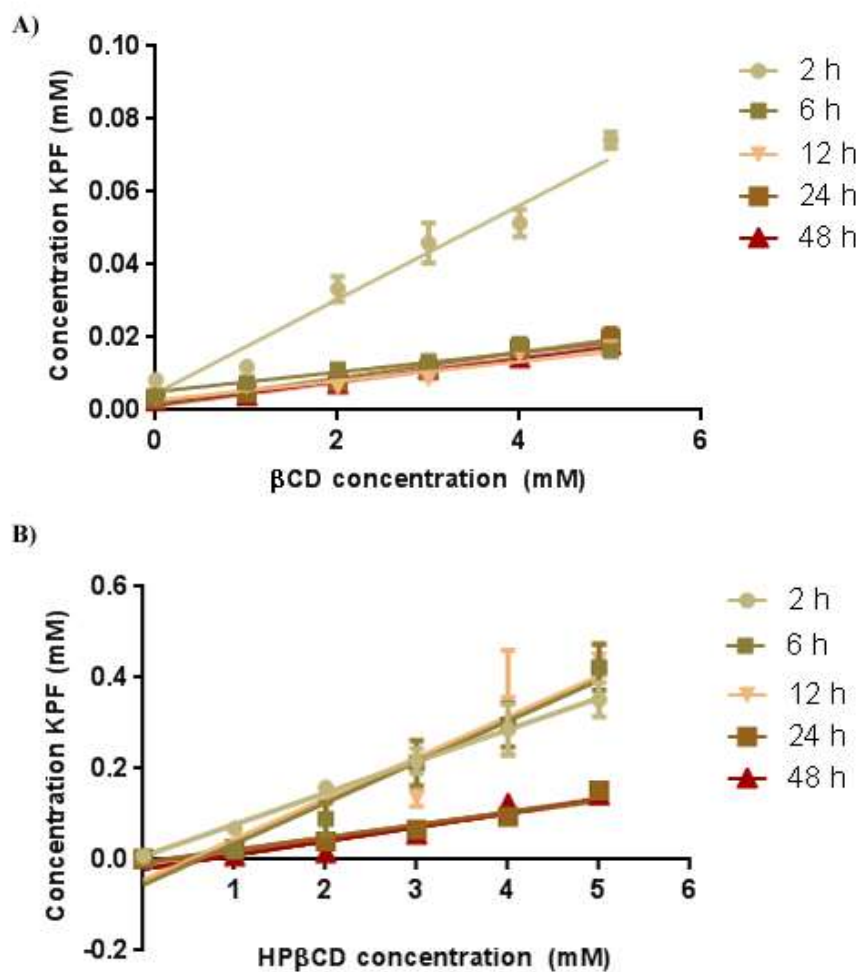


Fig. 2. Phase solubility diagrams at 2, 6, 12, 24 and 48 hours of (A) kaempferol/ β -cyclodextrin and (B) kaempferol/(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin.

The results obtained for the aqueous solubility of KPF in water, apparent stability constant and complexation efficiency of KPF/ β CD and KPF/HP β CD complexes are presented in Table 1.

Table 1. Constant of apparent stability and complexing efficiency corresponding to the complexes in times of 2, 6, 12, 24 and 48 hours

Cyclodextrins	Times (h)	S_0 ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$)	K_s (M^{-1})	CE	Slope	r^2
βCD	2	2.41 ± 0.05	1553	0.013	0.0129	0.9545
	6	1.15 ± 0.07	669	0.003	0.0026	0.8780
	12	1.01 ± 0.02	755	0.003	0.0026	0.8566
	24	0.90 ± 5.05	1126	0.004	0.0035	0.9469
	48	0.71 ± 0.14	1294	0.003	0.0031	0.9737
$\text{HP}\beta\text{CD}$	2	2.41 ± 0.05	8876	0.075	0.0695	0.9359
	6	1.15 ± 0.07	24581	0.099	0.0898	0.9226
	12	1.01 ± 0.02	27992	0.098	0.8966	0.8527
	24	0.90 ± 5.05	8967	0.028	0.0274	0.9418
	48	0.71 ± 0.14	12730	0.032	0.0306	0.8728

S_0 = intrinsic solubility; K_s = stability constant; CE = complexing efficiency

The stability constants of complexes with derivative cyclodextrin ($\text{HP}\beta\text{CD}$) were higher than that with the natural cyclodextrin (βCD). Enhanced performance of derivatives is attributed to the presence of hydroxypropyl groups that expanded the hydrophilic region of the macromolecule by capping the edge of the cavity and the increased substrate binding via a hydrophobic effect (Zhou et al., 2013). The complexation with this cyclodextrin increased the solubility of KPF by 23.9- and 113.6- fold for the βCD and $\text{HP}\beta\text{CD}$, respectively, after 2 hours. When the samples were analyzed after 24 hours, the solubility of KPF increased 6.4- and 49.1 fold for the βCD and $\text{HP}\beta\text{CD}$, respectively.

The solubilizing power of the cyclodextrins is characterized by complexation efficiency, calculated in order to select the most promising cyclodextrin for the preparation of solid kaempferol complexes. β CD with a CE value of (0.0013-0.003) showed the lowest solubilizing power in the analysis, while HP β CD presented greater potential (CE= 0.099-0.028), even though all three values are considered relatively low (Kratz et al., 2011). Based on the results, HP β CD was selected for further studies as the best potential carrier for KPF.

Figure 3 shows the profile of KPF solubilization by HP β CD complexation in 1:1 molar ratio after different complexation intervals. The addition of hydrophilic cyclodextrin (HP β CD) was able to generate high levels of supersaturated kaempferol solution and also maintain the supersaturated state for at least 12h, clearly demonstrating that cyclodextrin acted as both generator and maintainer of a supersaturated state, in a profile called “spring” and “parachute” (Xu and Dai, 2013). Supersaturable solutions are thermodynamically unstable, and usually generated from a higher energy form of drug, called “a spring”. Normally, the generation of supersaturated solution occurs for highly concentrated solution and/or high-energy and/or rapidly dissolving solid forms due to the changed morphology, particle size and/or wettability (Xu and Dai, 2013). To benefit from the supersaturated state for increasing absorption, a drug has to be maintained at a high concentration for an extended period of time. This can be achieved by using precipitation inhibitors (“parachutes”) for temporary inhibition of drug precipitation (Warren et al., 2010). In order to take advantage of this situation, the supersaturated state has to be maintained at high concentration for a time period sufficient for absorption (Brouwers et al., 2009; Xu and Dai, 2013).

