

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE PROPRIEDADES ADME/ TOX E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES GLICOSILADOS COMO POTENCIAIS AGENTES HIPOGLICEMIANTES

Submission date: 22/11/2024

Acceptance date: 02/12/2024

Maria Eduarda Camargo

Centro Universitário Univel - Cascavel PR

Julia Westenhofen de Jesus

Centro Universitário Univel - Cascavel PR

Tiago Tizziani

Universidade Federal de Santa Catarina –

UFSC - Florianópolis SC

<https://orcid.org/0000-0002-2651-0557>

RESUMO: As abordagens *in silico* surgem como ferramentas indispensáveis para a triagem de novos candidatos a fármacos. Na avaliação de propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), além de toxicidade (Tox), essas metodologias permitem a identificação de compostos com potencial terapêutico que apresentem um perfil favorável de biodisponibilidade e segurança antes mesmo de testes experimentais. A avaliação *in silico* é particularmente valiosa para reduzir custos e tempo na pesquisa e desenvolvimento de potenciais candidatos a fármacos, oferecendo uma alternativa eficiente para a seleção inicial de compostos, facilitando a identificação de protótipos estruturais que possam melhorar

o controle glicêmico em pacientes com DM2, por exemplo. Devido à importância biológica de vários produtos vegetais naturais e à possibilidade de sua utilização nas indústrias alimentícia e farmacêutica, destaca-se a necessidade de identificar e quantificar os metabólitos em matrizes vegetais. Uma das técnicas de análise é a eletroforese capilar (EC), que se baseia na migração de espécies neutras, iônicas e ionizáveis na presença de um campo elétrico. O presente trabalho quantificou dois flavonoides glicosilados, guaijaverina e isoquercetina, em *Polygala altomontana*, com concentrações de $20,9 \pm 0,2$ e $39,6 \pm 2,4$ mg/g de extrato, respectivamente. Além disso, foram realizados estudos *in silico* para caracterizar as propriedades ADME/Tox dos flavonoides.

PALAVRAS-CHAVE: Propriedades ADME/Tox, *Polygala altomontana*, Eletroforese Capilar, Quantificação, Flavonoides glicosilados.

IN SILICO EVALUATION OF ADME/TOX PROPERTIES AND QUANTIFICATION OF GLYCOSYLATED FLAVONOIDS AS POTENTIAL HYPOGLYCEMIC AGENTS

ABSTRACT: In silico approaches have emerged as indispensable tools for screening new drug candidates. In the evaluation of pharmacokinetic properties such as absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME), as well as toxicity (Tox), these methodologies allow the identification of compounds with therapeutic potential that present a favorable bioavailability and safety profile even before experimental testing. In silico evaluation is particularly valuable for reducing costs and time in the research and development of potential drug candidates, offering an efficient alternative for the initial selection of compounds, facilitating the identification of structural prototypes that can improve glycemic control in patients with T2DM. Due to the biological importance of several natural plant products and the possibility of their use in the food and pharmaceutical industries, the need to identify and quantify metabolites in plant matrices stands out. One of the analysis techniques is capillary electrophoresis (CE), which is based on the migration of neutral, ionic and ionizable species in the presence of an electric field. The present work quantified two glycosylated flavonoids, quajaverin and isoquercetin, in *Polygala altomontana*, with concentrations of 20.9 ± 0.2 and 39.6 ± 2.4 mg/g of extract, respectively. In addition, in silico studies were performed to characterize the ADME/Tox properties of the flavonoids.

KEYWORDS: ADME/Tox properties, *Polygala altomontana*, Capillary electrophoresis, Quantification, Glycosylated flavonoids.

1 | INTRODUÇÃO

A hiperglicemia crônica, caracterizada pela manutenção de níveis elevados de glicose no sangue, é um marcador central do diabetes mellitus (DM), um distúrbio metabólico multifatorial que pode resultar da deficiência na secreção de insulina, resistência à sua ação ou da combinação desses fatores. A insulina é um hormônio anabólico essencial para a regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, desempenhando, portanto, um papel crucial na homeostase glicêmica. O DM é classificado pela Associação Americana de Diabetes (ADA) em quatro tipos principais: tipo 1 (DM1), dependente de insulina; tipo 2 (DM2), não dependente de insulina; gestacional; e secundário a outras condições patológicas. Independentemente do tipo, o DM compartilha a hiperglicemia como característica comum, e sua falta de controle pode levar ao desenvolvimento de complicações graves, como doenças cardiovasculares, neuropatias, nefropatias, e outros distúrbios que afetam a saúde e qualidade de vida dos pacientes (ANTAR et al., 2023; ARSA et al., 2009).

