

# Desenvolvimento e Validação de Método Espectrofotométrico para Determinação de Hesperidina Livre em Dispersão Coloidal de Nanopartículas de Gliadina Revestidas com Quitosana

## Development and Validation of a Spectrophotometric Method for the Determination of Free Hesperidin in Colloidal Dispersion of Gliadin Nanoparticles Coated with Chitosan

Irineo Kelte Filho,<sup>a,\*</sup> Chalder N. Nunes,<sup>a</sup> Sueli P. Quináia,<sup>a</sup> Rubiana Mara Mainardes<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual do Centro-Oeste, Departamento de Química, Campus CEDETEG, CEP 85040-167, Guarapuava-PR, Brasil

\*E-mail: [irineokeltefilho@gmail.com](mailto:irineokeltefilho@gmail.com)

Recebido em: 18 de Julho de 2021

Aceito em: 24 de Setembro de 2021

Publicado online: 23 de Março de 2022

Hesperidin is one of the main flavonoids present in citrus fruits. This compound has several beneficial properties, including antitumor properties. However, hesperidin is rapidly hydrolyzed and one of the ways to protect this compound is its nanoencapsulation. One of the parameters evaluated in the development of nanoencapsulated drugs is the encapsulation efficiency and this can be determined by quantifying the content of the unencapsulated compound. Usually, chromatographic methods are used to determine organic compounds, but these are laborious and costly, so in this work a method for the determination of Hesperidin using UV-visible molecular absorption spectroscopy was developed and validated. The method was linear in the range of 0.27 to 100 mg/L with LD = 0.01 mg/L and LQ = 0.01 mg/L, exact with recoveries ranging from 98.8 ± 4.8 to 104.2 ± 4.8 and accurate with 3.4% RSD. Therefore, it is efficient for the determination of the free compound in suspension of nanoparticles.

**Keywords:** methodology validation; nanoparticles; hesperidin.

### 1. Introdução

A hesperidina é um composto presente em algumas frutas cítricas, sendo o principal flavonoide encontrado na laranja e em menores quantidades no limão. Além disso, a hesperidina é um composto abundante e barato. É um glicosídeo da sua forma aglicona hesperetina.<sup>7</sup> A Figura 1 apresenta a estrutura molecular da hesperidina.

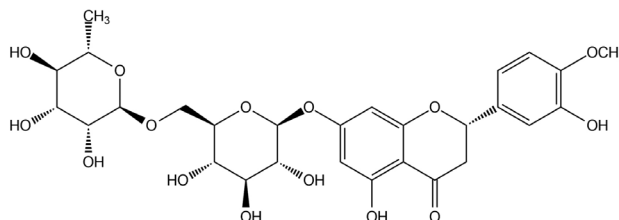


Figura 1. Estrutura molecular da hesperidina

O composto hesperidina, como outros flavonoides, apresenta um potencial anti-infeccioso e anti-replicativo *in vitro* contra alguns micro-organismos. Além disso, também já foi reportada a atividade antifúngica da hesperidina em alguns estudos.<sup>3</sup> Dessa forma, a hesperidina está relacionada com múltiplas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antiviral, hipolipidêmica, antitumoral, entre outras.<sup>4,5,7</sup>

Os flavonoides das frutas como a hesperidina e a naringinina, são absorvidos no trato gastrointestinal, após deglicosilação por bactérias intestinais. Após a degradação da hesperidina por enterobactérias, pesquisas apontam pequenas concentrações dos metabólitos no sangue, o que indica uma biodisponibilidade limitada deste composto. Os flavonoides são degradados no organismo, estando assim em pequenas concentrações no sangue, mesmo após uma grande ingestão deles. Além disso, apesar de apresentar muitos efeitos benéficos, a hesperidina é muito pouco solúvel em água, o que a torna pouco biodisponível para o organismo.<sup>15</sup> Devido a isso, a hesperidina possui eficácia terapêutica limitada quando administrada via oral.<sup>10</sup>