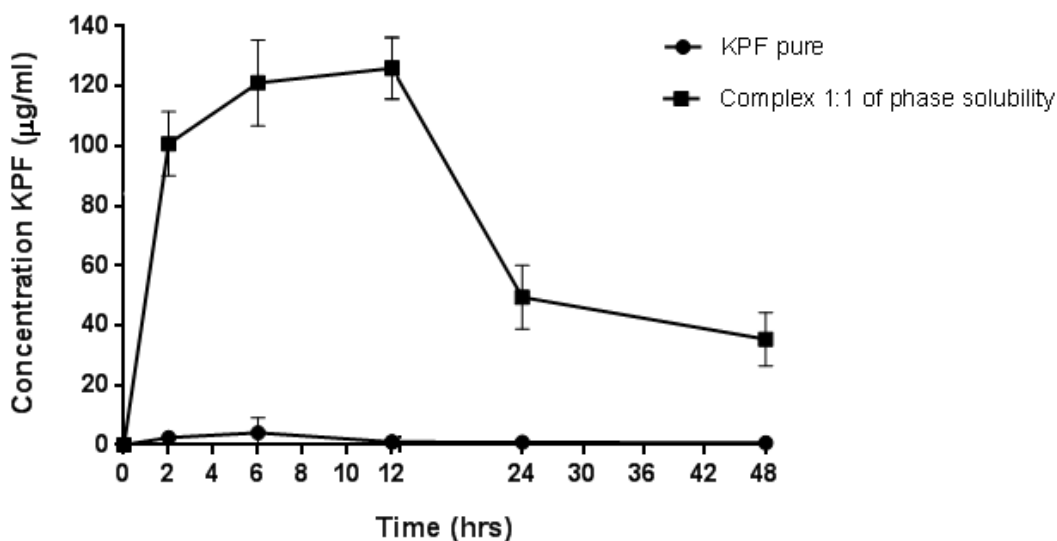


Fig. 3 Graphic representation of the spring and parachute effect of KPF pure and complex (1:1) of phase solubility diagram

Several types of materials can inhibit the nucleation or growth of crystals (BREWSTER et al., 2008a; IERVOLINO; RAGHAVAN; HADGRAFT, 2000; XU; DAI, 2013). The mechanisms can be: changing the adsorption layer at the crystal-medium interface; altering bulk properties such as surface tension or saturation solubility; selectively adsorbing to the crystal interface thereby blocking crystal growth; adsorbing into surface imperfections causing rough surfaces to become flat and altering the surface energy of the crystal face; being adsorbed into growth layers and thereby disrupting growth layers across the surface (BREWSTER et al., 2008a, 2008b; IERVOLINO; RAGHAVAN; HADGRAFT, 2000). Rheological polymers such as HPMC and PVP are thought to interact through a number of mechanisms including adsorbing to the crystal (via hydrogen bonding) and collecting at the growing crystal-bulk media interface and thereby providing diffusion resistance (BREWSTER et al., 2008b). Cyclodextrins can solubilize molecules through the formation of dynamic inclusion complexes (DAVIS; BREWSTER, 2004; REWSTER, 1996). Other reports suggest that cyclodextrins can also inhibit nucleation and crystal growth through non-complex based mechanisms which may be similar to those associated with the pharmaceutical rheological polymers previously described (BREWSTER et al., 2008b). It is also described that HP β CD changes the metastable

zone as a function of drug–cyclodextrin interaction and solubilization. The cyclodextrins may also interact with the growing crystal, well as accumulation in the unstirred water layer resulting in an increase the ability of the cyclodextrin to complex with drug monomers inhibiting efficient mass transfer at the interface (BREWSTER et al., 2008a; IERVOLINO; RAGHAVAN; HADGRAFT, 2000). In addition to known pharmaceuticals properties of cyclodextrins to form inclusion complexes in solution, it has been reported the solubilizing potential may be related to non-inclusion complex related phenomena such as cyclodextrin aggregation or surfactant-like properties inherent in these systems. And also their ability to stabilize formed supersaturated solutions. These effects may be very useful in the preparation of solid dosage forms of compounds with low intrinsic solubility and poor oral bioavailability.

3.2. Characterization of the Solid Complex

3.2.1. KPF content

KPF content of the different complexes is shown in table 1. It is possible to observe a low content of KPF in the freeze-dried complexes. This low content may be due to the very low water solubility of the KPF or to the freeze-dried method which was used to dry the liquid complex. In this method, the dispersion of KPF and HP β CD was filtered prior to freeze-drying step to remove the unsolubilized material. Therefore, the lower content of KPF in the solid KPF/HP β CD complex may probably be due to the elimination of the non-solubilized KPF (YATSU et al., 2013) and corroborates with the low CE values observed.

Table 2.

Quantitative result of the KPF content in lyophilized complexes (n = 3)

Complex filtered after a determined time interval	KPF content (%) in freeze-dried powder
2h	1.22 ± 0.07
6h	0.60 ± 0.01
12h	0.41 ± 0.13
24h	0.35 ± 0.01
48h	0.27 ± 0.03

3.2.2. DSC analysis

The thermal properties of the samples were investigated as shown in Fig. 4. Thermogram of KPF presented a sharp endothermic peak at 287.89 °C corresponding the melting point of KPF, while HP β CD showed only a broad endothermic peak at 99.06 °C, corresponding to the release of water from the cyclodextrin cavity. KPF/HP β CD physical mixture presented a mixed profile, with characteristics from both HP β CD and KPF, but the intensity of the peak corresponding to the melting point of KPF is drastically reduced and the endothermic peak at 287.89 °C shifted to a broad peak for 301.03 °C indicative of a slight interaction in this simple mixture. The KPF/HP β CD solid complexes obtained after different complexation times showed a complete disappearance of endothermic KPF peak, which my suggests the existence of a strong interaction between KPF and HP β CD in the solid state or the lack of sensitivity of the method to detect KPF melting due to the low KPF content in the complexes.

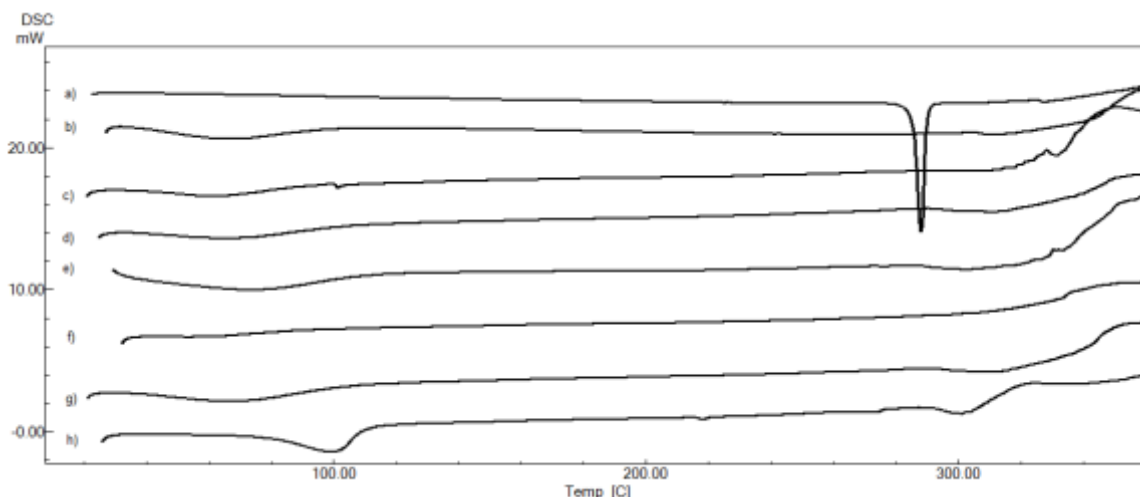


Fig. 4. DSC curves of KPF, HP β CD and KPF/HP β CD complexes at 10–400 °C; heating rate 10 °C·min⁻¹; atmosphere of nitrogen, 50 mL·min⁻¹. (a) KPF pure; (b) HP β CD; (c) KPF/HP β CD 2 hours; (d) KPF/HP β CD 6 hours; (e) KPF/HP β CD 12 hours; (f) KPF/HP β CD 24 hours; (g) KPF/HP β CD 48 hours; (h) physical mixture.

