

Artigo

Caracterização físico-química e avaliação da solubilidade em equilíbrio de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis

Adrian Lima Roberto ¹, Arthur Gabriel Corrêa de Farias ¹, Fernanda Pontes Nóbrega ², Pedro José Rolim Neto ² e Paulo César Dantas da Silva^{1,*}

¹ Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB, Brasil.

² Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

* Correspondence: adrianlima183@gmail.com

Resumo: A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel que possui grande importância para a saúde óssea, tendo como metabólitos principais a vitamina D2 (ergocalciferol) e a vitamina D3 (colecalfiferol). A vitamina B9 (ácido fólico) é uma vitamina hidrossolúvel, podendo ser encontrada como folato ou ácido fólico e desempenha um papel vital como cofator na síntese de DNA. A solubilidade de um fármaco apresenta influência direta na sua farmacocinética, repercutindo na sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica. O objetivo deste estudo foi avaliar a solubilidade de vitaminas submetidas a caracterização físico-química por técnicas termoanalíticas e espectroscópicas, bem como avaliar a solubilidade em equilíbrio pelo método "shake flask". Os resultados mostram-se positivos nas análises térmicas e espectroscópicas. Durante a avaliação da solubilidade em equilíbrio o ácido fólico e a vitamina D3 degradaram-se nos tampões ácidos, fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE) e tampão acetato (TA), sendo possível apenas a quantificação no tampão de suco entérico simulado sem enzima (SESSE). A solubilidade do ácido fólico no tampão SESSE foi determinada como sendo 1,07 mg/mL e o tempo para atingir o equilíbrio foi de 9h. Já a solubilidade da vitamina D3 foi calculada como sendo 0,00109 mg/mL, atingindo o equilíbrio em 3 horas.

Palavras-chave: ácido fólico; vitamina D3; shake flask; espectroscopia de infravermelho; análise térmica

1. Introdução

As vitaminas são compostos orgânicos que, em pequenas quantidades, desempenham diversas funções bioquímicas. Consideradas nutrientes essenciais, geralmente não são sintetizadas pelo organismo, sendo necessário adquiri-las por meio da alimentação [1].

A vitamina D faz parte do grupo das vitaminas lipossolúveis e é um pró-hormônio secosteróide com papel essencial na manutenção do tecido ósseo. A vitamina D2 e a vitamina D3 são seus metabólitos principais, também denominados de ergocalciferol e colecalfiferol, respectivamente. A vitamina D2 pode ser adquirida através da ingestão de plantas, fungos e leveduras, enquanto a vitamina D3 tem como principal fonte a exposição à luz solar ou a ingestão de alimentos de origem animal. Esses metabólitos são transportados ao fígado e sofrem reação de hidroxilação para formar 25-hidroxi-vitamina D, que por sua vez é convertido a forma ativa, 1,25-diidroxi-vitamina D, principalmente nos rins [2].

Os folatos são um grupo de compostos relacionados a vitamina B9 e que possuem um importante papel na síntese de aminoácidos e nucleotídeos de purina fundamentais para a síntese de DNA. Sua estrutura química é composta de um anel pterina ligado ao

Editores: Carlos Henrique Salvino e

João Augusto Oshiro Junior

Recebido: 01/10/2023

Revisado: 10/03/2024

Aceito: 01/05/2024

Publicado: 08/10/2024

Copyright: © 2024 by the authors.

Submitted for possible open access

publication under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ácido p-aminobenzóico (PABA), que por sua vez liga-se a resíduos de glutamato. A forma ativa da vitamina B9 é o de tetrahidrofolato (THF), o qual participa como cofator enzimático em reações de transferência de um carbono. Os vegetais folhosos e alguns cereais são considerados as principais fontes de folatos [3].

A solubilidade desempenha um papel crucial na liberação e absorção de medicamentos, sendo um fator essencial para a sua biodisponibilidade. Para que um fármaco seja absorvido, é necessário que esteja presente na forma de uma solução aquosa no local de absorção. Fármacos lipofílicos ou que possuem baixa solubilidade podem apresentar desafios relacionados a sua absorção e, portanto, baixa biodisponibilidade [4].