A busca por novos agentes terapêuticos hipoglicemiantes, que sejam eficazes e apresentem um perfil de segurança aceitável, tem se intensificado, particularmente com o interesse crescente por fontes naturais. A pesquisa fitoquímica tem contribuído significativamente ao identificar compostos bioativos de plantas, cujos efeitos podem ser promissores no controle glicêmico. Em especial, plantas como Melão-de-São-Caetano

(*Momordica charantia*), Carqueja (*Baccharis trimera*), Jamelão (*Syzygium cumini*), Insulina Vegetal (*Cissus sicyoides*), Pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*), Alho (*Allium sativum*), *Polygala spp.* conhecidas por suas atividades hipoglicemiantes, têm atraído atenção científica por suas propriedades biológicas e pelo potencial de prevenir complicações diabéticas devido a suas atividades antioxidantes (NEGRI, 2005, ALAGAMMAL, 2012).

Neste contexto, este trabalho objetiva a análise *in silico* das propriedades ADME/Tox e quantificação de flavonoides glicosilados com potenciais efeitos hipoglicemiantes, reportados na literatura, buscando identificar metabólitos secundários com atividade hipoglicemiante em matrizes vegetais. Esta abordagem não apenas valoriza o uso de recursos naturais, mas também explora a aplicação de ferramentas computacionais para acelerar a descoberta e desenvolvimento de fármacos mais seguros e eficazes no manejo do DM (ZHANG, 2011, JAYACHANDRAN, 2018, DUARTE, 2019).

Devido à importância biológica de vários produtos vegetais naturais e à possibilidade de sua utilização nas indústrias alimentícia e farmacêutica, destaca-se a necessidade de identificar e quantificar os metabólitos em matrizes vegetais. Uma das técnicas de análise é a eletroforese capilar (EC), que se baseia na migração de espécies neutras, iônicas e ionizáveis na presença de um campo elétrico. A EC apresenta diversas vantagens, entre as quais se destacam: pequena demanda de amostra, baixo volume de injeção, baixo custo analítico, tempo de análise apreciavelmente curto e redução na quantidade de solventes orgânicos utilizados em comparação à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (SPUDEIT et al., 2012).

O presente capítulo aborda um estudo de quantificação dos flavonoides glicosilados guaijaverina e isoquercetina em *Polygala altomontana*. Além disso, foram realizados estudos *in silico* para caracterizar as propriedades ADME/Tox dos flavonoides.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Quantificação dos compostos majoritários de *P. altomontana* usando Eletroforese Capilar

2.1.1 Condições eletroforéticas

Os experimentos foram realizados em equipamento Hewlett-Packard- HP3DCE, com detector de arranjo de diodos (DAD). O capilar utilizado foi de sílica fundida (48,5 cm L_{tot} x 50 μ m d.i.) com 40 cm de comprimento até o detector (L_{det}); injeção hidrodinâmica, pelo *inlet* (50 mbar por 5 s), 25 kV de tensão aplicada; com polaridade positiva, 25 °C e detecção direta em 200 nm. Entre as corridas o capilar foi lavado por 1 min com o BGE (*Background Electrolyte*). O BGE foi preparado com TBS 20 mmol L⁻¹ e MeOH 10%. O capilar foi condicionado durante 1 hora com NaOH 0,1 mol L⁻¹, 1 hora de água Milli Q e 1 hora de BGE. Como padrão interno (PI) foi utilizado o 2,6-dicloro-fenol. A solução estoque

do extrato bruto hidroalcoólico foi preparada a 6000 ppm em MeOH grau HPLC, sendo a amostra preparada com 800 μL da solução estoque e 200 μL de PI a 1000 ppm. Os flavonoides foram monitorados no extrato bruto através de adição de padrões isolados previamente e quantificados através de análise de regressão linear por meio de curvas de calibração.

2.1.2 Validação do método

Os parâmetros de validação analisados foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e precisão instrumental, precisão intraensaio e precisão intermediária.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação (r) e do coeficiente de determinação (R^2). O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados com base nas equações:

$$LD = \frac{3,3 \times s}{S}$$

$$LQ = \frac{10 \times s}{S}$$

Onde s é o desvio padrão do intercepto e S é a inclinação da curva analítica.