3.2.3. TGA analysis

In the TG curve mass losses relating to KPF decomposition were observed in three events: 32.15% at 318–324 °C, 39.30% at 450–550 °C and 31.60% at 780 °C (Fig. 5). An analysis on the TGA curves showed that HP β CD begin its dehydration at 88–162 °C, corresponding to the release of water from the cyclodextrin cavity and the degradation begins at 348 °C (85%) in a single exothermic event. The physical mixture showed three exothermic events, the first one referring to dehydration at 40.4 – 169.2 °C (9.1%), the other two concerning degradation at 259 – 433 °C (55.53%) and at 496 – 866 °C (7.28%). Analysis of the curves of KPF/HP β CD complexes showed a single exothermic event, few differences between the temperatures of degradation and mass loss. KPF/HP β CD complexes after 2 hours at 352 – 358 °C (62.9%), KPF/HP β CD complexes after 6 hours at 346 – 388 °C (73.9%), KPF/HP β CD complexes after 12 hours at 346 – 385 °C (68.4%), KPF/HP β CD complexes after 24 hours at 344 – 385 °C (80.5%), KPF/HP β CD complexes after 48 hours at 348 – 389 °C (74.4%). TGA is used to investigate the thermal stability of samples prepared. The complexes are freeze-dried powders and it can be seen that the degradation process started at a lower temperature (degradation T_{onset} 322 °C), since the degradation process occurs at approximately the same temperature as for

HP β CD alone. This phenomenon may suggest material amorphization (DOILE et al., 2008).

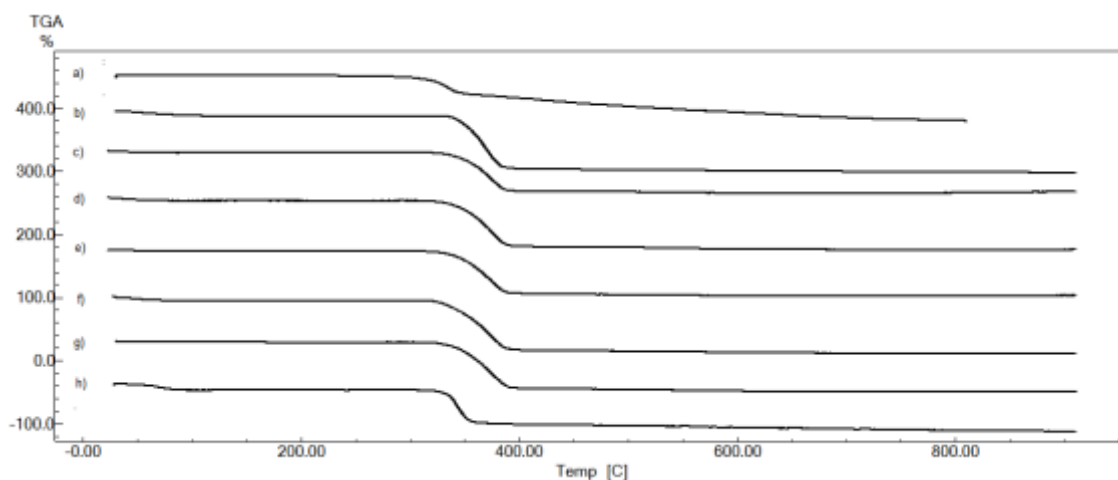


Fig. 5. TGA curves of KPF, HP β CD and KPF/HP β CD complexes at 10–800 °C, heating rate 10 °C·min⁻¹; atmosphere of nitrogen, 50 mL·min⁻¹. (a) KPF pure; (b) HP β CD; (c) KPF/HP β CD 2 hours; (d) KPF/HP β CD 6 hours; (e) KPF/HP β CD 12 hours; (f) KPF/HP β CD 24 hours; (g) KPF/HP β CD 48 hours; (h) physical mixture.

3.2.4. FTIR studies

Fig. 6 represented the FTIR spectra of KPF, HP β CD and KPF/HP β CD inclusion complexes and the physical mixture. FTIR spectrum of KPF showed characteristic absorption bands in 3319 cm⁻¹ related to –OH stretching frequency, 1654 cm⁻¹ related to C=O stretching frequency, 1616 cm⁻¹ related to C=C stretching frequency, 1508 cm⁻¹ due to benzene ring vibrations, 1371 cm⁻¹ attributed to the C=OH bond, 1161 cm⁻¹ related to C-O stretching frequency. The FTIR spectrum of HP β CD showed prominent peaks at 3330 cm⁻¹ (O-H stretching), 2920 cm⁻¹ (C-H stretching) and 1656 cm⁻¹ (H-O-H bending) (ALY, 2017; YATSU et al., 2013). For the physical mixture, spectrum was approximately characterized by the superimposition of individual absorption bands of KPF and HP β CD with no remarkable alterations. With respect to KPF/ HP β CD solid complexes spectra, the broad hydroxyl band of pure HP β CD at 3330 cm⁻¹ was slightly extended and shifted to 3339. The C=O stretching (1654 cm⁻¹), the C=C stretching (1616 cm⁻¹) and the C-O stretching (1161 cm⁻¹) peaks could not be identified. Such spectral changes in the O-H stretching profile and C=O, C=C and C-O stretching vibrations could be attributed to the

association, via H-bond, between the host and the guest during complexation process (CRUPI et al., 2007; YATSU et al., 2013).

