



Doseamento de flavonoides totais das partes aéreas de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)

Camila Bezerra Melo Figueirêdo¹; Lariza Darlene Santos Alves¹; Caio César de Andrade Rodrigues Silva¹; Mônica Felts de La Roca Soares²; Pablo de Ataíde Ferreira¹; Rosali Maria Ferreira da Silva¹; Pedro José Rolim-Neto^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Recife, PE, Brasil.

²Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Thuja occidentalis é largamente utilizada na forma de tinturas, sendo os flavonoides metabólitos de interesse da espécie, visto as distintas atividades farmacológicas citadas na literatura. Contudo, não há descrito método para a quantificação desses, sendo objetivo desse trabalho desenvolver um método colorimétrico direto utilizando cloreto de alumínio (AlCl₃) por espectrofotometria UV, a fim de proporcionar a quantificação de flavonoides totais, expresso em rutina. Para tal, avaliaram-se os seguintes parâmetros: concentração da solução hidroalcoólica (SH) (20, 40 e 70%); interferentes lipofílicos; volume da solução de AlCl₃ 2,5% (1, 2 e 3 mL) e proporção de droga vegetal (0,5, 1, 1,5 g). Adicionalmente, procedeu-se a validação. A partir da avaliação dos interferentes lipofílicos, selecionou-se a SH 40% utilizando 1 g da droga vegetal. A cinética de complexação, demonstrou que a formação do complexo flavonoides-Al⁺³ é lenta, sendo o tempo de leitura ideal de 30 min no $\lambda=403$ nm, após a adição de 2 mL de AlCl₃ 2,5%. A rutina foi utilizada a conversão de absorvância em teor de flavonoides totais, uma vez que a espécie possui a presença majoritária de derivados quercetínicos do grupo flavonol na sua forma glicosilada. O método atendeu a todos os requisitos indicados para validação de uma matriz vegetal, considerando os fatores inerentes da espécie, possibilitando sua utilização na prática laboratorial.

Palavras-chave: *Thuja occidentalis*. Árvore da vida. Flavonoides. Rutina.

INTRODUÇÃO

Thuja occidentalis Linn., conhecida como árvore da vida, é uma planta endêmica do leste da América do Norte e cultivada no norte da Europa e Brasil como árvore ornamental (Chang *et al.*, 2000). Para fins medicinais, é largamente utilizada na forma de tinturas e preparações homeopáticas como agente expectorante, diurético, anti-helmíntico, no tratamento do reumatismo, bronquite, carcinoma do útero, entre outras aplicações (Alves *et al.*, 2014). A tintura de *T. occidentalis* destaca-se pela utilização em verrugas, papilomas, condilomas, excrescências de diversos tipos, principalmente relacionadas ao *Papilomavirus humano* (HPV) no trato genital inferior (Figueirêdo *et al.*, 2013; Tsiri *et al.*, 2009; Fetrow & Avila, 2000; Bergo *et al.*, 2000). Seu efeito é atribuído principalmente à atividade imunestimulante e antiviral, através da proliferação de linfócitos T e a produção de interleucina-2 (Naser *et al.*, 2005).

A composição química evidencia a presença de uma série de compostos, dentre eles saponinas, fenóis, taninos, mucilagens, compostos lactônicos, carotenos, triterpenos, esteróides (Castellón *et al.*, 2000), açúcares redutores, cumarinas (ácido p-cumárico e umbelliferona), ácido tânico e proteínas (Naser *et al.*, 2005); destacando-se os óleos essenciais, característicos do gênero *Thuja*, cujos estudos frequentemente avaliam a sua composição química, principalmente para análise de variedades e ecotipos (Svajdlenka *et al.*, 1999; Tsiri *et al.*, 2009).

Contudo, os flavonoides também constituem um grupo de metabólitos representativo da espécie (Castellón *et al.*, 2000; Naser *et al.*, 2005), sendo este representados por (+/-)-catequina, miricetina, quercetina, quercitrina, canferol, canferol-3-O- α -ramnosídeo (Naser *et al.*, 2005), além dos biflavonoides bilobetina e amentoflavona (Alves *et al.*, 2014). Esse importante grupo químico foi identificado na fração etanólica das partes aéreas de *T. occidentalis* em vários estudos farmacológicos relacionados com as atividades hepatoprotetora (Dubey & Batra, 2008a), antidiabética (Dubey & Batra, 2008b),

Autor correspondente: Pedro José Rolim Neto, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Av. Prof. Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária - CEP 50740-521 - Recife, PE, Brasil. e-mail: pedro.rolim@pq.cnpq.br

anti-tumoral (Ojeswi, 2010; Madhuri & Pandey, 2009), anti-ulcerativa (Dubay & Batra, 2009a), antioxidante (Dubey & Batra, 2009b) e hipolipidêmica (Dubey & Batra, 2009c).

