



19 Congresso de Iniciação Científica

DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS EM PRODUTOS FITOTERÁPICOS

Autor(es)

ALINE APARECIDA ARANTES E SILVA AZEVEDO

Orientador(es)

CARLOS OTÁVIO MARIANO

Apoio Financeiro

FAPIC/UNIMEP

1. Introdução

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (SIMÕES et al., 2002).

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso em terapêutica que apresenta uma grande aceitação pela população, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial utilizam produtos de origem natural para combater problemas como pressão alta, queimaduras, gripe, tosse, prisão de ventre, entre outros (CAFITO, 2009; OLIVEIRA, 2005). Os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, garantindo a constância de ação terapêutica e segurança de utilização, fatores necessários para a transformação de uma planta em medicamento (OLIVEIRA, 2005).

Pretende-se com este projeto desenvolver uma metodologia prática de quantificar os princípios ativos em tinturas (forma de extração mais próxima da popular) e extratos secos, bem como desenvolver um estudo de estabilidade em fármacos, conforme Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005 - ANVISA. Para tanto, serão estudados os parâmetros espectrofotométricos para quantificar os princípios ativos nas amostras, e a manutenção da proporcionalidade quantitativa nas diversas manipulações realizadas a partir das amostras mãe. Visando uma futura aplicação do procedimento desenvolvido em farmácias de manipulação.

DETERMINAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Os princípios ativos são substâncias presentes nas plantas responsáveis pelo seu efeito terapêutico, sendo assim, a qualidade das plantas medicinais está relacionada ao seu teor de princípio ativo e, portanto, a sua eficiência terapêutica (MENDES et al., 2005).

A determinação do teor de princípio ativo se faz muito importante, uma vez que a quantidade de substâncias ativas presentes em uma determinada planta varia de acordo com as características climáticas-edáficas a que esta se expõe no seu local de cultivo (habitat, regime de chuvas, insolação, tipo de solo, sazonalidade, etc.), além da idade da espécie, época da colheita e condições de estocagem. Portanto, a avaliação e determinação desses princípios são tarefas indispensáveis para a obtenção de produtos de boa qualidade (HUBINGER, 2009; OLIVEIRA, 2005).

A espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de sua robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações (POZZI, 2007). Porém, a determinação de princípios ativos por Espectrofotometria em Ultra Violeta-Visível (UV-VIS) só é possível quando estes possuem grupos cromóforos (grupo insaturado covalente responsável pela absorção da radiação eletromagnética) na sua estrutura molecular (SOBRINHO et al., 2008).

FLAVONÓIDES

Entre os diversos princípios ativos existentes na natureza, os flavonóides constituem um dos mais importantes, denominados metabólicos secundários (VIEIRA et al., 2008; SIMÕES et al., 2002).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas, garantindo o equilíbrio ecológico. Entre elas podemos citar a proteção dos vegetais contra a incidência dos raios ultravioletas e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atraentes de animais com finalidade de polinização e antioxidantes. (SIMÕES et al., HUBINGER, 2009).

Esses metabólicos podem ser encontrados nas frutas, vegetais, sementes, flores e cascas de árvores, também no vinho, em cereais e ocasionalmente em corantes alimentares. Dessa forma, tornam-se parte íntegra da dieta humana (SIMÕES et al., 2002; VIEIRA et al., 2008).

A espectroscopia no ultravioleta é a principal técnica utilizada na determinação de flavonóides, declara Simões et al. (2002). A complexação desses metabólicos com metais, principalmente com o íon Al^{3+} , é comumente empregada nos seus estudos pela análise da absorção UV-Visível, os deslocamentos são devidos à formação do complexo Al^{3+} -flavonóide (POZZI, 2007).

2. Objetivos

Determinação de uma metodologia viável para quantificação de flavonóides totais em tinturas e extratos secos.

3. Desenvolvimento

AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de Própolis, Cassau (*Aristolochia cymbifera* Mart & Zucc) e Arnica, sendo que esta última corresponde à combinação de dois tipos de Arnica, a Arnica Imperial (*Arnica Montana* L) e a Arnica Nacional (*Solidago microglossa* DC), em proporção de 50% p/p.