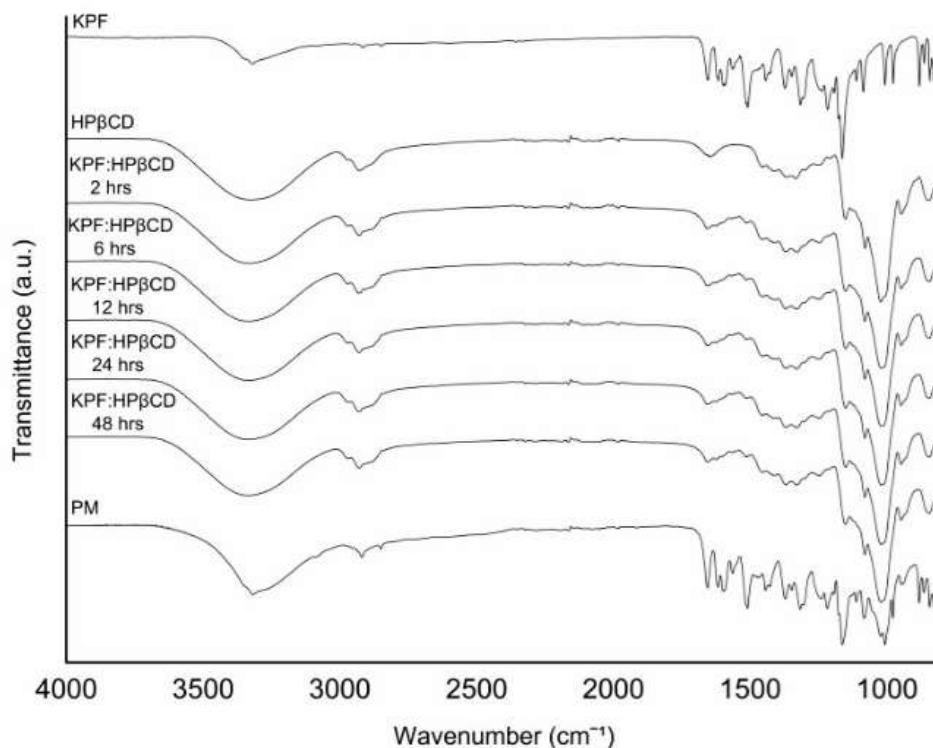


Fig. 6. Overlapping FTIR spectra of KPF, HPβCD, KPF/ HPβCD complexes and physical mixture

3.2.5. NMR analysis

Although the results of the physicochemical characterization provide strong evidence of interaction between kaempferol and HPβCD, in this study it was not possible to demonstrate the inclusion of the drug molecule in the cyclodextrin cavity. It is well known that cyclodextrins form both inclusion and non-inclusion complexes, and that several different types of complexes can coexist in aqueous solutions. They can also aggregate and solubilize drugs and other hydrophobic molecules through micellar-like mechanisms (DAGNY, 2007; KRATZ et al., 2011; LOFTSSON et al., 2005). Nuclear magnetic resonance spectroscopy analyzes were inconclusive (Fig. 7), since no peak characteristic of KPF was detected in the complex, probably due to the low efficiency of complexation and the low content of KPF in the samples.

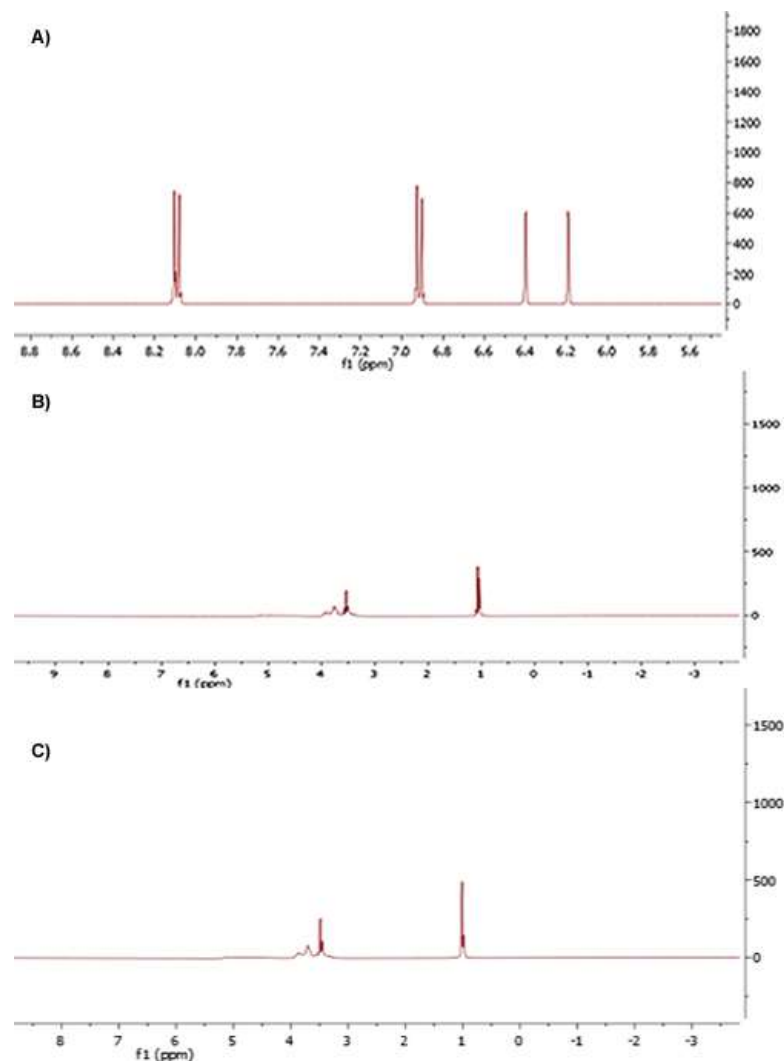


Fig 7. Chemical shifts of aromatic protons of KPF in the absence and presence of CDs. **(A)** KPF; **(B)** KPF/HP β CD complex 2h; **(C)** KPF/HP β CD complex 24h;

3.2.6. SEM characterization

The SEM experiments were conducted to visualize changes in the surface morphology of KPF and HP β CD. The photomicrographs obtained for KPF, HP β CD, physical mixture, KPF/ HP β CD complexes are show in Fig. 8. Pure KPF reveled as bar-shaped crystal particles, while HP β CD presented rounded shape and sub-rough surface. The physical mixture maintained the original morphology of bulk drug and excipient, with KPF crystals adhering to the surface of HP β CD. The surface morphology of inclusion complex showed an irregular block structure and there was a drastic change in the morphology and shape of the drug particles. It was no longer

possible to differentiate KPF and HP β CD, revealing an apparent interaction between them.