Uma alternativa para a melhorar a eficácia terapêutica da hesperidina foi a utilização de sistemas nanocarreadores, neste caso, nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana, uma proteína e um biopolímero respectivamente, a fim de aumentar o tempo de retenção e a concentração do princípio ativo no organismo bem como reduzir possíveis efeitos adversos.<sup>6,16,17</sup>

Alguns estudos demonstram a validação de metodologias e a determinação de hesperidina em diversos meios utilizando técnicas cromatográficas. Saeidi et al. (2011) publicaram seus estudos sobre a determinação de hesperidina e outros flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE em suco de laranja lima. Já Hejniak *et al.* (2019) determinaram hesperidina e outros polifenóis em plantas medicinais utilizando a cromatografia líquida de ultra-alto desempenho - CLUE. Entretanto essas técnicas são de elevado custo e nem sempre acessíveis.<sup>8,13</sup>

Kelte Filho *et al.* (2021), desenvolveram uma nova formulação, onde a hesperidina foi ocluída em nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana. Esse novo fármaco necessitou de um método analítico para avaliar a eficiência de sua encapsulação, quantificando a concentração de hesperidina livre, isto é, que não foi ocluída nas nanopartículas durante o procedimento de produção. Vale ressaltar que não há na literatura nenhum estudo de validação de método analítico para determinar hesperidina em dispersão coloidal contendo nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana.

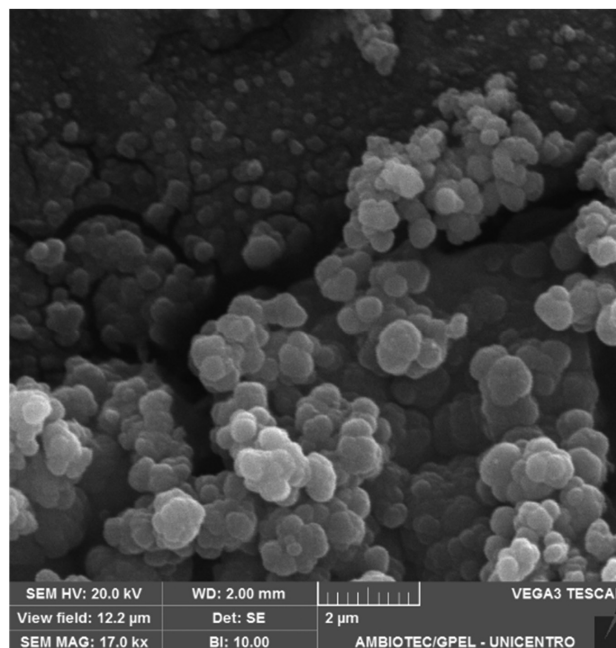
Nesse sentido, a espectroscopia de absorção molecular por UV-visível apresenta-se como uma alternativa interessante para a determinação do composto hesperidina. Essa técnica é relativamente rápida e de baixo custo comparada as cromatográficas. Com isso, o principal objetivo deste estudo foi desenvolver e otimizar um método simples, rápido, preciso e econômico para a quantificação de hesperidina livre em dispersão de nanopartículas de gliadina com quitosana, monitorando, desta forma, a quantidade da substância ativa na formulação farmacêutica, utilizando espectroscopia de absorção molecular por UV-visível.

## 2. Materiais e Métodos

Foram utilizadas gliadina, hesperidina e quitosana de baixo peso molecular (50.000–190.000 Da) (75-85% desacetilado) adquiridas da Sigma-Aldrich® (Missouri, EUA). Também foram utilizados Pluronic F68 e CaCl<sub>2</sub> adquiridos da Biotec® (Brasil). O etanol foi adquirido da FMaia (Brasil) e ácido acético da marca Sigma-Aldrich® (Missouri, EUA). A água foi purificada usando um sistema Milli-Q Plus (Millipore) com uma condutividade de 18 MΩ. Também foi utilizado Espectrofotômetro UV (UV-1800, Shimadzu Corporation, Ltd., Japan).

