

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-excipientes.....	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 DSC 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 qualitative 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-exciipient 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>	68
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 ao 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 desenvolvimento 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 aliada 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).

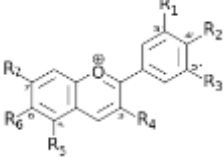
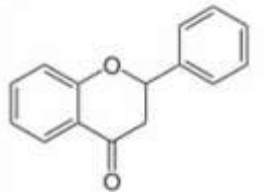
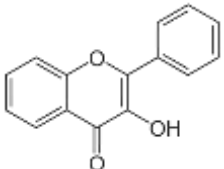
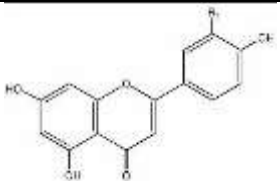
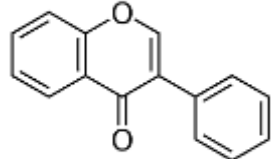
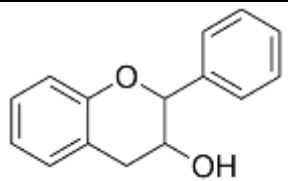
Sua estrutura molecular é caracterizada por um anel heterocíclico com um substituinte fenil em C-2, que é denominado fenilbenzopirona ou difenilpropano, com fórmula molecular (C₆-C₃-C₆) (FANG et al., 2017; PARK, 2016). Os flavonoides normalmente são divididos em várias subclasses, de acordo com os substituintes 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-(4hydroxyphenyl)-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).

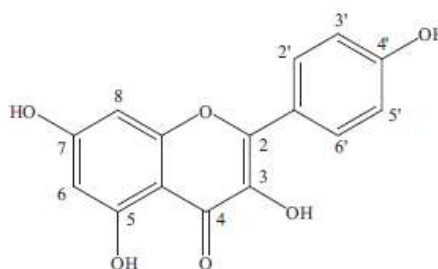


Figura 1. Estrutura Química do Kaempferol

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.