A constatação desse grupo de metabólitos como substâncias fenólicas majoritárias na espécie, foi confirmada através de análises prévias realizadas por cromatografia de camada delgada (CCD) (Figueirêdo, 2014), indicando a necessidade de um método que permita a quantificação desses metabólitos, visto a sua correlação com distintas propriedades farmacológicas de interesse.

A determinação de flavonoides totais é amplamente utilizada como controle para drogas vegetais, extratos e produtos acabados para diversas espécies, tais como de *Passiflora incarnata* L. (Ziliotto *et al.*, 2012); *Phyllanthus niruri* L. (Soares *et al.*, 2003); e *Bauhinia cheilantha* S. (Peixoto-Sobrinho *et al.*, 2010), entre outras; sendo estes detectados e/ou doseados pelas técnicas espectroscópicas e cromatográficas (Petry *et al.*, 2001).

Apesar da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ser mais eficiente para o controle de qualidade de matrizes vegetais, faz-se necessária a introdução inicial de alternativas mais acessíveis, rápidas e menos onerosas para o doseamento de certos constituintes das drogas vegetais na rotina laboratorial. Dentre as técnicas que se enquadram nesse contexto, destaca-se a espectrofotometria UV-Vis (Peixoto-Sobrinho *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2010). Contudo, a pouca seletividade tem sido um dos maiores desafios dessa técnica para análise de extratos vegetais, pois a espectrofotometria direta pode ocasionar sobreposição das bandas, impedindo a absorção do componente de interesse (Marques *et al.*, 2012). Embora a espectrofotometria UV não substitua outras técnicas de doseamento, pode ser utilizada como uma técnica auxiliar de relevância nesse contexto.

Uma das estratégias utilizadas na quantificação de flavonoides por espectrofotometria UV é método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl_3), comumente utilizado na prática. Neste, o cátion Al^{3+} forma complexos estáveis com os flavonoides, deslocando a absorção destes para faixas de comprimentos de onda maiores, específicos para cada classe de flavonoides, evitando a interferência de outras substâncias fenólicas (Petry *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2012). Contudo, sabe-se também que fatores como tempo e do tipo e concentração de flavonoides podem influenciar os resultados e, portanto, fazem-se necessários cuidados com a padronização da técnica (Soares, *et al.*, 2003).

Diante do interesse terapêutico dos compostos flavonoides presente nessa espécie, associada à necessidade de quantificação destes e a ausência de métodos analíticos descritos na literatura para o seu doseamento, este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método para quantificação dos flavonoides totais, expressos em rutina, por diluição direta com AlCl_3 para as partes aéreas de *T. occidentalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas amostras das partes aéreas de *T. occidentalis* coletadas no município do Cabo de Santo Augustinho - PE (8°29'86,07"S e 35°06'45,29"W), nos meses de maio e junho de 2011. Dentre os parâmetros para a coleta do material, foram selecionadas partes aéreas em igual estágio de desenvolvimento e com ausência de depredação. A identificação foi realizada pela pesquisadora e curadora Dra. Rita de Cássia Araújo Pereira e a exsiccata depositada no Herbário Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob o nº 87.752.

O material vegetal fresco foi lavado com água purificada e aspergido com álcool a 70% (v/v). Em seguida, foi colocado em estufa de ar circulante (Fabbe-Primar®) por 120 h a 40 °C. Após secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas (Adamo® modelo 340) com tamis de 20 mesh (0,84 mm) e acondicionado em recipiente de vidro, devidamente vedado e mantido em ausência de luz. O tamanho médio das partículas foi de 484 μm , determinado por tamisação. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Método

Seleção do comprimento de onda e diluição das amostras

Foram preparadas amostras a partir de um volume pré-definido (3,5 mL) da solução extrativa (SE) adicionada de 2 mL de solução metanólica de AlCl_3 (2,5%, m/v) e diluída para quantidade suficiente para 25 mL com etanol a 40% (v/v). Após 30 min da adição do AlCl_3 , foram obtidos espectros das amostras na faixa de 200 a 500 nm quando submetidas a varredura em espectrofotômetro (UV/Vis-mini 1240, Shimadzu®), sendo determinado o comprimento de onda a partir da avaliação dos picos máximos observados no espectro obtido. Utilizou-se como branco uma solução de compensação preparada da mesma forma que as amostras, sem adição da solução de AlCl_3 .