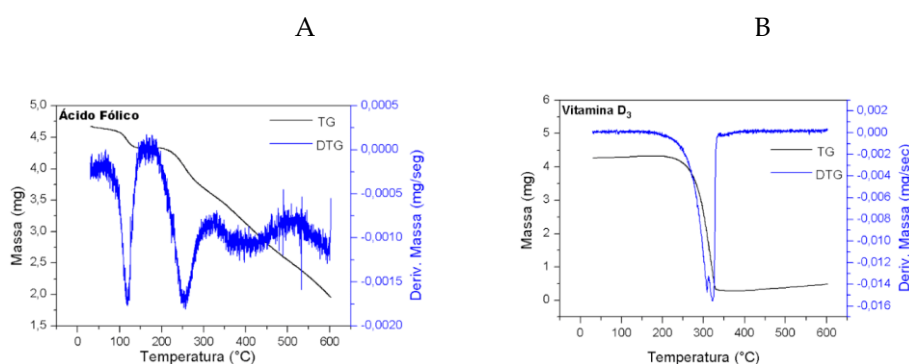
O propósito deste estudo é aprofundar a compreensão da solubilidade do ácido fólico e do colesterciferol, empregando o método de agitação orbital em frasco, o "shake flask", com o objetivo de avaliar sua capacidade de dissolução em diferentes condições. Além disso, os insumos foram submetidos à caracterização físico-química por meio de técnicas termoanalíticas, como a análise termogravimétrica (TGA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC), utilizadas para demonstrar a estabilidade térmica e decomposição, apresentando seu comportamento sobre diferentes condições de temperatura. Adicionalmente, foi utilizada a técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio com transformada de fourier (FTIR), empregada para analisar a estrutura molecular dos insumos. Esses resultados são extensivamente estudados durante a fase de desenvolvimento, visando garantir a segurança, eficácia e qualidade da formulação farmacêutica.

2. Resultados e Discussão

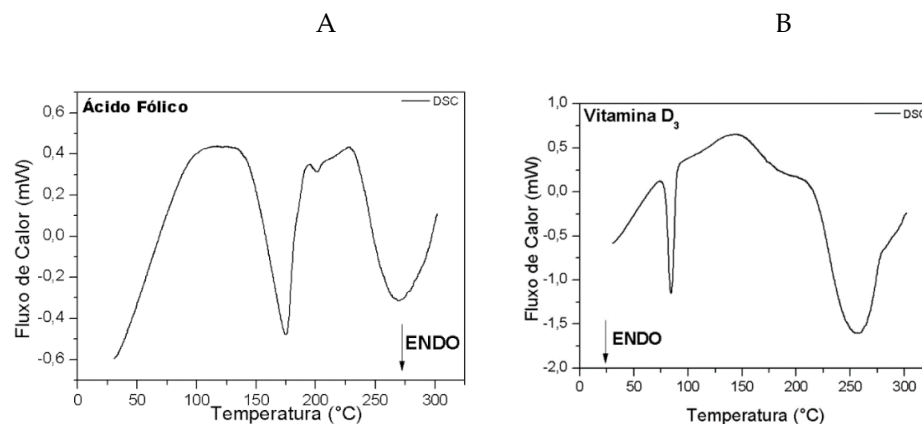
2.1. Termogravimetria e Calorimetria Diferencial Exploratória

As curvas TG/DTG do ácido fólico e do colesterciferol estão dispostas na Figura 1A e 1B, respectivamente. Já as curvas de DSC são apresentadas na Figura 2A e 2B.

Figura 1. Curvas TG/DTG do A) ácido fólico e B) vitamina D3.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Figura 2. Curvas de DSC do A) ácido fólico e B) vitamina D3.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

As curvas TG/DTG do ácido fólico, conforme ilustrado na Figura 1A, revelaram três eventos distintos de degradação. O primeiro evento ocorreu entre 93 °C e 150 °C, com uma variação de massa (Δm) de 91,69%. Em seguida, foram observados dois eventos sobrepostos, iniciando-se a uma temperatura de 196 °C e estendendo-se até 344 °C, culminando em 503 °C, com uma perda de massa correspondente a 47,96%.