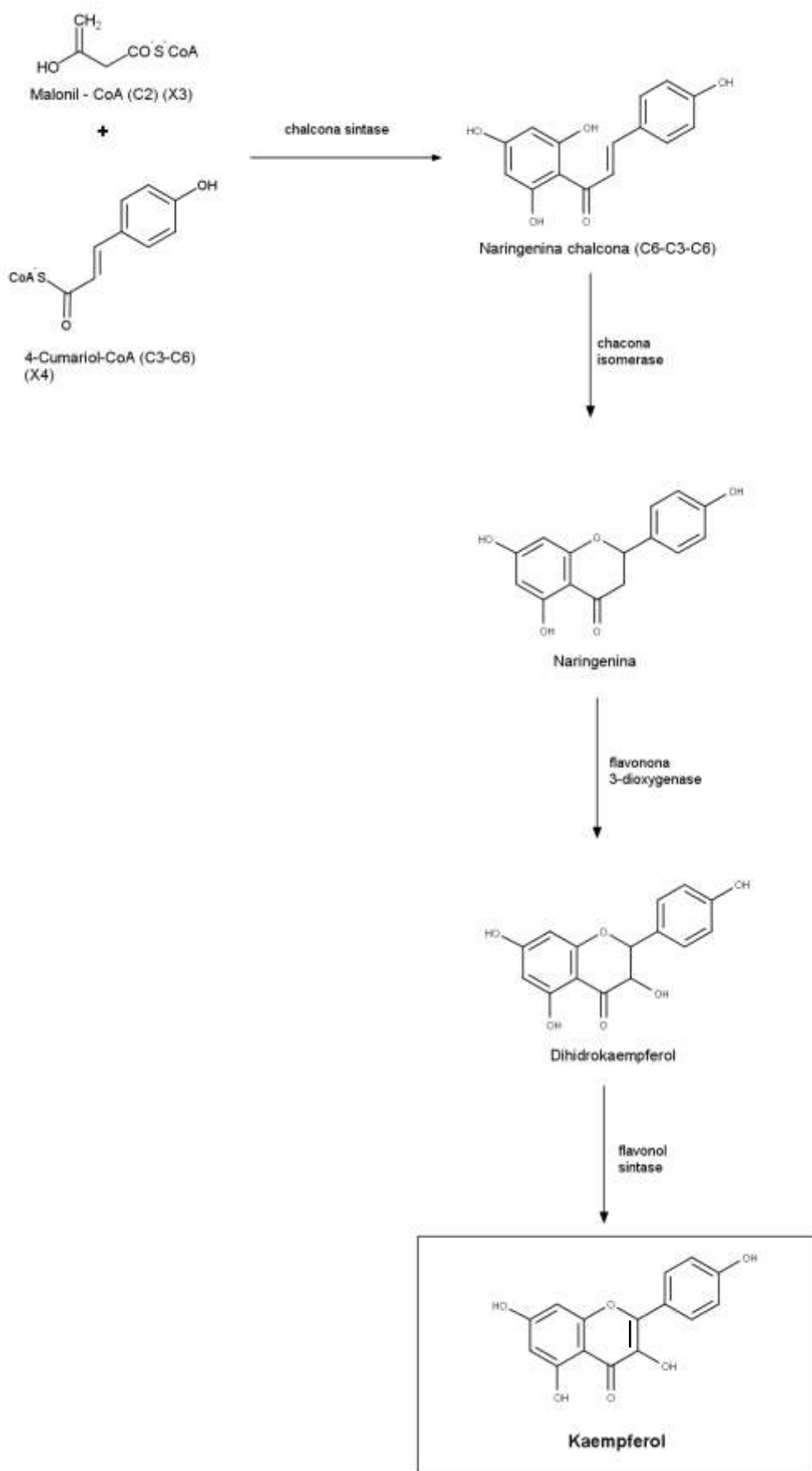


Figura 2. Rota biossintética do Kaempferol. (Figura elaborada no Software MarvinSketch®)

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-glicosídeo, 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 (TRIVEDI et al., 2008; IMRAN et al., 2011; NIESTROY et al., 2011; CHEN; CHEN, 2013; CORINA et al., 2017).

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 e 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 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 alta 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). O KPF é classificado como classe II pela Classificação Biofarmacêutica (SCB), pois apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade. 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 o princípio ativo. 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).