Desenvolvimento do método analítico

No desenvolvimento do método analítico foram avaliados os seguintes parâmetros: avaliação da cinética de complexação (15, 30, 45 e 60 min), volume da solução de cloreto de alumínio a 2,5% (m/v) (1, 2 e 3 mL), concentração da solução hidroalcoólica extrativa (20%, 40% e 70% v/v), interferentes lipofílicos e quantidade de droga vegetal (0,5; 1,0; 1,5 g), conforme descrito a seguir.

Avaliação da cinética de complexação e volume da solução de cloreto de alumínio

Para a determinação do tempo adequado de leitura, avaliou-se a cinética de complexação nos intervalos de 15, 30, 45 e 60 min, após adição dos volumes (1 mL, 2 mL e 3 mL) da solução de AlCl_3 2,5% (m/v), na faixa de 200 a 500 nm.

A definição do volume da solução de AlCl_3 a 2,5% (m/v), pré-determinados de acordo com os estudos realizados por Petry *et al.*, (2001) e Marques *et al.* (2012), foi realizada após a definição do tempo ótimo de complexação. Os resultados foram expressos a partir da média de três determinações. Para essas análises utilizou-se a SE de 40%.

Avaliação da concentração da solução hidroalcoólica

Realizou-se a extração de 1 g da droga vegetal com etanol a 20%, 40% ou 70% (v/v), de acordo com o procedimento geral para quantificação de flavonoides. As soluções hidroalcoólicas preparadas foram verificadas em relação à graduação em graus Gay-Lussac (°GL). As absorvâncias foram determinadas na faixa de 200 a 500 nm após 60 min da adição de 2 mL de AlCl_3 a 2,5% (m/v). Utilizou-se como parâmetro adicional a avaliação dos interferentes lipofílicos, conforme Petry *et al.* (1998). Os resultados foram expressos a partir da média de três determinações.

Avaliação dos interferentes lipofílicos

Avaliou-se a interferência das substâncias lipofílicas (clorofila e óleos voláteis, por exemplo) sobre as absorvâncias apresentadas nas amostras obtidas a partir da SE em 403 nm, previamente definido na seleção do comprimento de onda. Na obtenção da SE foram fixados os parâmetros de concentração da droga vegetal (1 g) e de AlCl_3 a 2,5% (m/v).

Inicialmente, uma alíquota de 5 mL de uma solução de ativação etanol:água (1:1, v/v) foi transferida para uma coluna de extração em fase sólida Strata Phenomenex® (C18E 100 mg/mL). Após eluição, à vácuo, a solução coletada foi desprezada. Após ativação, foram aplicadas sobre a coluna alíquotas de 1,4 mL da SE, seguida de 5 mL da solução hidroalcoólica utilizada na extração. A solução foi coletada (fração A) e transferida para balão volumétrico de 10 mL, correspondendo à concentração final de 1,4 mg/mL. Neste balão, foram adicionados 2 mL de AlCl_3 a 2,5% (m/v) e seu volume foi completado com a respectiva solução hidroalcoólica. Recolhida a fração A, passaram-se na coluna 5 mL de éter de petróleo, sendo a amostra eluída (fração B) recolhida e transferida para um segundo balão volumétrico de 10 mL. A este também foram adicionados 2 mL de AlCl_3 (2,5%, m/v) e completado o volume com éter de petróleo. O mesmo procedimento foi repetido para a obtenção das soluções de compensação de ambas as frações, sem adição da solução de AlCl_3 . Os espectros de absorção da fração A e B, compreendidos na faixa de 200 a 500 nm, foram obtidos 60 min após a adição de AlCl_3 . Paralelamente, foram preparadas as soluções-controle (Petry *et al.*, 1998).

Avaliação da quantidade de droga vegetal

Foram avaliadas 0,5; 1 e 1,5 g da droga vegetal, que foram submetidos ao procedimento geral de quantificação utilizando etanol a 40% (v/v). A absorvância foi determinada

por espectrofotometria a 403 nm após 30 min utilizando 2 mL de AlCl_3 2,5% (m/v).

Procedimento geral para quantificação de flavonoides totais

Pesou-se a droga vegetal (1 g) que foi transferida para um balão de fundo redondo de 250 mL e adicionado de 30 mL da solução hidroalcoólica. Após mistura, o balão foi acoplado em condensador e submetido a refluxo por 30 min. Após resfriado por 10 min a temperatura ambiente, o extrato foi filtrado com uma pequena quantidade de algodão para balão volumétrico de 100 mL. O resíduo da droga e o algodão foram resubmetido ao refluxo com mais 30 mL do mesmo solvente por 10 min. O procedimento foi repetido mais uma vez. O volume foi completado para 100 mL com a solução hidroalcoólica, originando a SE (Petry *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2012).

