

QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES EM EXTRATOS DE *Passiflora* spp.

**Igor Kennedy Pereira de Oliveira¹; Clayton Queiroz Alves²; Anne Ramos de Santana³;
José Luiz Carneiro Rocha⁴; Hugo Neves Brandão⁵**

1. Bolsista PROBIC, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: igor.kennedy@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: cleiroz@gmail.com
3. Colaborador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: anneramosdesantana@gmail.com
4. Colaborador, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: luiz_farmaco@hotmail.com
5. Colaborador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hugo@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Metabólitos secundários, Passifloraceae, Cromatografia

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é o mais importante da família Passifloraceae, visto que espécies deste gênero são frequentemente empregadas na medicina popular principalmente devido às suas propriedades sedativas e ansiolíticas. As folhas de várias espécies de *Passiflora* são usadas popularmente sob a forma de chás, como calmante e suave indutor do sono (COSTA, 2013). Além disso, o gênero *Passiflora* está incluso na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse no SUS de 2010 (RENISUS), como plantas medicinais que podem gerar produtos de interesse no desenvolvimento de fitoterápicos para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinadas doenças. Desta forma, o Ministério da Saúde incentiva estudos com os gêneros presentes no RENISUS, evidenciando a importância do estudo do gênero *Passiflora*. De acordo com Ferreira (2006), no Brasil, o acervo de germoplasma de *Passiflora* consta de mais de 57 espécies e 599 acessos, sendo que o banco de germoplasma da Embrapa apresenta o maior número de acessos, incluindo híbridos do programa de melhoramento genético. Apesar do grande interesse pelo estudo de plantas com reconhecida atividade medicinal, ainda existem espécies do gênero *Passiflora* que não foram estudadas do ponto de vista fitoquímico. Os flavonoides se apresentam em abundância no gênero *Passiflora*. A importância farmacológica torna-os a classe de compostos com maior interesse de estudo. Os mesmos são responsáveis pela atividade ansiolítica apresentada por algumas espécies, sendo alguns desses flavonoides considerados marcadores quimiotaxônicos (SAKALEM et al., 2012). Atualmente a técnica mais utilizada, e uma das principais, para a detecção e quantificação de flavonoides é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na região do UV-Visível através de um sistema de arranjo de díodos (CLAE-DAD) (GOMES, 2013).

METODOLOGIA

A coleta das folhas dos dois acessos de *P. suberosa* (BGP 152 e BGP 193) e do Híbrido fruto de cruzamento genético desses acessos (BGP 152 x 193) foi realizada em abril de 2015 na cidade Cruz das Almas – Bahia, na EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. O material vegetal foi submetido à secagem em estufa (45±3 °C) até peso constante, trituração em liquidificador industrial das partes aéreas da planta e, posteriormente, extração por maceração utilizando metanol como solvente extrator, onde foi obtido o extrato metanólico bruto, o qual foi fracionado por partição com solventes de diferentes polaridades, obtendo-se as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila. Os extratos secos obtidos foram submetidos à técnica de CLAE-DAD para traçar o perfil químico da espécie em estudo pelo método

determinado. A separação cromatográfica foi realizada em coluna fase reversa LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna apropriada da Merck. O gradiente de eluição utilizado foi solução de ácido acético 0,7% e acetonitrila (MeCN): ácido acético 0,7% (8:2) especificado na Tabela 1. As condições cromatográficas incluíram: fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20µL, faixa de comprimento de onda de 200-400 nm.

Tabela 1 – Gradiente de eluição

Tempo (min)	Ácido Acético %	Ácido Acético + MeCN %
0:00	88	12
10:00	80	20
30:00	75	25
30:01	70	100
33:00	0	100
36:00	88	12
38:00	88	12

Os cromatogramas foram comparados, em diferentes comprimentos de onda, quanto ao número de picos e a resolução dos mesmos. A presença dos marcadores vitexina, orientina, isovitexina e isoorientina foi detectada na análise cromatográfica em diversas frações analisadas. Esses flavonoides foram identificados no cromatograma através da comparação das bandas no UV apresentadas com a de seus padrões comerciais, bem como do tempo de retenção que os mesmos apresentaram no método, além de fortificação das frações, tendo seus valores quantificados. O método foi validado de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, especificados em a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações da vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina foram calculadas a partir da curva de calibração. As equações de regressão foram obtidas a partir da curva de calibração para investigar linearidade. Todas as curvas de calibração dos compostos exibiram coeficiente de correlação (R²) acima de 0,99. O maior LD (Limite de detecção) encontrado foi de 0,609 µg/mL, enquanto o maior LQ (Limite de quantificação) foi de 2,033 µg/mL, mostrando alta sensibilidade para todos os compostos. A equação de regressão, o coeficiente de correlação (R²) e os LD e LQ dos 4 compostos foram dados na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados da regressão linear, limite de detecção e limite de quantificação das 3 substâncias identificadas

Substância	Intervalo (µg/mL)	Equação da reta	R ²	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Vitexina	5,0-500,0	$y = 1158,1x + 3,157$	0,9999	0,609	2,033
Isovitexina	1,0-300,0	$y = 1742,7x + 6,1224$	0,9991	0,120	0,402
Orientina	5,0-500,0	$y = 1039,3x + 0,671$	0,9999	0,086	0,287
Isoorientina	1,0-300,0	$y = 2030,6x + 10,135$	0,9976	0,125	0,417