As amostras foram fornecidas pelo laboratório da Farmácia de Manipulação Prof. Accorsi – Plantas Medicinais/ Piracicaba-SP, sob a forma de tinturas e extratos secos das mesmas.

As tinturas foram preparadas em soluções etanóicas, sendo que a própolis foi preparada a 30% com etanol a 85%, e as duas últimas a 20% com etanol a 70%.

Os extratos secos foram moídos em moinho Marconi – MA 345, até uma granulometria de 0,250 mm.

EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro UV-VIS Femto modelo 800 XI, localizado no laboratório de Engenharia de Alimentos, da FEAU – UNIMEP
- Espectrofotômetro UV-VIS Femto 800 XI, localizado na Farmácia de Manipulação Prof. Accorsi – Plantas Medicinais
- Espectrofotômetro UV-VIS Jasco modelo 7800, localizado no laboratório de Química, da FEAU – UNIMEP

MÉTODOS

PROCEDIMENTO 1: *Determinação do teor de Flavonóides Totais em Quercetina nas tinturas (Método descrito por Park et al., 1995).*

Preparação da curva padrão de Quercetina

Concentrações crescentes de quercetina foram preparadas em solução etanóica. Em duas séries de tubos de ensaio, com e sem nitrato de alumínio, adicionou-se 0,5mL da amostra (quercetina) em cada um.

Nos tubos que receberiam nitrato, adicionou-se 4,3mL de etanol a 80% e nos demais, 4,4mL de etanol a 80%.

Em todos os tubos adicionou-se 0,1mL de acetato de potássio. E, apenas nos que receberiam nitrato, adicionou-se 0,1mL de nitrato de alumínio.

Preparou-se o branco com 4,9 mL de etanol a 80% e 0,1mL de acetato de potássio.

Após 40 minutos medir absorbância em 415nm, zerando com o branco.

Preparação das amostras:

A preparação das amostras foi executada da mesma maneira que a curva padrão de quercetina. No lugar das soluções de quercetina, adicionou-se 0,5mL das tinturas de própolis, cassau e arnica, nas suas respectivas diluições. Posteriormente seguiu-se a mesma sequência citada anteriormente.

A Arnica e a Cassau foram utilizadas nas diluições de 1:5 e 1:10 em solução etanólica, porém, a Própolis apresentou melhores resultados nas proporções de 1:25, 1:50 e 1:100.

Cálculos:

A partir da curva padrão de quercetina realizou-se o seguinte cálculo:

$$Y=(A \cdot ?)+B, \text{ sendo } ?=C-S$$

$$X=(y \cdot 0,8936 \cdot 2 \cdot F)/1000$$

$$[\%] \text{ FLAVONÓIDES TOTAIS} = (X \cdot 1000 / \text{CONC. AMOSTRA}) \cdot 100$$

Onde:

A: Fator A, obtido a partir da equação da curva padrão de quercetina;

B: Fator B, também obtido a partir da curva padrão de quercetina;

C: Absorbância da amostra Com Nitrato;

S: Absorbância da amostra Sem Nitrato;

X: Concentração de Flavonóides expresso em quercetina em mg/mL da solução;

F: Fator de Diluição (ex: 1:5, 1:50);

Conc. da Amostra: Concentração inicial da amostra (ex: 20% =200);

Fator de Correção (quercetina): 0,8936.

PROCEDIMENTO 2: *Determinação do teor de Flavonóides Totais em Hiperosídeo (Metodologia interna descrita pelo laboratório Santosflora, 2009) e Isoquercetina (Farmacopéia Portuguesa 6ª ed. – Supl. 1998), nos extratos secos.*

Ambas as metodologias são idênticas, diferenciando apenas na preparação do Branco. Após a análise de estruturas do Hiperosídeo e da Isoquercetina, verificou-se que ambos apresentam o mesmo grupo cromóforo, portanto podem ser identificados pela mesma metodologia:

Realizou-se a extração da amostra seca em acetona, sob refluxo. Denominou-se o extrato obtido de solução-estoque1. Posteriormente preparou-se a solução-estoque2, submetendo o extrato em acetato de etila, em funil de separação, lavando com água destilada e filtrando em sulfato de sódio anidro.