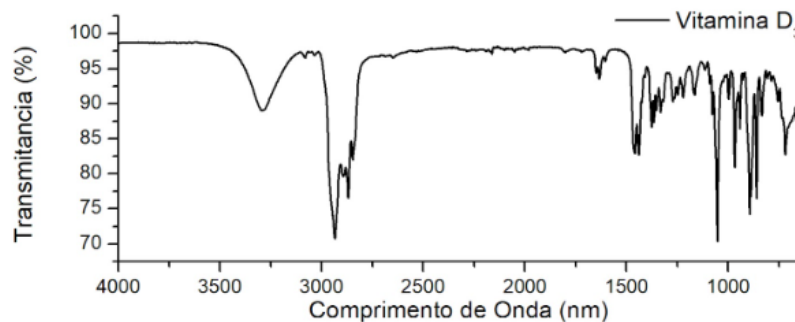
A curva DSC do ácido fólico, conforme representada na Figura 2A, revelou a ocorrência de dois eventos distintos. O primeiro evento teve lugar entre 175 °C e 184 °C, com um pico de temperatura (T_{pico}) a 146,09 °C e uma variação de entalpia (ΔH) de -81,15 J/g. Já o segundo evento foi observado entre 270 °C e 299 °C, com um T_{pico} de 236,34 °C e uma ΔH de -95,30 J/g. Notavelmente, esses resultados são semelhantes aos dados relatados anteriormente por [5].

As curvas TG/DTG do colecalciferol, conforme ilustradas na Figura 1B, indicam que essa substância é termicamente estável até atingir 216 °C. Além disso, são evidenciados dois eventos sobrepostos durante uma única etapa de decomposição, que se inicia a 216 °C e se estende até 326 °C, resultando em uma perda de massa (Δm) de 91,76%, conforme observado pela curva DTG. Ao término do experimento, é possível notar a formação de um resíduo correspondente a 11,2%.

A curva DSC do colecalciferol, representada na Figura 2B, revelou a presença de dois eventos endotérmicos. O primeiro evento, associado à fusão do material, ocorreu na faixa de 75,8 °C a 89,1 °C, apresentando um pico de temperatura (T_{pico}) a 84,22 °C e uma variação de entalpia (ΔH) de -33,31 J/g. Já o segundo evento foi observado entre 210,5 °C e 281,1 °C, com um T_{pico} de 257,1 °C e uma ΔH de -273,1 J/g. Resultados similares foram relatados por [6].

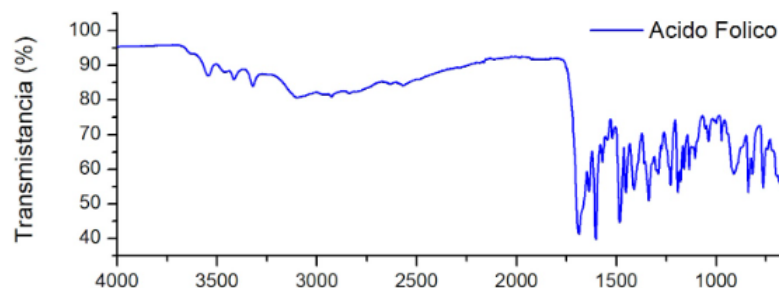
2.2. Espectroscopia De Absorção Na Região Do Infravermelho Médio Com Transformada De Fourier

O espectro do colecalciferol, demonstrado na Figura 3, exibiu as características distintivas deste componente farmacêutico. Foram identificadas bandas que indicam estiramentos de O-H livre (3410 cm^{-1}), C-H em anel aromático (3162 cm^{-1}), estiramento C=C aromático (1491 cm^{-1} e 1485 cm^{-1}), estiramentos alifáticos (2905 e 2710 cm^{-1}) e estiramento C=C (1690 cm^{-1}). É relevante notar que dados semelhantes foram reportados na literatura [6].

