

## AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE PRODUTOS NATURAIS EM MEIOS BIOMIMÉTICOS

Vitor Carreira Gaiola (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Victor Nery Machado Lippa, Vinicius Bittencourt Bellia, Luiz Regis Prado Junior, Edilainy Rizzieri Caleffi Marchesini, Fernanda Belincanta Borghi Pangoni, Andrea Diniz (Orientadora), e-mail: [ra106957@uem.br](mailto:ra106957@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

**Área e sub-área do conhecimento (CNPq/CAPES):** Ciências da Saúde/ Farmácia/ Farmacognosia

**Palavras-chave:** Flavonoides, validação analítica, meios biorrelevantes

### Resumo

Este projeto tem como finalidade avaliar a solubilidade aquosa em meios farmacopeicos e biomiméticos dos flavonoides crisina, baicaleína, epicatequina e naringenina. A solubilidade foi precedida da validação de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A validação foi executada de acordo com parâmetros estabelecidos na RDC 166/2017. O ensaio de solubilidade foi realizado utilizando os meios: tampão fosfato (pH 6,8), solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1M (pH 1,2), fluido intestinal simulado em jejum pH 6,5 (FaSSIF) e fluido gástrico simulado em jejum pH 1,6 (FaSSGF). Os resultados para a solubilidade em equilíbrio da epicatequina mostraram ser, em média, 6,71 mg/mL. O flavonoide naringenina apresentou valor de 1,29 mg/mL em tampão fosfato e 0,31 mg/mL em FaSSIF. A crisina e a baicaleína mostraram valores de solubilidade próximo a zero na faixa de pH fisiológico (1,2-6,8). Os dados mostraram divergência entre valores de solubilidade teórica e experimental, indicando a necessidade de realização de experimentos para determinação mais acurada desse parâmetro.

### Introdução

O estudo do perfil da solubilidade aquosa em equilíbrio de moléculas bioativas é de grande relevância biofarmacêutica, por ser um elemento chave na determinação da biodisponibilidade de novos fármacos com isso pode-se ter uma previsão do perfil farmacocinético e conseqüentemente um desenvolvimento de medicamento mais eficaz (PAOLINI, G.V. et al 2006).

A solubilidade dos princípios ativos é uma das principais características na formulação de novos fármacos, sendo importante para estimar a biodisponibilidade e conseqüentemente a atividade biológica no organismo humano. Os flavonoides como crisina, baicaleína, naringenina e epicatequina são exemplos de moléculas bioativas presentes em muitos produtos de origem vegetal, como os medicamentos

fitoterápicos. Sendo assim, o objetivo desse projeto foi determinar a solubilidade aquosa desses flavonoides.

## Materiais e Métodos

Foram utilizados padrões analíticos das substâncias: crisina, baicaleína, naringenina e epicatequina. Todos os produtos químicos para preparação de meios e análise foram de grau analítico adquiridos comercialmente. Os tampões fisiológicos: solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M pH 1,2 e tampão fosfato de potássio monobásico pH 6,8 foram preparados de acordo com a farmacopeia brasileira. Os meios biorrelevantes: FaSSGF-V2 e FaSSIF-V2 foram preparados de acordo com a literatura com Jantratid et al. (2008).

O método analítico para a quantificação dos flavonoides foi desenvolvido utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu CBM-20A) com detector UV/VIS. Foi empregada coluna Inertsil® ODS-2 250 x 4,6 mm, 5 µm como fase estacionária. O fluxo foi ajustado em 1,00 mL/min e empregado volume de injeção de 20 µL com um injetor manual. Para validar tal método, os parâmetros adotados foram: exatidão, robustez, precisão e linearidade (ANVISA, 2017). Os parâmetros individuais da análise de cada flavonoide estão dispostos na tabela 1.

**Tabela 1-** Parâmetros cromatográficos para quantificação dos flavonoides crisina, baicaleína, naringenina e epicatequina por HPLC – UV/VIS

Flavonoide	Fase móvel (v:v)	Temperatura da coluna (°C)	Comprimento de onda (nm)
Crisina	Metanol: Água (90:10)	35	270
Baicaleína	Solução de Acetonitrila: Ácido Fosfórico 0,1% (70:30)	40	275
Naringenina	Metanol: Água (70:30)	36	280
Epicatequina	Solução de Acetonitrila: Ácido Fosfórico 1,0% (70:30)	30	280

Para linearidade foram analisadas curvas de calibração que foram aceitas com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e de correlação maiores que 0,99. Para exatidão as amostras foram analisadas em triplicata empregando 3 concentrações conhecidas diferentes das utilizadas na linearidade, e foram aceitas recuperações entre 95 a 105%. Para a precisão, as amostras foram preparadas seguindo o mesmo protocolo usado para a exatidão. O método foi considerado preciso quando os parâmetros indicaram variações menores que 5%. Para robustez, foram avaliados composição de fase móvel, temperatura da coluna, comprimento de onda e fluxo de fase móvel, e o critério de aceitação foi de variações abaixo de 5%.

Os ensaios de solubilidade foram feitos pelo método de *Shake-Flask* sob agitação orbital a 250 rpm por 24 horas a 37°. As amostras foram preparadas em triplicata com excesso de 30% do valor teórico da solubilidade em equilíbrio para cada condição. Após o período determinado, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, o líquido sobrenadante foi coletado e as análises seguiram com amostra

livre de precipitados que foi injetada e analisada pelo respectivo método previamente validado.