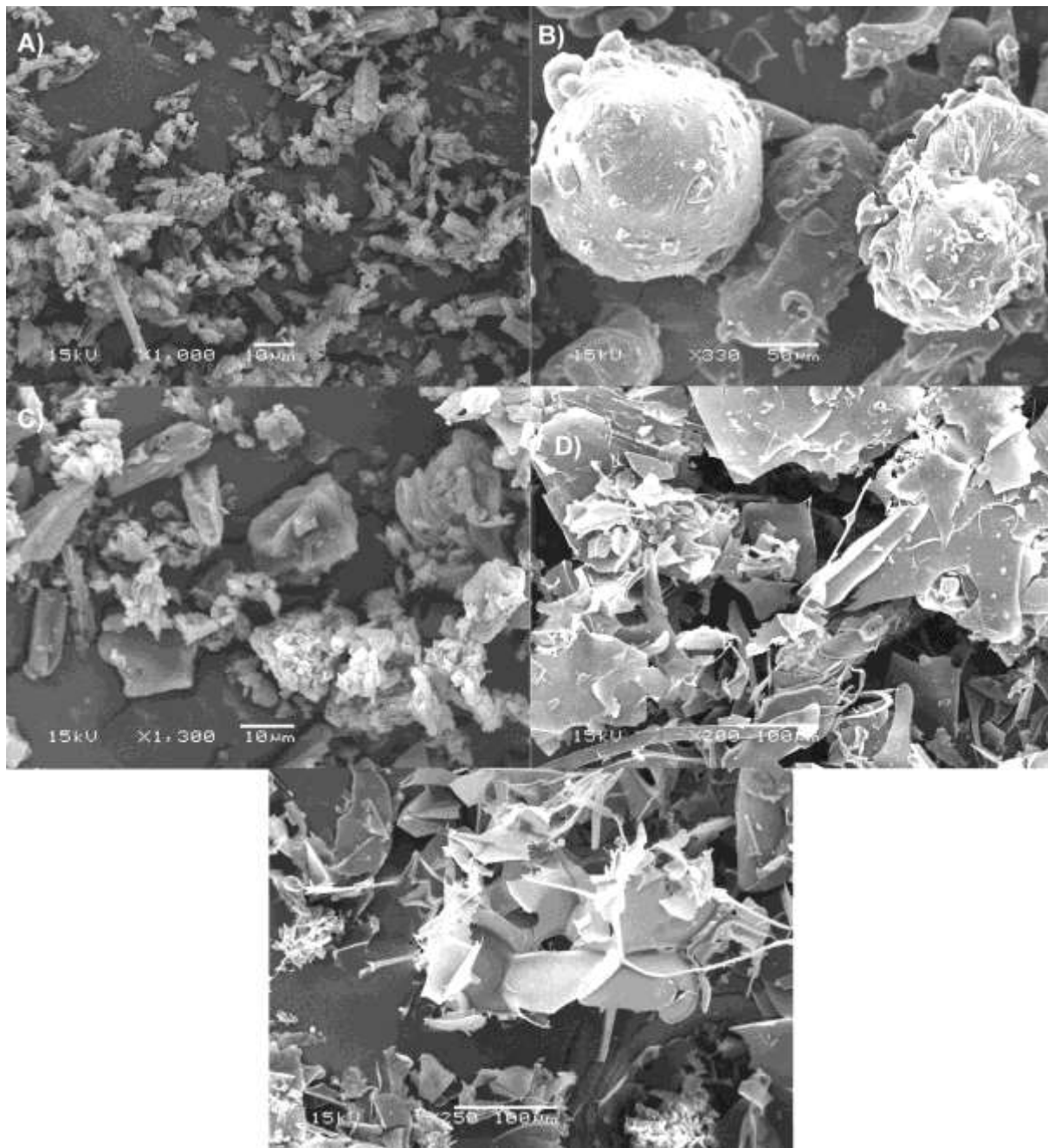


Fig. 8. Scanning electron microscopic (SEM) photomicrographs of a **A)** KPF, **B)** HP β CD, **C)** physical mixture, **D)** KPF/ HP β CD complex 2h and **E)** KPF/ HP β CD complex 24h

4. Conclusions

The data collected in this study reveal yet unexplored effects of KPF complexation with cyclodextrin and point to the promising use of this adjuvant. In addition to obtaining traditional inclusion and non-inclusion complexes that increase solubility, cyclodextrins served as generators and stabilizers of supersaturated solutions containing KPF. Supersaturated solutions have the advantage of greater solubilization of the drug in aqueous medium. However, high energy solutions, such as supersaturated solutions can be difficult to formulate as solid materials. The low content of KPF in the solid complexes obtained by freeze-drying raised difficulties to its characterization and impairs its use in solid oral dosage forms. Further studies are necessary to clarify the mechanisms by which CD generates supersaturated KPF solutions and to take benefit of this effect on KPF bioavailability.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (grant 17/2551-0001043-4). The authors would also like to thank CNPq and CAPES for their research fellowship.

References

Aly, U.F., 2017. Experimental , molecular docking investigations and bioavailability study on the inclusion complexes of finasteride and cyclodextrins 1681–1692.

Bergonzi, M.C., Bilia, A.R., Bari, D., Mazzi, G., Francesco, F., 2007. Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins 17, 5744–5748. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.08.067>

Brewster, M.E., Vandecruys, R., Peeters, J., Neeskens, P., Verreck, G., Loftsson, T., 2008. Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and

sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions 4, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.02.007>

Brewster, M.E., Vandecruys, R., Verreck, G., Peeters, J., Brewster, P.M., Sciences, P., Pharmaceutica, J., 2008. Supersaturating drug delivery systems: effect of hydrophilic cyclodextrins and other excipients on the formation and stabilization of supersaturated drug solutions 217–220. <https://doi.org/10.1691/ph.2008.7326>

Brouwers, J., Brewster, M.E., Augustijns, P., 2009. Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability? 98. <https://doi.org/10.1002/jps>

Calderón-Montaño, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., López-Lázaro, M., 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. Mini reviews in medicinal chemistry 11, 298–344. <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>

Colombo, M., Melchiades, G. de L., Figueiró, F., Battastini, A.M.O., Teixeira, H.F., Koester, L.S., 2017. Validation of an HPLC-UV method for analysis of Kaempferol-loaded nanoemulsion and its application to in vitro and in vivo tests. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 145, 831–837. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.046>

Crupi, V., Ficarra, R., Guardo, M., Majolino, D., Stancanelli, R., Venuti, V., 2007. UV – vis and FTIR – ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with β -cyclodextrins 44, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.01.054>

Dagny, T.L.Æ., 2007. The complexation efficiency 545–552. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9247-2>

Davis, M.E., Brewster, M.E., 2004. CYCLODEXTRIN-BASED PHARMACEUTICS: PAST, PRESENT AND FUTURE 3. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>

Doile, M.M., Fortunato, K.A., Schmücker, I.C., Schucko, S.K., Silva, M.A.S., 2008. Physicochemical Properties and Dissolution Studies of Dexamethasone Acetate- β -

Cyclodextrin Inclusion Complexes Produced by Different Methods 9, 314–321.
<https://doi.org/10.1208/s12249-008-9042-z>

Higuchi, T; Connors, K., 1965. Phase-Solubility Techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* 117–212.

Iervolino, M., Raghavan, S.L., Hadgraft, J., 2000. Membrane penetration enhancement of ibuprofen using supersaturation 198, 229–238.

Imran, M., Rauf, A., Shah, Z.A., Saeed, F., Imran, A., Arshad, M.U., Ahmad, B., Bawazeer, S., Atif, M., Peters, D.G., Mubarak, M.S., 2018. Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* 1–13. <https://doi.org/10.1002/ptr.6227>

Jansook, P., Ogawa, N., Loftsson, T., 2018. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 535, 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018>

Kratz, J.M., Teixeira, M.R., Ferronato, K., Teixeira, H.F., Koester, L.S., Simões, C.M.O., 2011. Preparation, Characterization, and In Vitro Intestinal Permeability Evaluation of Thalidomide – Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complexes *Research Article Preparation, Characterization, and In Vitro Intestinal Permeability Evaluation of Thalidomide – H.* <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9739-2>

Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., Järvinen, T., 2005. Cyclodextrins in drug delivery.