Figura 3. Espectro FTIR da vitamina D₃.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

A análise espectroscópica do ácido fólico, conforme ilustrada na Figura 4, revelou bandas que podem estar associadas à deformação axial do O-H (3555 cm^{-1} e 3416 cm^{-1}), uma banda sugestiva da vibração angular C=O (1689 cm^{-1}), a vibração de N-H (1609 cm^{-1}), e uma banda relacionada à absorção do anel fenil e da pterina (1485 cm^{-1}). Descobertas semelhantes foram previamente relatadas [5]

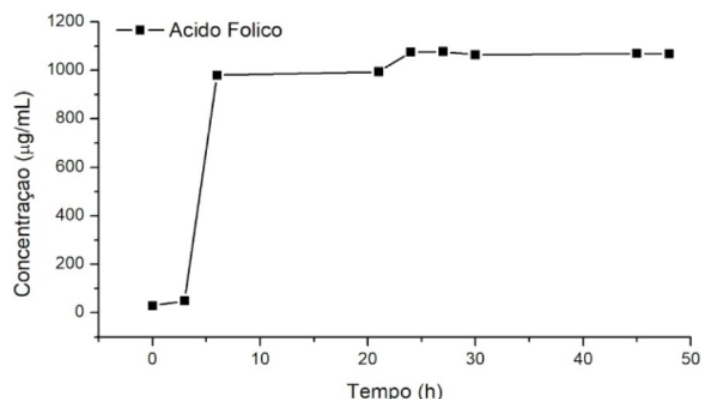
Figura 4. Espectro FTIR do ácido fólico.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

2.3. Avaliação da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em equilíbrio

A avaliação da solubilidade do ácido fólico foi conduzida em três tipos de tampões: FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8). Contudo, na corrida cromatográfica, notou-se a degradação da vitamina nos tampões ácidos, FGSSE e TA. A quantificação dos picos cromatográficos foi possível apenas no tampão SESSE (pH 6,8). A degradação em Tampão TA (pH 4,5) também foi registrada no estudo [7] onde foi observado que o ácido fólico em pH 4,5, torna-se instável, resultando em degradação ao longo da corrida cromatográfica.

O perfil de solubilidade do ácido fólico no pH 6,8 foi determinado, como ilustrado na Figura 5, utilizando a relação entre a concentração e o tempo. Nesse contexto, observou-se que o ácido fólico permaneceu estável ao longo do experimento, até o tempo final de 48 horas. Este resultado está em conformidade com as descobertas publicadas [7], que demonstraram a estabilidade do ácido fólico em pH 6,8 durante toda a corrida cromatográfica.

Figura 5. Avaliação da solubilidade do ácido fólico no meio SESSE.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

A solubilidade do ácido fólico no tampão SESSE foi calculada como sendo 1,07 mg/mL, e o tempo necessário para atingir o equilíbrio foi de 9 horas, conforme apresentado na Tabela 1.

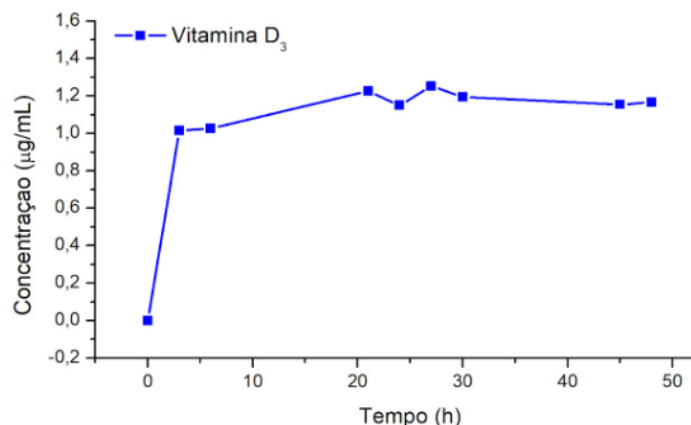
Tabela 1. Perfil de solubilidade do ácido fólico em pH 6,8.