Amostra de nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana contendo a hesperidina foram sintetizadas no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, da

Universidade Estadual do Centro-Oeste, no campus CEDETEG localizado em Guarapuava, estado do Paraná, Brasil. A Figura 2, apresenta a micrografia das nanopartículas utilizadas com tamanho em torno de 300 nm.



**Figura 2.** Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana contendo hesperidina

### 2.1. Otimização e validação espectrofotométrica

Foi realizada a validação de uma metodologia utilizando um espectrofotômetro UV-VIS com cubeta de quartzo para a quantificação de hesperidina em meio de liberação *in vitro* utilizando os parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão. O comprimento de onda utilizado no equipamento foi 283 nm, no qual ocorre a máxima absorção do composto hesperidina.<sup>7</sup>

### 2.2. Amostras de nanopartículas de gliadina carregadas com hesperidina

O método de preparo das nanopartículas foi relatado em artigo publicado por Kelte Filho *et al.* (2021). Primeiramente, foram solubilizados 150 mg de gliadina em 10 mL de etanol 70% (v/v). Também foi preparada uma solução aquosa contendo CaCl<sub>2</sub> 1% (m/v) e Pluronic F68 1% (m/v). Na sequência foi adicionado 2 mL de etanol absoluto em 2 mL da solução com gliadina. Em seguida, foi vertida a solução resultante em 9 mL da solução aquosa com CaCl<sub>2</sub> e estabilizador com gotejamento a 1 mL/min utilizando uma bomba peristáltica (Ismatec, Suíça). O sistema ficou sob agitação por 15 min, sendo então levado ao rota-evaporador por 20 min a 37 °C e centrifugado por 20 min a 15500 rpm na temperatura de 10 °C. Em seguida, as nanopartículas

foram revestidas com quitosana 0,05% (m/v) preparada em solução aquosa de ácido acético 1% (v/v). Na sequência, as amostras foram centrifugadas nas condições anteriores e ressuspensas em água ultra-pura, sendo então essas amostras utilizadas para validação do método analítico (Kelte Filho et al., 2021).

### 2.3. Curvas de Calibração

Foram utilizadas curvas de calibração externa, em triplicata, para a determinação da hesperidina livre nas amostras. A curva analítica para quantificação da hesperidina foi realizada utilizando a faixa de concentração de 10 a 100 mg/L em solução etanólica 70% (v/v). Brancos analíticos foram preparados usando as nanopartículas vazias para mimetizar a matriz contendo a hesperidina, reproduzindo o processo de produção das nanopartículas e solubilizando em água ultrapura.

### 2.4. Linearidade

Para avaliar a linearidade das curvas analíticas, a partir dos dados de calibração, realizou-se a análise de regressão linear e o teste de falta de ajuste, com um nível de confiança de 95%. O tratamento estatístico foi realizado utilizando o software Minitab (16.2.2). A linearidade foi calculada a partir de medidas em triplicata da curva analítica.

### 2.5. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Para calcular os limites de detecção e quantificação dos métodos foram realizadas 10 medidas do branco. O LD e o LQ foram calculados pelo método da Curva analítica, de acordo com o *International Council for Harmonisation ICH* (2005) utilizando as seguintes Equações 1 e 2:<sup>9</sup>

$$LD = 3,3 SD/m \quad (1)$$

$$LQ = 10 SD/m \quad (2)$$

onde: SD: desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco e *m*: inclinação da curva de calibração.

### 2.6. Precisão

A precisão do método foi analisada a partir do estudo da repetitividade e da precisão intermediária para o composto hesperidina.