Park, S., 2016. Cyclic glucans enhance solubility of bioavailable flavonoids. *Molecules* 21, 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules21111556>

Pérez-abril, M., Lucas-abellán, C., Castillo-sánchez, J., Pérez-sánchez, H., Cerón-carrasco, J.P., Fortea, I., Gabaldón, J.A., Núñez-delicado, E., 2017. Systematic investigation and molecular modelling of complexation between several groups of flavonoids and HP- β -cyclodextrins 36, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.052>

Rajendran, P., Rengarajan, T., Nandakumar, N., Palaniswami, R., Nishigaki, Y., Nishigaki, I., 2014. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory

disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry* 86, 103–112.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.011>

Rewster, M.A.E.B., 1996. October 1996 *Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins* . 1 . Drug Solubilization and Stabilization 85, 1017–1025.

Strickley, R.G., 2004. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations 21.

Warren, D.B., Benameur, H., Porter, C.J.H., Pouton, C.W., 2010. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility 18, 704–731.
<https://doi.org/10.3109/1061186X.2010.525652>

Xu, J., Zhang, Y., Li, X., Zheng, Y., 2017. Inclusion complex of nateglinide with sulfobutyl ether β -cyclodextrin: Preparation, characterization and water solubility. *Journal of Molecular Structure* 1141, 328–334.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.03.116>

Xu, S., Dai, W., 2013. Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 453, 36–43.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.013>

Yatsu, F.K.J., Koester, L.S., Lula, I., Passos, J.J., Sinisterr, R., Bassani, V.L., 2013. Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction. *Carbohydrate Polymers* 98, 726–735.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.062>

You, G., Sun, L., Cao, X., Li, H., Wang, M., Liu, Y., Ren, X., 2018. LWT - Food Science and Technology Comprehensive evaluation of solubilization of flavonoids by various cyclodextrins using high performance liquid chromatography and chemometry. *LWT - Food Science and Technology* 94, 172–177.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.035>

Zhou, Q., Wei, X., Dou, W., Chou, G., Wang, Z., 2013. Preparation and characterization of inclusion complexes formed between baicalein and cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers* 95, 733–739. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.038>

DISCUSSÃO GERAL

Para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida se faz necessária a realização de um estudo de pré-formulação com o objetivo de avaliar se a molécula/fármaco é compatível com os excipientes farmacêuticos que serão utilizados.

As interações entre fármaco e excipientes farmacêuticos que provocam alterações nas propriedades químicas, físicas e terapêuticas da forma farmacêutica, são designadas como incompatibilidades (MONAJJEMZADEH et al., 2009; PEREIRA et al., 2014). Durante a formulação ou o armazenamento podem ocorrer interações que são normalmente classificadas como interações físicas ou químicas. Na interação física não ocorre qualquer reação química, mas há mudança nos parâmetros físico-químicos de ativos, como a taxa de dissolução, solubilidade, cristalização e biodisponibilidade (MONAJJEMZADEH et al., 2009; SOUZA et al., 2013).

As interações químicas que podem ocorrer entre o ativo e o excipiente podem levar a degradação e formação de novos produtos de degradação ou impurezas. Neste caso, existe uma incompatibilidade entre substâncias (SOUZA et al., 2013). A utilização de técnicas calorimétricas, como DSC e/ou TGA tem sido proposta como um método rápido para avaliar as interações físico-químicas entre os componentes de uma formulação através da comparação de curvas térmicas de substâncias puras com a curva obtida a partir de uma mistura física 1:1 (FULIAS et al., 2011).

Os resultados obtidos com as análises calorimétricas mostraram modificações nos termogramas das misturas binárias, sugerindo interações entre o KPF e os excipientes analisados, exceto a celulose microcristalina. Acredita-se que estes resultados possam ser atribuídos a situações como a alta temperatura atingida durante o experimento de análise térmica, onde o excipiente pode ter fundido, passando da sua forma sólida para sua forma líquida, de alguma forma influenciando positivamente na solubilidade do KPF que interferiu na leitura adequada pelo equipamento. Outra interferência para um resultado assertivo pode ter sido o tratamento da amostra.

WANG; JING, 2013 relatam que na maioria dos casos por eles estudados, a endoterma de fusão do fármaco foi bem preservada, com pequenas alterações em

termos de ampliação ou redução de temperatura, mas que estas alterações podem ocorrer devido à quantidade de material utilizado na mistura do fármaco e excipiente, o que diminui a pureza de cada componente na mistura, afetando a forma do pico e entalpia, e não necessariamente indicando uma potencial incompatibilidade.

No emprego da espectroscopia de infravermelho as bandas características do KPF foram preservados nas misturas, assim como na cromatografia líquida de alta eficiência. As análises de PCA e HCA mostraram ter grande relevância na interpretação final dos dados, uma vez que reduzem a dimensionalidade dos dados gerados pelo FTIR simplificando sua interpretação através de diagramas de similaridade.

Após a verificação da compatibilidade com excipientes farmacêuticos, avaliou-se o uso de estratégias tecnológicas objetivando aumentar a solubilidade aquosa do KPF, assim como sua biodisponibilidade oral. Para isso, optou-se pelo uso de ciclodextrinas através da formação de complexos entre estes compostos.

CD são adjuvantes farmacêuticos utilizados, principalmente, para melhora de biodisponibilidade de fármacos que apresentam baixa solubilidade, como fármacos das classes biofarmacêuticas II e IV (LOFTSSON; BREWSTER, 2012). Os dados em relação à baixa solubilidade do KPF na literatura são bem definidos, assim como sua biodisponibilidade, permitindo classificá-lo como classe II, baixa solubilidade e alta permeabilidade (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2011).

Foram conduzidos os experimentos de avaliação da solubilidade em diferentes tempos de análise, a fim de observar o comportamento do KPF em cada tempo com cada ciclodextrina, β CD e HP β CD (HIGUCHI, T; CONNORS, 1965; MERCADER-ROS et al., 2010; PÉREZ-ABRIL et al., 2017). Os resultados dos diagramas de solubilidade com ambas ciclodextrinas, β CD e HP β CD, demonstraram que além de aumentar a concentração de KPF solubilizado no meio aquoso, houve a geração de uma solução supersaturada.

As ciclodextrinas, como HP β CD, são bem conhecidas pela sua capacidade de solubilização, pelo seu amplo uso em formulações para melhorar a biodisponibilidade oral e pela sua capacidade de formar complexos de inclusão com

uma grande variedade de fármacos hidrofóbicos, aumentando assim a sua solubilidade (LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

Desenvolver formulações que contenham compostos fracamente solúveis em água ainda são um grande desafio pela sua baixa solubilidade intrínseca e má absorção oral. Dentre as várias estratégias que podem ser exploradas para melhorar a solubilidade e a absorção oral, o uso de formulações supersaturadas tem demonstrado ser uma abordagem eficaz (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; XU; DAI, 2013).

Altas concentrações de fármacos no lúmen intestinal levam a um aumento na absorção oral. Entretanto, como os fármacos em altas concentrações são termodinamicamente instáveis, eles tendem a precipitar rapidamente antes de serem absorvidos, resultando em uma biodisponibilidade comprometida. Desta forma, ao planejar formulações supersaturadas, é essencial a manutenção dos fármacos em altas concentrações, ou seja, em concentrações supersaturadas, evitando a precipitação antes da absorção (XU; DAI, 2013). Para obter esta manutenção do estado supersaturado, inibidores de precipitação têm sido amplamente explorados para manter o fármaco no estado de supersaturação (WARREN et al., 2010). Os inibidores de precipitação podem, por definição, inibir ou retardar a precipitação do fármaco por um período de tempo, permitindo absorção suficiente para aumentar a biodisponibilidade oral.