Meio Tamponado	Solubilidade Experimental média (mg/mL)	Tempo para atingir equilíbrio	Coefficiente de Variação(CV %)
N = 3			
FGSSE (pH 1,2)	-	-	-
TA (pH 4,5)	-	-	-
FOS (pH 6,8)	1,07	9h	< 5%

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

A solubilidade aquosa é dependente de diversas características físico-químicas como lipossolubilidade, tamanho de partícula, grau de ionização e estrutura química, além da habilidade de formar ligações de hidrogênio com moléculas de água [8]. O ácido fólico pertence à família dos folatos, uma categoria de vitaminas solúveis em água, composta pelo ácido pteróico, ácido p-aminobenzóico e uma cadeia ligada a uma ou mais moléculas do ácido glutâmico. Todavia, os folatos sofrem degradação por exposição ao calor, oxigênio e luz ultravioleta resultando em subprodutos sem atividade biológica [9]. Dessa forma, a degradação observada durante o ensaio de quantificação pode ser resultante da baixa estabilidade do fármaco empregado no estudo, demonstrando assim a solubilidade pH-dependente do ácido fólico.

A solubilidade do colecalciferol foi também avaliada em três tipos de tampões: FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8). Foi possível identificar o sinal cromatográfico correspondente ao colecalciferol, somente no SESSE. A solubilidade foi ilustrada na Figura 6, revelando estabilidade ao longo do experimento (48 horas).

Figura 6. Avaliação da solubilidade da vitamina D3 no meio SESSE.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

O valor calculado para a solubilidade foi de 0,00109 mg/mL, e o tempo necessário para atingir o equilíbrio foi de 3 horas, conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 2. Perfil de solubilidade da vitamina D3 em pH 6,8.

Meio Tamponado	Solubilidade Experimental média (mg/mL) N = 3	Tempo para atingir equilíbrio	Coefficiente de Variação(CV %)
FGSSE (pH 1,2)	-	-	-
TA (pH 4,5)	-	-	-
FOS (pH 6,8)	0,00109	3h	< 5%

Fonte: Dados da Pesquisa, 2023.

O colecalciferol é insolúvel em água e apresenta baixa estabilidade em temperaturas acima de 25°C. O estudo de solubilidade em equilíbrio pelo método de agitação orbital em frascos, proposto pela ANVISA na RDC N° 749, de 5 de setembro de 2022, emprega tampões aquosos e temperatura constante (37°C), o que pode resultar na baixa estabilidade e solubilidade das amostras nas soluções tamponadas empregadas no estudo. Dessa forma, podemos observar que a solubilidade do colecalciferol é pH-dependente [10,11].

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

O colecalciferol, foi fornecido da indústria Valdequímica, lote 041403, validade 22/03/2025 e o ácido fólico, fornecido da indústria Fagron DEG, lote 20D13-B006-0615, ambas teor 'puro', declarado pelo fabricante, foram obtidas por uma farmácia de manipulação no Brasil, localizada no estado da Paraíba.

Os meios tamponados, fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE), tampão acetato (TA) e suco entérico simulado sem enzima (SESSE) foram produzidos conforme descrito na Farmacopeia Americana [12].

Todos os solventes e reagentes analíticos empregados nos ensaios de solubilidade em equilíbrio e dissolução foram de grau analítico (P.A.).

Para os ensaios de HPLC foram utilizados o metanol grau HPLC (LiChrosolv®, lote I1166107137) e acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich®, lote SHBG7762V), ambos provenientes do Brasil, no estado de São Paulo. A água ultra purificada também foi utilizada, e foi obtida através de um ultra purificador Milli-Q A10 gradiente (Millipore®).