Para o teste de repetitividade, foram preparadas e realizadas três medidas das amostras durante o mesmo dia. Para avaliar a precisão intermediária, as amostras foram preparadas e medidas em triplicata, durante 3 dias consecutivos. Em amostras de nanopartículas vazias (sem hesperidina) foram adicionadas concentrações de 50 mg/L de hesperidina. Os valores de repetitividade e precisão intermediária foram calculados pelos desvios padrão relativos (RSD %) utilizando a Equação 3.<sup>2</sup>

$$RSD = (s/x) \times 100 \quad (3)$$

onde: *S*: desvio padrão da média das amostras e *x*: média das amostras.

### 2.7. Exatidão

O parâmetro exatidão foi avaliado através de estudos de recuperação por adição do composto hesperidina em amostras contendo nanopartículas vazias. O composto hesperidina foi adicionado em dois níveis de concentrações conhecidos (1,0 e 10 mg.L<sup>-1</sup>), sendo que as análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. A exatidão foi avaliada a partir da taxa de recuperação (%), de acordo com a Equação 4.<sup>11</sup>

$$Rec (\%) = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \quad (4)$$

onde: C1: concentração do analito obtido após a adição, C2: concentração do analito na amostra e C3: concentração do analito adicionado à amostra.

## 3. Resultados e Discussão

A análise da linearidade em uma determinada faixa de trabalho corresponde à capacidade do método que está sendo validado em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse.<sup>12</sup> A fim de avaliar a linearidade da faixa de concentração estudada, foram construídas curvas de padrão externo para Hesperidina utilizando a seguinte faixa de concentração de 10 a 100 mg/L. Para esta curva analítica foram utilizados 5 pontos de concentrações diferentes de hesperidina.

Aplicou-se à curva analítica obtida a técnica de regressão linear no nível de 95% de confiança. Os resultados encontram-se na Tabela 1. Verificou-se que o modelo linear foi significativo para as faixas de concentração estudadas, pois os valores de  $F_{regressão}$  foram maiores do que os valores de  $F_{crítico (0,05; 1, 13)} = 4,67$  e os valores de *p* foram menores do que 0,05 em um nível de confiança de 95%. Portanto, o modelo linear para a faixa de concentração avaliada não apresentou falta de ajuste, pois o valor observado de  $F_{falta\ de\ ajuste}$  foi menor que o valor de  $F_{crítico (0,05; 3, 10)} = 3,71$  e o valor de *p* foi maior do que 0,05.

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima do analito que pode ser detectado em um determinado nível de confiança, já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis.<sup>14</sup> Os valores de LD e LQ ficaram abaixo dos valores do primeiro ponto da curva analítica para hesperidina (10,0 mg/L), mostrando que o método utilizado apresentou boa sensibilidade para hesperidina, podendo dessa forma ser utilizado para análise das amostras de

**Tabela 1.** Resultados da análise de regressão linear no nível de 95 % de confiança

Composto	Parâmetros da Regressão Linear				Limites (mg/L)	
	$F_{regressão}$	valor de $p$	$F_{falha\ de\ ajuste}$	valor de $p$	LD	LQ
Hesperidina	2256,50	0,000	0,62	0,299	0,01	0,27

**Tabela 2.** Valores de média e RSD para o estudo de repetitividade e precisão intermediária na determinação de Hesperidina (50 mg/L)

Composto	Repetitividade		Precisão intermediária	
	Média (mg/L)	RSD %	Média (mg/L)	RSD %
Hesperidina	50,67 ± 1,72	3,40	53,13 ± 4,46	8,51

**Tabela 3.** Concentração média e taxa de recuperação para hesperidina em amostras de nanopartículas vazias nos níveis de 1,0 e 10,0 mg/L

Composto	Concentração adicionada (mg/L)	Recuperação (%)
Hesperidina	1,0	104,2 ± 6,2
	10,0	98,3 ± 4,8

interesse (Tabela 1). Dessa forma, a faixa linear de trabalho pode ser considerada do LQ a 100 mg/L.