A precisão instrumental foi determinada pela injeção do mesmo extrato (4800 mg L^{-1}), acrescido do padrão interno, por quinze vezes consecutivas. A precisão intraensaio foi determinada pela preparação de três soluções de extrato, adicionado do padrão interno, analisadas em duplicata, totalizando seis análises consecutivas. A precisão intermediária foi avaliada através da análise do mesmo extrato, adicionado do padrão interno, em duplicata, em três dias diferentes. A precisão foi expressa através do coeficiente de variação (CV%) para a razão do tempo de migração da guajaverina (1) e razão da área do pico utilizando o padrão interno.

2.2 Lipofilicidade (Log P)

A determinação do log P calculado dos compostos isolados neste trabalho foi realizada através do programa Molinspiration (Cheminformatics). Os compostos que apresentam maior coeficiente de partição, ou seja, têm maior afinidade pela fase orgânica, tendem a apresentar maior taxa de permeabilidade pelas biomembranas hidrofóbicas (BARREIRO; FRAGA, 2014).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação dos flavonoides glicosilados em *P. altomontana*.

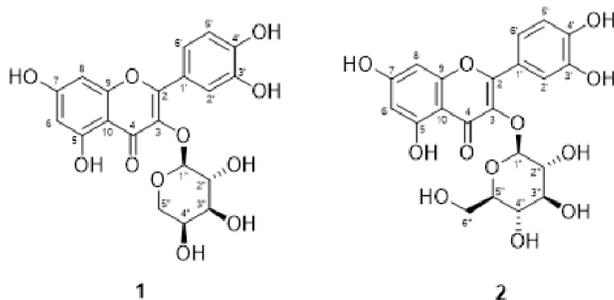


Figura 1 – Flavonoides glicosilados de *Polygala altomontana*

Para quantificar os analitos no extrato de *Polygala altomontana*, foram obtidas curvas de calibração com os padrões de dois flavonoides, guaijaverina (1) e isoquercetina (2), conforme metodologia descrita na seção experimental. Em todos os casos, foram obtidas relações lineares entre as concentrações avaliadas e os sinais obtidos (em relação ao padrão interno 2,6-diclorofenol) com valores de R² maiores que 0,97. Quanto mais próximo de 1,0, seus valores indicam menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados (DE ARAGÃO et al., 2009). A Tabela 1 mostra as equações obtidas a partir das retas e os coeficientes de correlação.

Analito	Equação da reta	R ²	r
Guaijaverina	$y = (2,24 \pm 1,78) \times 10^{-2} + (1,82 \pm 0,14) \times 10^{-3} x$	0,97645	0,99113
Isoquercetina	$y = (4,92 \pm 7,78) \times 10^{-3} + (1,78 \pm 0,04) \times 10^{-3} x$	0,99830	0,99936

Tabela 1 - Equações das curvas analíticas para os flavonoides analisados.

Uma amostra do extrato de *P. altomontana* na concentração de 4800 mg L⁻¹ foi preparada sob as condições experimentais descritas acima, e a amostra foi injetada diretamente (Figura 2). A Tabela 2 mostra as concentrações de cada analito na amostra, calculadas usando as curvas de calibração obtidas anteriormente, e as concentrações do analito no extrato bruto.

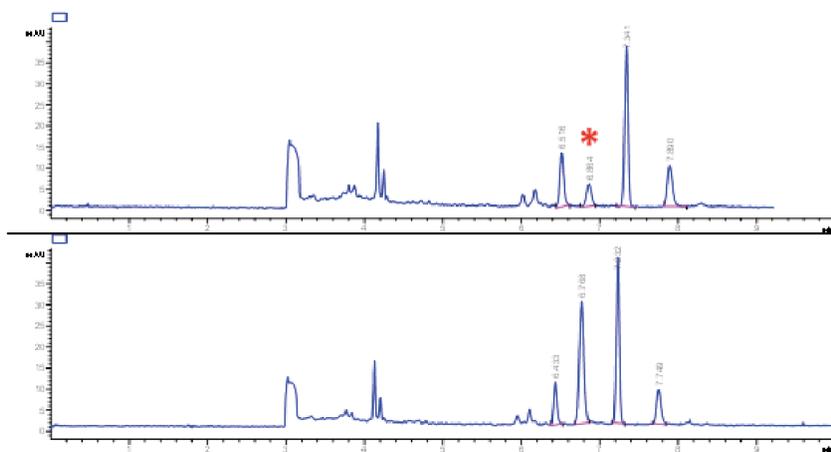


Figura 2 - Eletroferograma do extrato bruto (adição de guajaverina* e padrão interno).