3.2. Termogravimetria (TG/DTG)

A análise da termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG) foram obtidos por meio do equipamento TGA-60 (Shimadzu®), onde foi aquecido em uma razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ com uma temperatura variando entre 30 e $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob uma atmosfera controlada de nitrogênio ($100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Para a análise, foi colocado em um suporte de platina uma massa definida de $5,00 \pm 0,1\text{ mg}$ da amostra. O padrão utilizado foi oxalato de cálcio com variação de temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas mediante o emprego de uma célula calorimétrica, modelo DSC-50, da marca Shimadzu®, a uma razão de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), intervalo máximo de temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a realização dos ensaios foram utilizadas massa de amostras de $2,00 \pm 0,10\text{ mg}$ em cadinhos de alumínio fechado. Para a calibração da célula do DSC foi empregado o índio metálico ($T_{\text{fusão}} = 156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$; $DH_{\text{fusão}} = 28,7\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) com pureza de 99,99%.

3.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio com transformada de fourier

A análise espectroscópica foi realizada em espectrômetro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), modelo 400, marca Perkin Elmer® FTIR-MIR. As amostras foram caracterizadas empregando-se a técnica de reflexão total atenuada (ATR), no modo transmitância, com resolução espectral de 4 cm^{-1} e média de 64 varreduras (*scans*) por espectro. A região espectral avaliada foi de 4000 a 650 cm^{-1} . Os espectros obtidos foram comparados aos disponibilizados na literatura.

3.4. Avaliação da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em equilíbrio

Para determinar a solubilidade do colecalciferol e ácido fólico foi utilizado o método da agitação orbital em frasco (*shake flask*). A quantidade em excesso de matéria prima utilizada foi selecionada com base em dados de solubilidade das vitaminas encontrados na literatura, onde estima-se que a solubilidade do ácido fólico em meio aquoso é de $0,0016\text{ mg/mL}$ em temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ [13] e a solubilidade do colecalciferol é de $1,3 \times 10^{-5}\text{ mg/L}$, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ [14].

Foram empregados os seguintes meios tamponados: Fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2), Tampão Acetato - TA (pH 4,5) e Suco entérico simulado sem enzimas - SESSE (pH 6,8). O pH foi medido utilizando o medidor de pH Hanna, modelo HI2221. Foram examinados os valores de pH em cada meio tampão, tanto no início quanto no término do experimento.

Foi utilizada incubadora com movimento orbital para Erlenmeyer de até 125 mL. A faixa de velocidade do equipamento foi de 150 rpm, utilizando a temperatura de $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o tempo total do experimento foi de 48 horas e empregados 5,0 mg de cada vitamina, e o volume das alíquotas de 2 mL. As vitaminas foram quantificadas por HPLC-DAD.

3.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

Na análise cromatográfica foi utilizado um HPLC Flexar (PerkinElmer®), equipado com bomba quaternária, forno e detector de arranjos de diodos (DAD).

Para a quantificação do colecalciferol, foi empregado uma eluição do tipo isocrática com duração de 15 minutos, com fase móvel composta por acetonitrila:água (99:1 v/v), com fluxo de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com detecção a 265 nm. E para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna C18, $2,6\text{ }\mu\text{m}$, $50\text{ mm} \times 300\text{ mm}$ (Phenomenex®), mantida em temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para o ácido fólico, foi empregado uma eluição do tipo isocrática com duração de 5 minutos, com fase móvel composta por metanol:água (40:60 v/v), com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, com detecção a 280 nm. E para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna C18, marca Symmetry® 5 µm, 250 x 4,6 mm, mantida em temperatura de 40 °C.

4. Conclusão

O método do frasco de agitação orbital (*shake flask*) utilizado neste estudo permitiu avaliar a solubilidade dos insumos farmacêuticos em diferentes pHs. Observou-se que ambas as vitaminas manifestaram instabilidade nos meios tamponados TA e FGSSE, tornando-se estáveis apenas no SESSE demonstrando que são pH-dependentes. Além disso, as caracterizações físico-químicas foram conduzidas com sucesso, abrangendo análises térmicas, como a termogravimetria e calorimetria, e análises espectroscópicas por meio de espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier. Esses resultados são cruciais para o avanço no desenvolvimento de novas formulações, fornecendo informações essenciais sobre estabilidade, prazo de validade e garantindo a segurança, eficácia e qualidade das formulações farmacêuticas.