A amostra foi preparada adicionando-se 10mL da solução-estoque2 em balão volumétrico de 25 mL, 1mL de solução reagente de cloreto de alumínio e o volume completado com solução de ácido acético 5% em metanol.

Após 30 minutos medir a absorbância em 425 nm, zerando com o branco.

Branco:

Transferir 4 mL de acetona para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com solução de ácido acético 5% em metanol.

Cálculo:

$$[\%] \text{ Flavonóides} = (\text{Abs}/p) \cdot 1,25$$

Onde:

Abs = absorbância medida;

P = peso da droga (g);

PROCEDIMENTO 3: *Adaptação do PROCEDIMENTO 2 nas tinturas.*

Escolheu-se empregar tinturas de Arnica e Cassau nas proporções de 1:10, e a Própolis, na proporção de 1:50.

Aplicou-se o PROCEDIMENTO 2 a partir da preparação da solução-estoque 2, exatamente como descrito.

PROCEDIMENTO 4: *Aplicação da solução-estoque 1 (obtida no segundo procedimento) no PROCEDIMENTO 1.*

Utilizou-se a solução-estoque 1 como amostra, pura e diluída em solução etanólica. Porém, as amostras puras apresentaram melhores resultados.

O procedimento foi realizado exatamente como o primeiro.

PROCEDIMENTO 5: *Determinação do teor de Flavonóides Totais em Rutina (Metodologia descrita por Santos e Blatt, 1998) nas tinturas e extratos secos.*

Utilizou-se neste procedimento as tinturas e a solução-estoque 1 de Própolis, Cassau e Arnica.

As tinturas foram diluídas nos respectivos alcoóis em que foram preparadas, nas proporções de 1:50 para a Própolis e 1:10 para as duas últimas. Já a solução-estoque 1 foi utilizada sem diluir.

Preparação da curva padrão de Rutina:

Alíquotas de 3,5 a 7,5mL da solução de Rutina 100 µg/mL (com intervalos de 0,5 mL) em balão volumétrico de 50 mL, acrescidas de 1 mL de cloreto de alumínio 5% em metanol, completando com metanol a 70%.

Preparou-se o branco com 1 mL de cloreto de alumínio 5% em metanol, acrescido com metanol a 70% em balão volumétrico de 25 mL.

Após 30 minutos mediu-se a absorbância em 425nm, zerando com o branco.

Preparação das amostras:

A preparação das amostras foi realizada da mesma maneira citada acima, adicionando-se 15mL das mesmas em balão volumétrico de 50mL. Procedeu-se o restante de forma idêntica.

Os cálculos são os mesmos realizados no primeiro procedimento, com exceção ao fator de correção da rutina, que é igual a 0,94427.

4. Resultado e Discussão

Todos os procedimentos apresentaram-se viáveis para a quantificação de flavonóides totais nas condições dos laboratórios disponíveis para o mesmo. Os métodos são simples e requerem o uso de poucos reagentes e de baixo custo.

Os procedimentos 3 e 4 foram realizados apenas para verificar a versatilidade dos procedimentos 1 e 2, pois o que se busca é uma metodologia que quantifique flavonóides totais em diferentes tipos de amostras (no caso, tinturas e extratos secos). Ambos os procedimentos foram realizados com sucesso, comprovando esta versatilidade.

A Tabela 1 apresenta os resultados das três principais metodologias – quercetina, hiperosídeo/isoquercetina e rutina – para cada tipo de amostra (tintura e solução-estoque 1), da Própolis, Cassau e Arnica, assim como o desvio padrão entre elas. Posteriormente aplicou-se nos resultados o teste F, teste t, teste de Tukey e de Duncan, verificando se há significância nos resultados (Tabela 2).

Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 1%. O valor de F na tabela é 30,8, logo, para este teste os desvios não foram significativos. No teste t e de Duncan, o procedimento de quantificação de flavonóides totais por rutina apresentou significância nas amostras de Própolis, demonstrando uma diferença média significativamente maior que o valor absoluto da diferença média (d.m.s.).

O doseamento de fitoterápicos é feito através de um ou mais marcadores, que são substâncias químicas definidas presentes no fitoterápico e que o caracteriza. Sendo assim, o procedimento de rutina tem menor sensibilidade para quantificação de flavonóides totais na Própolis e não pode ser considerado, portanto, como uma metodologia viável, pois não quantifica qualquer espécie de amostra.

Entre os tipos de amostra, a diferença entre os resultados não foi significativa, ou seja, a quantificação de flavonóides totais pode ser realizada tanto em tinturas quanto em extratos secos (solução-estoque 1).

5. Considerações Finais

Este projeto realizou a aplicação dos três principais procedimentos para a quantificação de flavonóides totais – quercetina, hiperosídeo/isoquercetina e rutina. Comparando-os verificou-se que o procedimento rutina não é versátil, pois apresentou menor sensibilidade para a análise de Própolis. Os procedimentos de determinação por quercetina e hiperosídeo/isoquercetina, por sua vez, apresentaram bons resultados entres as diferentes condições de amostra e nenhuma significância.

Levando em consideração as condições de laboratório, os reagentes e o tempo para realização dos procedimentos, conclui-se que o PROCEDIMENTO 1 que faz quantificação de flavonóides totais em quercetina (método descrito por Park et al., 1995) é viável para quantificação de qualquer tipo de amostra, seja esta em forma de tintura ou extrato seco.

Referências Bibliográficas

- BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.
- CAFITO. **Fitoterapia**. Crf-sp, São Paulo, jul. 2009.
- HUBINGER, Silviane Zanni. **Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosméticos de ação antioxidante dos frutos de (*Dimorphandra mollis* Benth. (*Leguminosae Caesalpinioideae*))**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, 2009.
- MENDES, A.D.R. et al. **Produção de biomassa e de flavonóides totais por fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) sob diferentes níveis de fósforo em solução nutritiva**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.7, n.2, 2005.
- OLIVEIRA, Marcos André Cunha de. **Fitoterápico: Perfil Fitoquímico, Controle e Validação da Metodologia Analítica**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Ufpe, Recife, 2005.
- POZZI, Alessandra Cristina Soares. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides do "Maracujá": *Passiflora alata* e *Passiflora edulis***. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Usp, São Carlos, 2007.
- SANTOS, M.D. dos; BLATT, C.T.T. **Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado**. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 21, n. 2, ago. 1998. Disponível em:

Anexos

Tabela 1 - Comparação entre as principais metodologias - quercetina, hiperosidoisqueretina e rutina – considerando os diferentes tipos de amostra (tintura e solução-estoque 1) da Própolis, Cassau e Amica.

	QUERCETINA		HIPER./ISOQ.		RUTINA		Média	± D.P.
	Tintura	S-E 1	Tintura	S-E 1	Tintura	S-E 1		
Própolis	2.58%	2.92%	2.16%	2.38%	1.60%	1.33%	2.17%	± 0.60%
Cassau	0.00%	0.00%	0.02%	0.05%	0.10%	0.21%	0.06%	± 0.08%
Amica	1.12%	0.93%	1.00%	0.85%	1.02%	0.725%	0.94%	± 0.14%

Tabela 2 - Análise estatística entre as metodologias - quercetina, hiperosidoisqueretina e rutina – da Própolis, Cassau e Amica. Aplicação do teste F, teste t, teste de Tukey e de Duncan.

	Valor F				d.m.s.			
	Teste F	Teste t	Teste Tukey	Teste Duncan	Teste F	Teste t	Teste Tukey	Teste Duncan
Própolis	19.76	1.197	1.535	1.205				
Cassau	6.1	0.272	0.349	0.274				
Amica	0.504	0.908	1.165	0.914				