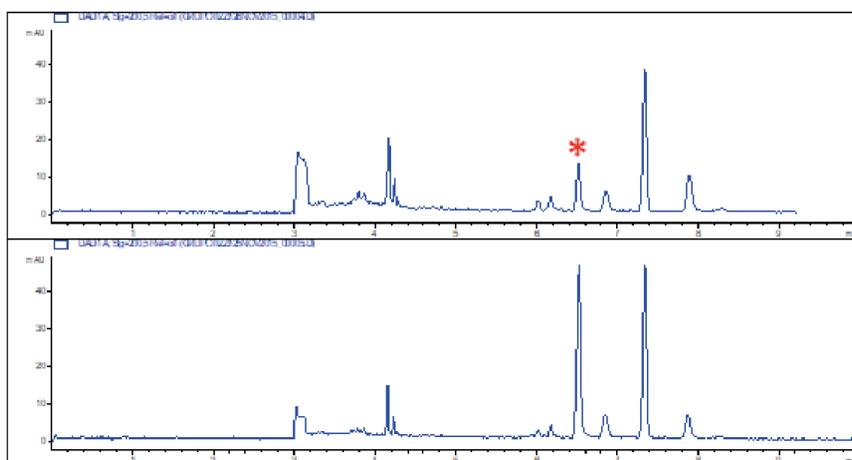


Figura 3 - Eletroferograma do extrato bruto (adição de isoquercetina* e padrão interno).

A Tabela 2 apresenta as concentrações de cada analito na amostra, calculadas utilizando as curvas de calibração obtidas anteriormente, e as concentrações dos analitos no extrato bruto de *Polygala altomontana*.

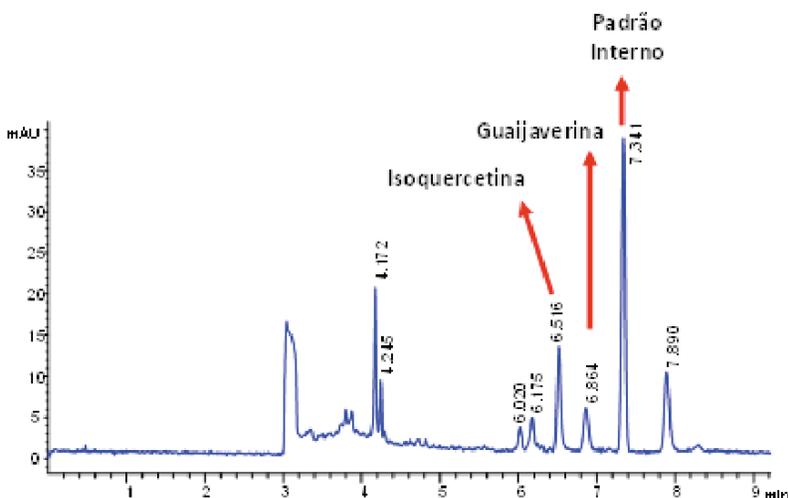


Figura 4 - Eletroferograma do extrato bruto hidroalcoólico de *P. altomontana* com a adição de padrão (2,6-diclorofenol).

Analito	Concentração na amostra (mg L ⁻¹)	Concentração no extrato de <i>P. altomontana</i> (mg g ⁻¹)
Guaijaverina	100.4±0.8	20.9±0.2
Isoquercetina	189.9±11,5	39.6±2.4

Tabela 2 - Concentração dos flavonoides glicosilados em *Polygala altomontana*.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados para a guaijaverina e isoquercetina através dos parâmetros da curva de calibração, sendo, respectivamente, 3,3 e 10 vezes o desvio padrão do intercepto pelo coeficiente angular da curva e encontram-se na **Tabela 3**.

Parâmetro	Valor
Precisão instrumental (CV%): razão do tempo de migração	1,42
Precisão instrumental (CV%): razão de área	5,40
Precisão intraensaio (CV%): razão do tempo de migração	1,94
Precisão intraensaio (CV%): razão de área	6,95
Guaijaverina	
LD (mg L ⁻¹)	32,27
LQ (mg L ⁻¹)	97,80
Isoquercetina	
LD (mg L ⁻¹)	14,42
LQ (mg L ⁻¹)	43,71

Tabela 3 - Valores de precisão instrumental, intraensaio e intermediária e limites de detecção e quantificação.