Para avaliar a confiabilidade do método desenvolvido e utilizado no trabalho, foi realizado o estudo de precisão através do cálculo das estimativas de repetitividade (realizada no mesmo dia) e de precisão intermediária, realizada em 3 dias consecutivos.<sup>1</sup> Os valores de RSD (%) encontram-se na Tabela 2. Observou-se que os valores do RSD calculados para a repetitividade e para precisão intermediária estão abaixo do limite proposto pela AOAC (2012) que é de 15,00%, portanto, indicando precisão adequada para o método proposto.<sup>2</sup>

A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação por adição de padrão em dois níveis de concentração para a hesperidina. Os valores das recuperações estão apresentados na Tabela 3 e estão adequados com os valores determinados pela ANVISA (2003) para formas farmacêuticas que são de 80 a 120 %.

#### 4. Conclusão

O método desenvolvido mostrou-se simples, confiável e seletivo fornecendo exatidão e precisão satisfatórias, limites de detecção e quantificação baixos. Boas recuperações foram obtidas quando a hesperidina foi dopada na matriz farmacológica (nanopartículas). Além disso, o menor tempo de duração da análise de hesperidina em dosagens farmacêuticas é adequado para análises de rotina em relação a técnicas cromatográficas de maior custo.

#### Referências Bibliográficas

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899. 2003. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899\\_29\\_05\\_2003.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html)>. Acesso em: 20 maio 2021.
2. Association Of Official Analytical Chemists, *Official methods of analysis of AOAC international*, 19a ed., 2012.
3. Bae, E. A.; Han, M. J.; Kim, D.; In vitro anti-Helicobacter activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med.ica* **1999**, 65, 442. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
4. Benavente-Garcia, O., Castillo, J.; Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids : New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, 6185. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
5. Berkarda, B.; Koyunku, H.; Soybir, G.; Baykut, F.; Inhibitory effect of hesperidin on tumour initiation and promotion in mouse skin. *Research in Experimental Medicine* **1998**, 198, 93. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
6. Ding, Y.; Shen, S. Z.; Sun, H.; Sun, K.; Liu, F.; Qi, Y.; Yan, J.; Design and construction of polymerized-chitosan coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug delivery. *Materials Science and Engineering: C* **2015**, 48, 487. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Garg, A.; Garg, S.; Zaneveld, L. J.; Singla, A. K.; Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. *Phytotherapy Research* **2001**, 15, 655. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
8. Hejniak, J.; Baranowska, I.; Stencel, S.; Bajkacz, S.; Separation and Determination of Selected Polyphenols from Medicinal Plants. *Journal of Chromatographic Science* **2019**, 57,17. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
9. ICH Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
10. Manach, C.; Morand, C.; Gil-Izquierdo, A. et al. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *European Journal of Clinical Nutrition* **2003**, 57, 235. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
11. National Association of Testing Authorities, Guidelines for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Methods, Australia, 2012.
12. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e

- eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, 27, 771. [[Crossref](#)]
13. Saeidi, I.; Hadjmohammadi, M. R.; Peyrovi, M.; Iranshahi, M.; Barfi, B.; Babaei, A. B.; Dust, A. M.; HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, 2, 419. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
14. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S.; *Fundamentos de Química Analítica*, 8a. ed., Thomson: São Paulo, 2006.
15. Yamada, M.; Tanabe, F.; Arai, N.; Mitsuzumi, H.; Miwa, Y.; Kubota, M.; Chaen, H.; Kibata, M.; Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry* **2006**, 70, 1386. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
16. Wu, C.; Jim, T. F.; Gan, Z.; Zhao, Y.; Wang, S.; A heterogeneous catalytic kinetics for enzymatic biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles in aqueous solution. *Polymer* **2000**, 41, 3593. [[Crossref](#)]
17. Zhang, Wei-Yun; Lee, J.; Kim, Y.; Kim, I.; Han, J.; Lee, S.; Ahn, M.; Jung, S.; Myung, C.; Effect of Eriodictyol on Glucose Uptake and Insulin Resistance in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, 60, 7652. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]