*y= área do pico. x= concentração injetada

A precisão foi avaliada pelo teste de repetibilidade, usando três concentrações diferentes de soluções padrão. Os valores de desvio padrão relativo (DRP) ficaram todos abaixo do preconizado, ou seja, menores que 5,0%. A exatidão deste método foi determinada pelo teste

de recuperação, também usando três concentrações diferentes de soluções padrão. As recuperações variaram de 80 – 106 % em todas as concentrações testadas das 4 substâncias. Os resultados da quantificação encontram-se apresentados na Tabela 3, mostrando a variação das substâncias encontradas nos diferentes extratos.

Tabela 3 - Valores da quantificação de vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina nas espécies analisadas

Substância	BGP 152 Concentração (µg/mL)			
	Extrato Bruto	Fração Hexânica	Fração Clorofórmica	Fração Acetato
Vitexina	**	-	6,25	24,30
Isovitexina	**	-	3,88	11,75
Orientina	**	-	-	46,24
Isoorientina	**	-	1,66	19,63
Substância	BGP 193 Concentração (µg/mL)			
	Extrato Bruto	Fração Hexânica	Fração Clorofórmica	Fração Acetato
Vitexina	-	-	-	-
Isovitexina	-	-	11,82	-
Orientina	-	-	-	-
Isoorientina	-	-	10,38	-
Substância	BGP 152x193 Concentração (µg/mL)			
	Extrato Bruto	Fração Hexânica	Fração Clorofórmica	Fração Acetato
Vitexina	1,94	-	14,11	12,13
Isovitexina	0,68	-	9,97	2,57
Orientina	-	-	-	18,98
Isoorientina	**	-	6,43	**

- Substância não detectada; ** Valores abaixo da curva de linearidade

O extrato bruto da BGP 152 apresentou 4 substâncias quantificadas, contudo em baixas concentrações, o que fez com os valores ficassem abaixo da faixa de linearidade e do LQ, não permitindo sua quantificação. Da mesma forma ocorreu com a isoorientina no extrato bruto e na fração acetato da BGP 152x193. No geral, as frações acetato e clorofórmio foram as que apresentaram maiores valores de teores das 4 substâncias, evidenciando maior afinidade desses flavonoides com o clorofórmio e o acetato de etila. Na espécie BGP 193, só foi possível encontrar a presença da isovitexina e isoorientina na fração clorofórmica. Já a orientina apresenta-se apenas nas frações acetato de BGP 152 e BGP 152 x 193, o que sugere que a espécie BGP 152 x 193, fruto de melhoramento genético das espécies BGP 152 e BGP 193, herdou a presença dos flavonoides analisados em suas frações do parental BGP 152.

Entretanto nos extratos de BGP 152 foram encontradas maiores concentrações dos flavonoides na fração acetato de etila, já no BGP 152x193 a fração clorofórmica apresentou maior concentração dessas substâncias na fração clorofórmica com exceção da orientina. Este fato pode ser melhor compreendido tendo em vista a variação da composição de metabólitos secundários de cada acesso, o que pode causar deslocamento na retenção desses compostos pelo solvente devido aos diferentes graus de afinidade, uma vez que com clorofórmio é possível realizar a extração de lignanas, flavonoides, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos e cumarinas; enquanto que o acetato de etila possibilita a extração de flavonoides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos em geral (CECHINEL FILHO; YUNES 1998). Estes outros não foram quantificados nesse estudo. Os resultados da validação apresentaram valores de linearidade, exatidão, precisão, Limite de Quantificação e

Limite de Detecção de acordo com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA. Os dados encontrados corroboram com os valores presentes em literatura. Zucolotto (2011) conseguiu identificar por CLAE-DAD flavonoides glicosilados em extrato bruto de sete espécies de *Passiflora*, dentre elas a *P. quadrangulares*, reforçando a presença desses flavonoides extensivamente no gênero.

CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a avaliação da composição química de espécimes de *P. suberosa* e de seu Híbrido, oriundas de cruzamento genético através da análise por CLAE-DAD. Foi possível também quantificar os marcadores químicos vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina nos espécimes, mostrando a maior presença do marcador orientina nas frações estudadas. A presença dos marcadores nas frações da BGP 152x193 permite inferir uma possível herança genética transmitida dos espécimes parentais para o Híbrido.

REFERENCIAS:

BRASIL. 2003. Ministério da Saúde Resolução, Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL. 2009. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RENISUS. Brasília: Anvisa.

CECHINEL FILHO, V.; YUNE, R. A. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. *Química Nova* 21 (1): 99-105.

COSTA, G. M., 2013. Estudo químico de espécies brasileiras e colombianas do gênero *Passiflora*. Universidade Federal de Santa Catarina. Tese.

FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) 2005. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados.

GOMES, S. V. F. 2013. Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero *Passiflora*. Universidade Federal da Bahia. Tese.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO) 2003; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008.

SAKALEM, M. E.; 2012. NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22: 1219-1232.

ZUCOLOTTO, S. M. et al. 2011. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical analysis* 23: 232-239.