A supersaturação deve ser gerada e mantida para que os fármacos sejam absorvidos no período de tempo desejado. O desempenho da formulação depende de muitos fatores, incluindo as técnicas de processamento utilizadas, propriedades físico-químicas do composto e tendência a formar e manter uma solução supersaturada. O conceito de geração e manutenção de um estado supersaturado é comumente descrito pela teoria “Spring and Parachute” (GUZMA et al., 2007).

“Spring” é a denominação para a geração de uma solução termodinamicamente instável e supersaturada de um fármaco gerada, normalmente, a partir de uma forma de energia mais alta do fármaco (“uma mola”). As formulações que podem induzir a geração de soluções supersaturadas são normalmente divididas em duas categorias: (1) solução altamente concentrada e (2) formas

sólidas de alta energia e/ou rápida dissolução devido à mudanças na morfologia, granulometria e/ou molhabilidade (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; XU; DAI, 2013). “Parachute” ou “Paraquedas” é o efeito causado pelos inibidores de precipitação, que atuam na inibição temporária da precipitação do fármaco. É com o uso desses inibidores de precipitação que se beneficia do estado supersaturado para aumentar a absorção de fármaco mantendo o mesmo em alta concentração por um longo período de tempo (WARREN et al., 2010). Na figura 1 estão representados esquemas da teoria do efeito de “mola e paraquedas” (“spring” e “parachute”).

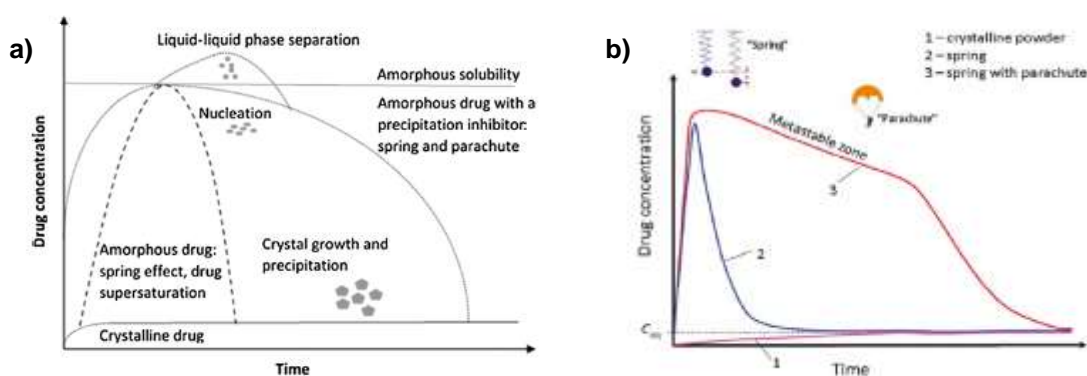


Fig. 1 a) Esquema de um perfil de dissolução hipotético de um fármaco nos seus estados cristalino e amorfo com rápido aumento da concentração acima da solubilidade de equilíbrio da respectiva forma cristalina (“mola”), e formação relativamente rápida de núcleos de cristais, precipitação e concentrações de fármaco revertendo de volta ao nível de solubilidade cristalina. Para o caso de “mola” e “paraquedas”, um inibidor de precipitação atrasa efetivamente a nucleação e o crescimento de cristais e permite que o estado supersaturado prevaleça por mais tempo. Se a cinética da cristalização for lenta em relação ao processo de dissolução, a concentração do fármaco pode exceder a sua solubilidade amorfa e passar por uma separação de fase líquido-líquido e subsequente cristalização. **b)** Representação esquemática do conceito de mola e paraquedas. (1) A forma estável cristalina tem baixa solubilidade. (2) Uma espécie metaestável de vida curta (fase amorfa) apresenta alta solubilidade, mas cai rapidamente para a baixa solubilidade da forma cristalina. (3) As formas de fármaco altamente solúveis são mantidas por um tempo suficientemente longo (geralmente horas) na zona metaestável. Modificado de:(BAVISHI; BORKHATARIA, 2016; LAITINEN et al., 2017).

Diversos exemplos de inibidores de precipitação são relatados. Dentre eles estão os polímeros (HPMC, PVP), surfactantes (Polissorbato 20, Cremophor®) e as ciclodextrinas, principalmente as derivadas HPβCD e SBEβCD.

Recentes publicações têm reportado a capacidade das ciclodextrinas de estabilizar soluções supersaturadas de fármacos, além de melhorar a solubilidade (IERVOLINO; RAGHAVAN; HADGRAFT, 2000; LOFTSSON; BREWSTER, 2012). BREWSTER et al. (2008) confirmou que HPβCD e SBEβCD tinham a capacidade de

estabilizar as soluções supersaturadas de itraconazol, inibindo a nucleação e retardando o crescimento dos cristais. Na presença de HP β CD e SBE β CD o estado supersaturado foi mantido por pelo menos 2 h, demonstrando claramente que as ciclodextrinas atuaram como “mola” e “paraquedas”.

Ainda não há uma clara definição de como estes sistemas funcionam. Existem relatos na literatura de variadas hipóteses. LOFTSSON; VOGENSEN; BREWSTER, 2007 sugerem cineticamente, podem interagir com o cristal em crescimento via ligação de hidrogênio para sítios associados com o cristal. O acúmulo de ciclodextrina na camada de água estagnada pode resultar em aumento da viscosidade e resistência à difusão. Além disso, as ciclodextrinas podem aumentar a natureza coesiva da água, o que pode afetar o tempo de indução e a nucleação, levando a soluções supersaturadas estabilizadas sem a precipitação do fármaco. Aumentos similares de solubilidade e estabilização de supersaturação, inibição de precipitação, proporcionados pelo uso de HP β CD também foram observados para uma formulação de Ricobendazole injetável (WU et al., 2010).

Brewster et al., 2008 sugere que o mecanismo para a inibição da nucleação e crescimento de cristais observado no caso de polímeros farmacêuticos também pode ser aplicado às ciclodextrinas hidrofílicas. Elas podem solubilizar o fármaco por formação de complexos de inclusão com possível contribuição de mecanismos de não inclusão. Isto aumenta o potencial químico do fármaco em solução, aumenta a solubilidade de saturação aparente e diminui a extensão da supersaturação. Entretanto, este efeito por si só não parece ser capaz de explicar o efeito na solução supersaturada formada com base na magnitude das mudanças medidas na solubilidade aparente.

IERVOLINO; RAGHAVAN; HADGRAFT, 2000 sugeriram que a interação do ibuprofeno com a HP β CD altera a zona metaestável em função da interação fármaco-CD e solubilização. As CDs também podem interagir com o cristal em crescimento de uma maneira análoga ao HPMC com ligações de H a locais associados ao crescimento de cristais, bem como o acúmulo na camada de água estagnada resultando em aumento da resistência à difusão secundária à viscosidade ou mesmo na capacidade da CD complexar monômeros de fármacos inibindo uma eficiente transferência de massa na interface.