Conflito de Interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. Gironés-Vilaplana A, Villaño D, Marhuenda J, Moreno DA, García-Viguera C. Vitamins. In: Nutraceutical and Functional Food Components. Elsevier; 2017. p. 159–201. Doi: 10.1016/B978-0-12-805257-0.00006-5
2. Daryabor G, Gholijani N, Kahmini FR. A review of the critical role of vitamin D axis on the immune system. *Exp Mol Pathol.* 2023 Aug;132–133:104866. Doi: 10.1016/j.yexmp.2023.104866
3. Wolak N, Zawrotniak M, Gogol M, Kozik A, Rapala-Kozik M. Vitamins B1, B2, B3 and B9 – Occurrence, Biosynthesis Pathways and Functions in Human Nutrition. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2017 Jul 7;17(12). Doi: 10.2174/1389557516666160725095729
4. Liu X, Zhao L, Wu B, Chen F. Improving solubility of poorly water-soluble drugs by protein-based strategy: A review. *Int J Pharm.* 2023 Mar;634:122704. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.122704
5. Vora A, Riga A, Dollimore D, Alexander K. Thermal Stability Of Folic Acid in the solid-state. *J Therm Anal Calorim.* 2004;75(3):709–17. Doi: 10.1023/b:jtan.0000027167.14746.28
6. Iida ASL, Luz KN, Barros-Alexandrino TT, Fávoro-Trindade CS, Pinho SC de, Assis OBG, et al. Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. *Polímeros.* 2019;29(4). Doi: 10.1590/0104-1428.04119
7. Bellavinha KR, Silva-Barcellos NM, Souza JB, Leite JC, Souza J de. Folic acid: a biopharmaceutical evaluation. *Pharm Dev Technol.* 2015 Aug 18;20(6):730–7. Doi: 10.3109/10837450.2014.920352
8. Li YO, Diosady LL, Jankowski S. Folic acid stability in the presence of various formulation components including iron compounds in fortified extruded Ultra Rice ® over prolonged storage at 40 °C and 60% relative humidity (RH). *Int J Food Sci Technol.* 2011 Feb 12;46(2):379–85. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02494.x
9. Wusigale, Liang L. Folates: Stability and interaction with biological molecules. *J Agric Food Res.* 2020 Dec;2:100039. Doi: 10.1016/j.jafr.2020.100039
10. Temova Rakuša Ž, Pišlar M, Kristl A, Roškar R. Comprehensive Stability Study of Vitamin D3 in Aqueous Solutions and Liquid Commercial Products. *Pharmaceutics.* 2021 Apr 25;13(5):617. Doi: 10.3390/farmacêutica13050617
11. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 749, de 5 de setembro de 2022. Dispõe sobre isenção de estudos de bioequivalência/biodisponibilidade relativa. *Diário Oficial da União.* 2022 set 8; seção 1:67.
12. United States Pharmacopeial Convention. *United States Pharmacopeia.* 32nd ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2009. p. 1430.

13. Holovanchuk D. Otimização do direcionamento para células tumorais de nanosistemas lipídicos para uso terapêutico. 2014. 149 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Lisboa: Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa; 2014..
14. Medeiros L de A. Desenvolvimento farmacotécnico de cápsulas de colecalciferol de uso terapêutico: um estudo comparativo com formulações magistrais. (Mestrado em inovação terapêutica). Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2013.

Isenção de Responsabilidade/ Nota do editor: As declarações, opiniões e dados contidos em todas as publicações são exclusivamente do(s) autor(es) individual(is) e não da BIOFARM e/ou dos editores(es). A BIOFARM e/ou o(s) editor(es) isentam-se de responsabilidade por qualquer dano a pessoas ou propriedades resultante de quaisquer ideias, métodos, instruções ou produtos referidos no conteúdo.