## Resultados e Discussão

Os resultados de linearidade, precisão e exatidão para os métodos de quantificação dos quatro flavonoides foram validados e se apresentaram dentro do intervalo de aceitação. As faixas de trabalho adotadas para os flavonoides foram: a) crisina - de 2,5 a 50 µg/mL, b) baicaleína - 10 a 150 µg/mL, c) naringenina - 20 a 80 µg/mL e, d) epicatequina - 20 a 90 µg/mL. Todos os métodos foram considerados lineares com valores de  $R > 0,99$ .

A exatidão dos métodos foi avaliada por meio da recuperação e os resultados (média  $\pm$  desvio padrão) se encontram adequados e dentro do intervalo de 95 a 105%. Por fim, tanto para precisão intradia quanto para interdia, o coeficiente de variação (CV%) foi  $< 5\%$ , para todos os flavonoides testados. A robustez dos métodos mostrou que as alterações testadas impactam na resposta do método analítico.

Com os métodos analíticos validados, foi realizado o ensaio de solubilidade e os resultados obtidos estão descritos na tabela 2.

Os valores de solubilidade teórica da baicaleína ficam entre 0,14 e 0,18 mg/mL (Chemicalize), na faixa de pH fisiológico de 0 a 7,4. Os dados mostraram que a solubilidade experimental da baicaleína é menor do que o valor do limite de quantificação do método analítico (LQ) e por isso não foi quantificado, sugerindo que a solubilidade aquosa, independentemente do pH, seja cerca de 100 vezes menor do que a teórica.

A crisina possui solubilidade teórica ainda menor, entre 0,05 e 0,07 mg/mL (Chemicalize) da faixa de pH fisiológica. Não foi possível quantificar a crisina pois as concentrações estavam abaixo do LQ, assim como ocorreu para a baicaleína. Os dados mostram que a solubilidade experimental pode ser cerca de 10 vezes menor do que a teórica.

Para a naringenina, verificou-se que em meios ácidos, ela não foi detectada pelo método analítico. Considerando o pKa da naringenina (7,86), sabe-se que a microespécie preponderante nesses valores de pH é a molecular (não-ionizada), indicando baixa possibilidade de dissolução aquosa. Os valores teóricos de solubilidade em pH 1,7 foram descritos como sendo 0,58 mg/mL (Chemicalize), porém, assumindo que o LQ foi 0,02 mg/mL e mesmo assim não foi detectada, assume-se que a solubilidade aquosa em pH ácido seja menor do que a solubilidade teórica. Para os meios com pH mais altos a estimativa da solubilidade teórica é de 0,61 mg/mL para pH 6,5 (Chemicalize). Os valores de solubilidade experimental mostraram que os valores foram muito maiores para tampão fosfato (pH 6,8) (1,29 mg/mL) e menores para FASSIF (pH 6,5) (0,31 mg/mL). Portanto, a composição do ambiente aquoso e o valor do pH geraram resultados de solubilidade bastante distintos.

**Tabela 2-** Dados de solubilidade aquosa para os flavonoides crisina, baicaleína, naringenina e epicatequina em meios farmacopeicos e biomiméticos.

Flavonoide	MEIOS FARMACOPEICOS		MEIOS BIOMIMÉTICOS	
	Tampão fosfato pH 6,8 (mg/mL)	HCl 0,1M pH 1,2 (mg/mL)	FaSSIF pH 6,5 (mg/mL)	FaSSGF pH 1,6 (mg/mL)
<b>crisina</b>	<0,0025	<0,0025	<0,0025	<0,0025
<b>baicaleína</b>	<0,0010	<0,0010	<0,0010	<0,0010
<b>naringenina</b>	1,29±10,98	<0,0020	0,31±114,65	<0,0020
<b>epicatequina</b>	6,81±0,07	6,74±0,32	6,51±0,05	6,77±0,40

A epicatequina tem valor do pKa de 9,04 (Chemicalize) e a estimativa é que na faixa de valores de pH fisiológico, a microespécie não ionizada esteja presente em quantidade maior que 98%, portanto, não haja ionização ao longo das mudanças fisiológicas. Com isso, a pouca diferença entre os valores de solubilidade em cada meio testado era esperado. A solubilidade teórica mostra valores de 5,59 mg/mL para pH de 1,7 e 5,72 para pH de 7,4. Os valores experimentais mostraram-se maiores do que os teóricos, mas bastante próximos, sendo, em média 6,51 mg/mL para FaSSIF e 6,81 mg/mL para tampão fosfato.

O conhecimento da característica de solubilidade desses compostos é importante, visto que os flavonoides têm potencial bioativo, sendo alvos de estudo no desenvolvimento de fármacos.

## Conclusões

Os dados sugeriram que a solubilidade experimental divergiu significativamente da teórica para a maioria dos flavonoides testados, indicando a necessidade de se avaliar experimentalmente a solubilidade aquosa.

## Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária pelo financiamento das bolsas PIBIC, ao CAPES, a UEM, ao Laboratório PKBio ao Prof. Dr. João Palazzo de Mello.

## Referências

ANVISA - RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017

CHEMICALIZE foi usado para para predição de propriedades da baicaleína, crisina, epicatequina, naringenina. Agosto, 2022. <https://chemicalize.com/>, developed by ChemAxon

PAOLINI, G.V. et al. Nature Biotechnology, v. 24: 805-815, 2016.

31º Encontro Anual de Iniciação Científica  
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de  
**2022**

JANTRATID, E. et al. Pharm Res. v.25(7):1663-76, 2008.