Por meio do diagrama de solubilidade é possível observar que a ciclodextrina em contato com o KPF gerou e manteve, por aproximadamente 12 horas, uma solução em estado de supersaturação. Ou seja, atuou como “mola e paraquedas”. Os resultados da caracterização dos complexos foi inconclusiva, provavelmente devido ao baixo teor de KPF presente nos complexos sólidos, de modo que não foi possível aferir o modo como o KPF e a HP β CD estão complexados ou interagindo no meio líquido e no pó obtido após liofilização.

Estes resultados inéditos para o kaempferol e mesmo para outros flavonoides que já tiveram sua complexação com ciclodextrinas estudada (REFS) se mostraram muito interessantes e deverão ser objeto de mais estudos na perspectiva de se obter formas farmacêuticas sólidas com maior biodisponibilidade para o KPF.

CONCLUSÕES GERAIS

- ↪ O KPF mostrou-se compatível com todos os excipientes utilizados, após análise conjunta dos resultados de todas as técnicas utilizadas, mostrando a importância da associação de técnicas em um estudo de pré-formulação;
- ↪ O KPF, pelo diagrama de solubilidade de fase apresentado para as duas CD foi do tipo AL, no qual o aumento da concentração de CD aumenta a solubilidade do KPF;
- ↪ Um estado de supersaturação da solução aquosa de ciclodextrina com KPF foi observado, proporcionando altas concentrações de KPF disponíveis rapidamente e mantidas por um longo período de tempo, aproximadamente 12 horas;
- ↪ A partir dos resultados do diagrama de solubilidade de fases observou-se o efeito de “mola e paraquedas”, gerando e mantendo o estado supersaturado, ou seja, mantendo altas concentrações do KPF inibindo sua precipitação rapidamente;
- ↪ A caracterização dos complexos obtidos não levou a resultados conclusivos sobre a forma com que ocorre a interação do KPF e a ciclodextrina, não sendo possível afirmar a obtenção de complexos de inclusão, não inclusão ou a ocorrência de ambos;
- ↪ O teor de KPF nos complexos em estado sólidos foi bastante reduzido e compromete a utilização desse material na produção de formas sólidas derivadas, tais como cápsulas ou comprimidos.

PERSPECTIVAS

- ↪ Avaliar a complexação em meio líquido utilizando diferentes técnicas como (Bandur et al., 2012).

- ↪ Avaliar a utilização de outros métodos de complexação ou de obtenção do complexo em estado sólido e da manutenção do efeito *parachute* para o KPF;

- ↪ Avaliar a dissolução do KPF a partir dos complexos obtidos em estado sólido em diferentes meios de dissolução;

- ↪ Produzir e caracterizar comprimidos contendo o complexo KPF:CD selecionado.

REFERÊNCIAS

Bandur, G.N., Isengard, H., Ha, D.I., 2012. Water content of flavonoid / cyclodextrin nanoparticles: Relationship with the structural descriptors of biologically active compounds 132, 1651–1659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.004>

Bavishi, D.D., Borkhataria, C.H., 2016. Spring and parachute: How cocrystals enhance solubility. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 62, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2016.07.001>

Brewster, M.E., Vandecruys, R., Verreck, G., Peeters, J., Brewster, P.M., Sciences, P., Pharmaceutica, J., 2008. Supersaturating drug delivery systems: effect of hydrophilic cyclodextrins and other excipients on the formation and stabilization of supersaturated drug solutions 217–220. <https://doi.org/10.1691/ph.2008.7326>

Brouwers, J., Brewster, M.E., Augustijns, P., 2009. Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability? 98. <https://doi.org/10.1002/jps>

Calderón-Montaño, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., López-Lázaro, M., 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry* 11, 298–344. <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>

Fulias, A., Bandur, G., Marian, E., Tit, D., 2011. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms Bogdan Tit. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.05.017>

Guzma, C.R., Gardner, C.R., Chen, H., Moreau, Jean-pierre, Tawa, M., Zhang, Z., Ratanabanangkoon, P., Shaw, P., 2007. Combined Use of Crystalline Salt Forms and Precipitation Inhibitors to Improve Oral Absorption of Celecoxib from Solid Oral Formulations 96, 2686–2702. <https://doi.org/10.1002/jps>

Higuchi, T; Connors, K., 1965. Phase-Solubility Techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* 117–212.

Iervolino, M., Raghavan, S.L., Hadgraft, J., 2000. Membrane penetration

enhancement of ibuprofen using supersaturation 198, 229–238.

Laitinen, R., Löbmann, K., Grohganz, H., Priemel, P., Strachan, C.J., Rades, T., 2017. Supersaturating drug delivery systems : The potential of co-amorphous drug formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 532, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.123>

Loftsson, T., Brewster, M.E., 2012. Cyclodextrins as Functional Excipients : Methods to Enhance Complexation Efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101, 3019–3032. <https://doi.org/10.1002/jps.23077>

Loftsson, T., Vogensen, S.B., Brewster, M.E., 2007. Effects of Cyclodextrins on Drug Delivery Through Biological Membranes 96, 2532–2546. <https://doi.org/10.1002/jps>

Mercader-Ros, M.T., Lucas-Abellán, C., Gabaldón, J.A., Fortea, M.I., Martínez-Cachá, A., Núñez-Delicado, E., 2010. Kaempferol complexation in cyclodextrins at basic pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4675–4680. <https://doi.org/10.1021/jf904218j>

Monajjemzadeh, F., Hassanzadeh, D., Valizadeh, H., Siahi-shadbad, M.R., Shahbazi, J., Robertson, T.A., Roberts, M.S., 2009. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 73, 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.06.012>

Pereira, M.A. V, Fonseca, G.D., Barbosa, E.G., Gomes, A.P.B., 2014. Compatibility study between chitosan and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 1091–1100. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-3769-4>

Pérez-abril, M., Lucas-abellán, C., Castillo-sánchez, J., Pérez-sánchez, H., Cerón-carrasco, J.P., Fortea, I., Gabaldón, J.A., Núñez-delicado, E., 2017. Systematic investigation and molecular modelling of complexation between several groups of flavonoids and HP- β -cyclodextrins 36, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.052>

Souza, J., Daniel, P., Pianna, I., Lopes, L., Trevisan, M.G., Simone, J., 2013. Risperidone – Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using

thermal and non-thermal techniques. *Thermochimica Acta* 568, 148–155.

Wang, Y., Jing, Y.L., 2013. Selection of excipients for dispersible tablets of itraconazole through the application of thermal techniques and Raman spectroscopy. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3330-x>

Warren, D.B., Benameur, H., Porter, C.J.H., Pouton, C.W., 2010. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility 18, 704–731. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2010.525652>

Wu, Z., Tucker, I.G., Razzak, M., Yang, L., Mcsporrán, K., Medicott, N.J., 2010. Absorption and tissue tolerance of ricobendazole in the presence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin following subcutaneous injection in sheep. *International Journal of Pharmaceutics* 397, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.002>

Xu, S., Dai, W., 2013. Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 453, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.013>