A precisão instrumental foi avaliada através de quinze análises consecutivas de uma mesma amostra de extrato, sendo que a repetibilidade da razão do tempo de migração e da razão da área do pico, obtidos para guaijaverina, foram 1,42% e 5,40%. A avaliação da precisão intraensaio, determinada pela análise de três soluções de extrato, em duplicata, resultou em valores de coeficientes de variação iguais a 1,94% e 6,95%, considerando a razão do tempo de migração e razão da área do pico, respectivamente. A precisão intermediária, determinada através da análise do mesmo extrato, em duplicata, em três dias diferentes, resultou nos seguintes valores de CV%: 2,09 e 6,41. Observa-se que os valores de coeficiente de variação obtidos pela razão do tempo de migração da guaijaverina em relação ao padrão interno encontram-se abaixo de 5%. Os valores de CV% encontrados com relação à área do analito demonstram sofrer maior influência com o passar do tempo (precisão intermediária) e ao analisar diferentes soluções de mesma concentração (precisão intraensaio).

3.2 Lipofilicidade (Log P)

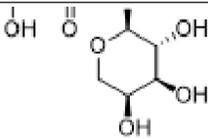
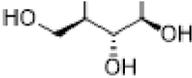
Composto	Estrutura	Log P	OH, NH	O, N	MM	Violações
1		-0,57	7	11	434,08	2
2		-0,99	8	12	464,10	2

Tabela 13 - Valores de Log P calculados e demais parâmetros que influenciam na absorção e permeação dos compostos.

Os flavonoides guaijaverina e isoquercetina apresentaram log P negativo, com valores de -0,57 e -0,99, mostrando um caráter hidrofílico. Além disso, os mesmos apresentaram duas violações da Regra de Lipinski, por apresentarem mais de 5 doadores de ligações de hidrogênio e mais de 10 aceptores de ligações de hidrogênio (LIPINSKI, 1997).

A combinação de abordagens *in silico* e experimentais para caracterizar as propriedades ADME/Tox e quantificação dos compostos permite uma avaliação mais eficiente de seus perfis de segurança e eficácia. Estes resultados destacam a necessidade de estudos complementares para explorar as interações e mecanismos moleculares que sustentam os efeitos hipoglicemiantes dos flavonoides glicosilados guaijaverina e isoquercetina, favorecendo o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos a partir desses produtos naturais.

4 | CONCLUSÃO

O presente estudo quantificou dois flavonoides glicosilados, guaijaverina e isoquercetina, em *Polygala altomontana*, com concentrações de $20,9 \pm 0,2$ e $39,6 \pm 2,4$ mg/g de extrato, respectivamente. Além disso, foram realizados estudos *in silico* para caracterizar as propriedades ADME/Tox dos flavonoides. Os compostos apresentaram log P negativos. Além disso, violaram duas vezes a Regra de Lipinski por terem mais de 5 doadores de ligações de hidrogênio (expressos como a soma de OH e NH) e mais de 10 aceptores de ligações de hidrogênio (expressos como a soma de N e O). A análise quantitativa por EC-DAD mostrou-se eficiente. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados, assim como demais parâmetros analíticos, permitindo a quantificação dos dois flavonoides glicosilados.

REFERÊNCIAS

ALAGAMMAL, et al. Antidiabetic and antihyperlipidaemic activity of *Polygala chinensis* L. whole plant in alloxan induced diabetic rats. *Int J Chem Pharm Sci*, v. 3, p. 37-44, 2012.

ARSA, G. et al. Diabetes Mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano*, v. 11, n. 1, p. 103–111, 1 jan. 2011.

ANTAR, S. A. et al. Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 168, p. 115734, 2023.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. [s.l.] Artmed Editora, 2014.

DE ARAGÃO., N.M., et al. Efeito da acidez e de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada. *Quím. Nova* 32 (9), 2482-2486, 2009.

DUARTE, Regiane C. et al. Effect of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaves, methanolic extract and guaijaverin on blood glucose and lipid levels in a type II diabetic rat model. *Chemistry & Biodiversity*, v. 16, n. 1, p. e1800365, 2019.

JAYACHANDRAN, M. et al. Isoquercetin ameliorates hyperglycemia and regulates key enzymes of glucose metabolism via insulin signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *European journal of pharmacology*, v. 829, p. 112-120, 2018.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, p. 121-142, 2005.

SPUDEIT, D. A. et al. 2012. Conceitos básicos em eletroforese capilar. *Scientia Chromatographica* 4(4), 287-297, 2012.

ZHANG, Rui et al. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A y mice. *Nutrition & Metabolism*, v. 8, p. 1-6, 2011.