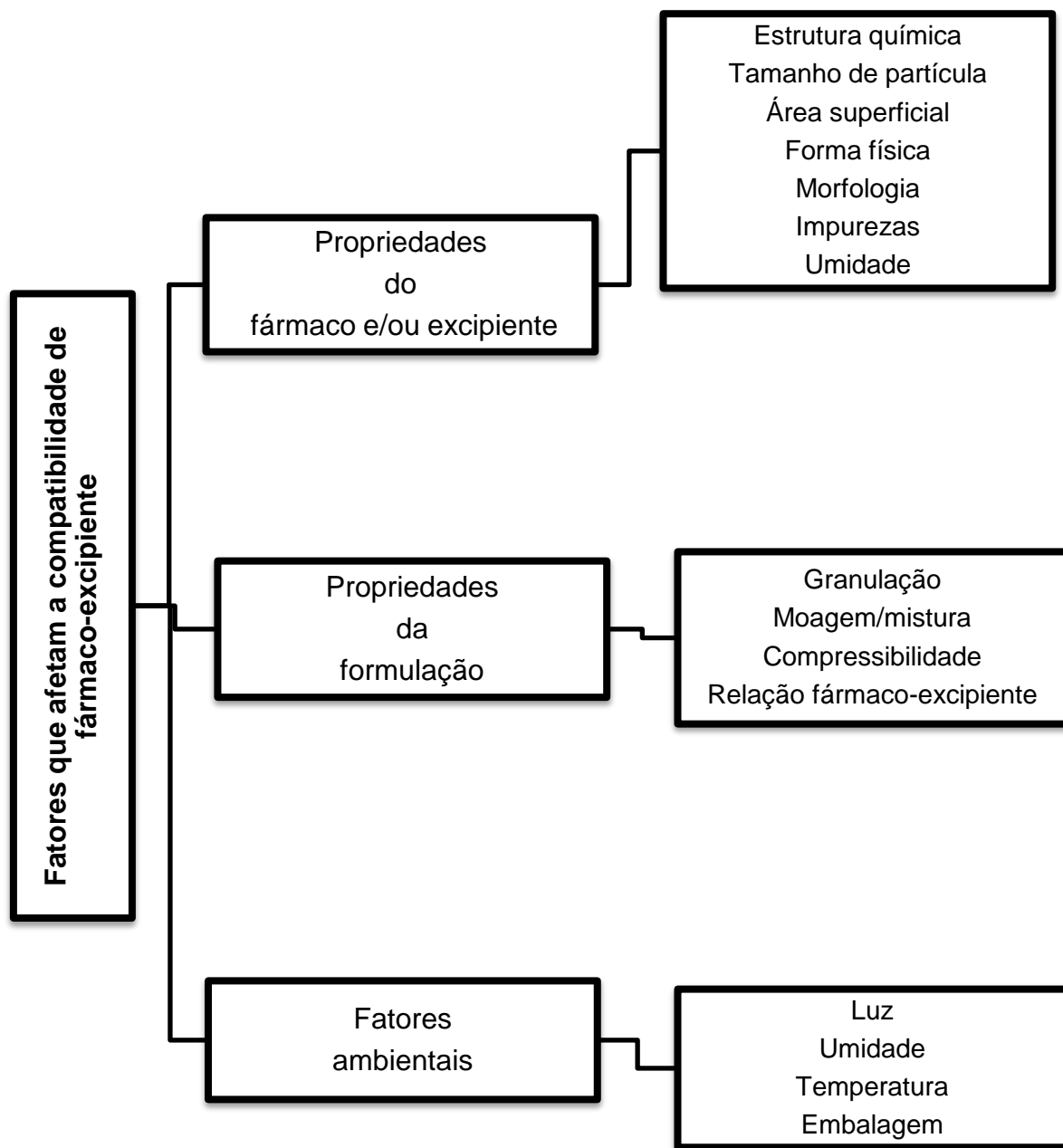


Figura 3. Esquema descritivo dos fatores que afetam a compatibilidade fármaco excipiente (adaptado de SCHMITT et al., 2001).

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).

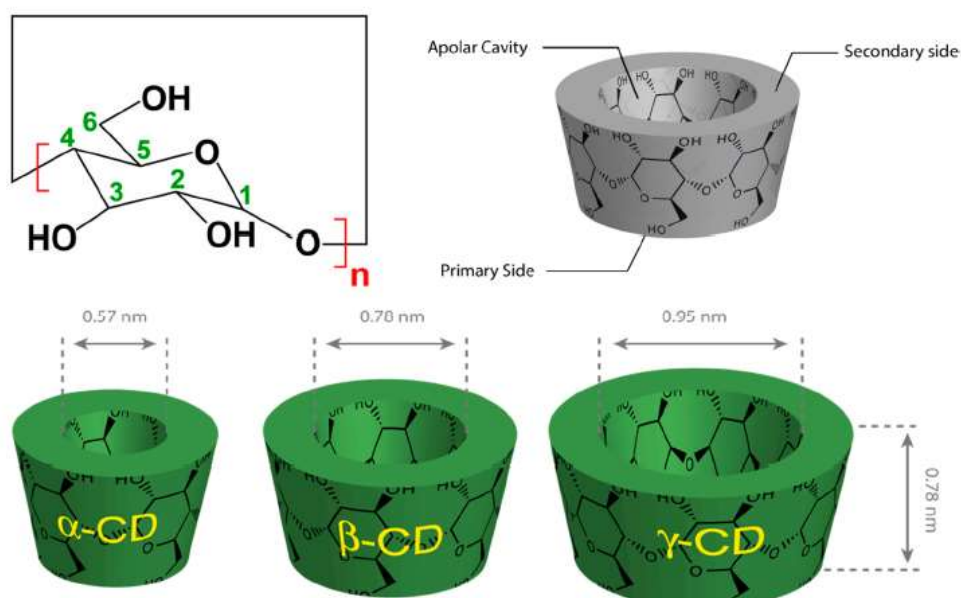


Figura 4. Estrutura da α CD, β CD e γ CD, respectivamente. Adaptado de CRINI, 2014

A estrutura das ciclodextrinas apresenta 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 ligações 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).

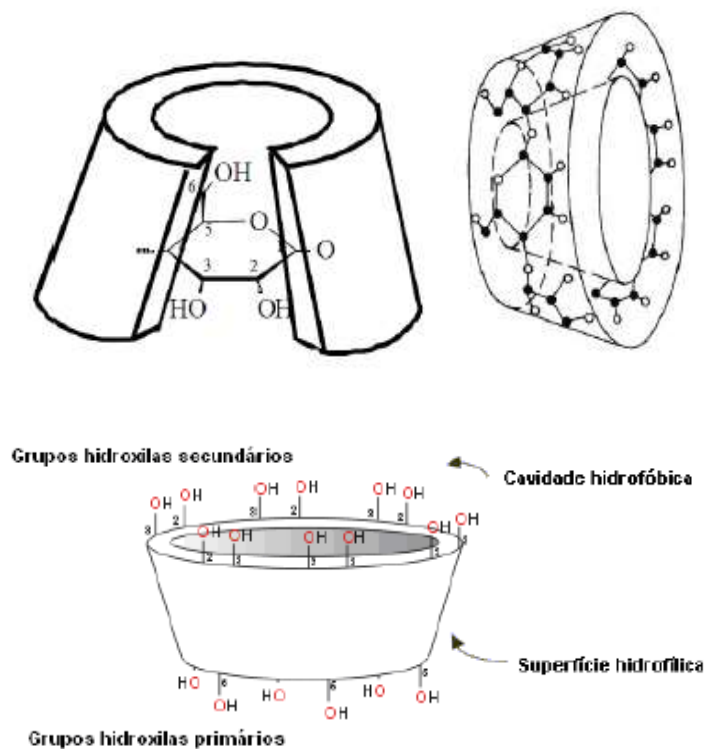


Figura 5. Esquema da disposição das hidroxilas na estrutura da CD

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, anfílicos 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 CD 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 Farmaceuticas Basica 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-KB via Nuclear Factor-Inducing Kinase / IKB 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

O texto completo do capítulo 2, que no texto da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 61 – 86, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Neste 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.

Capítulo III

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

Artigo a ser submetido a periódico de circulação internacional

O texto completo do capítulo 3, que no texto da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 89 – 113, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. 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.

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”).

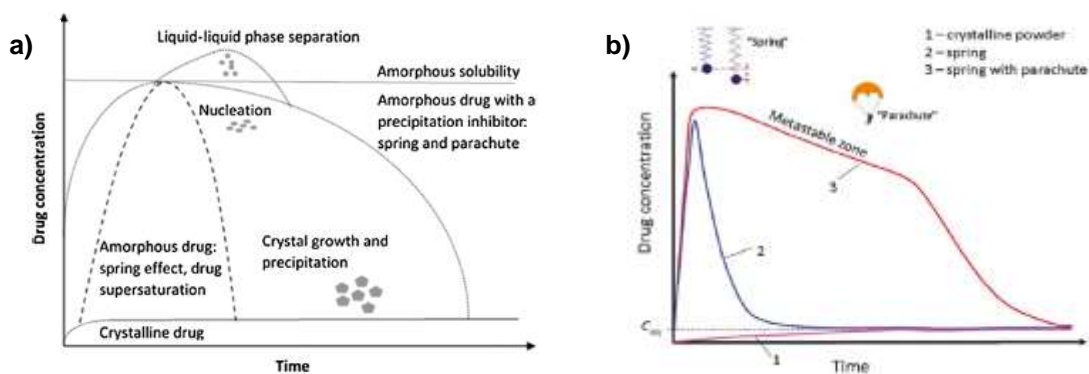


Fig. 1 a) Esquema de um perfil de dissolução hipotético de um fármaco nos seus estados cristalino e amorfo com rápido aumento da concentração acima da solubilidade de equilíbrio da respectiva forma cristalina (“mola”), e formação relativamente rápida de núcleos de cristais, precipitação e concentrações 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 HP β CD e SBE β CD.

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 HP β CD e SBE β CD 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-Montaña, 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>