Alíquota de 3,5 mL da SE foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se os volumes pré-determinados (1 mL, 2 mL e 3 mL) da solução de AlCl_3 a 2,5% (m/v), em seguida, o volume foi ajustado com solução hidroalcoólica. Após adição da solução de AlCl_3 e o tempo estabelecido para a complexação, as absorvâncias foram determinadas no espectrofotômetro previamente determinado na seleção do comprimento de onda (403 nm). Utilizou-se como branco uma solução de compensação preparada da mesma forma que as amostras, sem adição da solução de AlCl_3 .

O teor de flavonoides totais (TFT) foi expresso em percentagem total (% m/m) do conteúdo de flavonoides, calculado em rotina, conforme equação abaixo:

$$TFT = \frac{A \times FD}{m \times E_{1\text{cm}}^1} \quad (1)$$

onde: TFT = teor de flavonoides totais; A = absorvância lida; FD = fator de diluição; m = massa da droga seca (g); $E_{1\text{cm}}^1 = 171,65$ (absorção específica do complexo rutina com cloreto de alumínio).

Posteriormente, o TFT foi convertido para mg de rutina por 100 g de droga seca. Para obtenção da massa da droga vegetal seca utilizou-se o resultado da perda por dessecação, previamente realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5 ed. (2010).

Validação dos procedimentos analíticos

Para validação do procedimento analítico de diluição direta foram avaliados os parâmetros de especificidade, robustez, linearidade, intervalo, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade). A confiabilidade dos parâmetros avaliados foi observada pelo coeficiente de variação (CV%). Para cada parâmetro avaliado, foi determinado um CV% menor que 5% (Brasil, 2003) e tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) *One-Way* ou *Two-Way*, quando aplicável, com um nível de significância de 95%.

Especificidade

Esse parâmetro foi verificado através da sobreposição dos espectros das amostras obtidas a partir da SE com e sem adição de AlCl_3 (2,5% m/v) e do padrão de rutina, obtidos no intervalo de comprimento de onda compreendido de 200 a 500 nm.

Linearidade, limites de detecção e quantificação

A linearidade foi verificada a partir da análise de três curvas construídas com a solução extrativa, em cinco níveis de concentração: 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 e 1,8 mg/mL, correspondendo a um intervalo de aproximadamente 70 a 150%. As curvas foram construídas empregando-se os valores médios das absorvâncias obtidas a partir das triplicatas em cada nível de concentração testada, em função da concentração. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2), adotando $R^2 \geq 0,98$ como valor mínimo para aceitação (Anvisa, 2012). Adicionalmente, realizou-se a análise de resíduo na regressão da curva analítica.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações $\text{LD} = \text{DPA} \times 3/\text{IC}$ e $\text{LQ} = \text{DPA} \times 10/\text{IC}$, onde DPA é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, obtido das três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas (Brasil, 2003).

Robustez

O ensaio para determinação da robustez foi realizado a partir da variação dos seguintes parâmetros: fabricante do álcool etílico absoluto (Vetec® e Dinâmica®), estabilidade da SE na presença de luz à temperatura ambiente após 24 h, estabilidade da solução de AlCl_3 no período de 24 h. Os resultados foram expressos a partir da média de três determinações.

Precisão

A precisão do método foi avaliada nos níveis de repetitividade (precisão intracorrída), precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade foi verificada por seis determinações individuais a 100% da concentração teste (1,4 mg/mL). Para o parâmetro precisão intermediária (precisão intercorrídas) três réplicas foram analisadas a variação entre dois analistas em dois dias diferentes, ambas também na concentração de 100%. A reprodutibilidade foi realizada em espectrofotômetro UV distintos, utilizando triplicata de amostras.

RESULTADOS

Desenvolvimento do método analítico

Seleção do comprimento de onda, avaliação da cinética e do volume de cloreto de alumínio

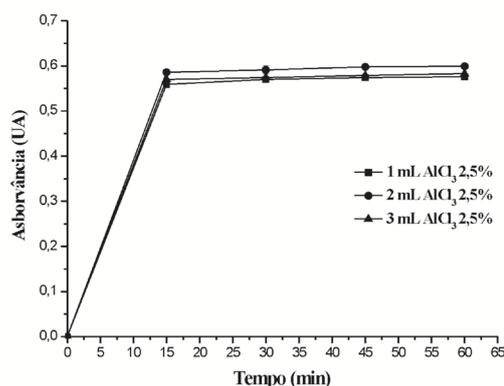


Figura 1 - Avaliação da cinética de complexação com diferentes volumes de AlCl_3 .

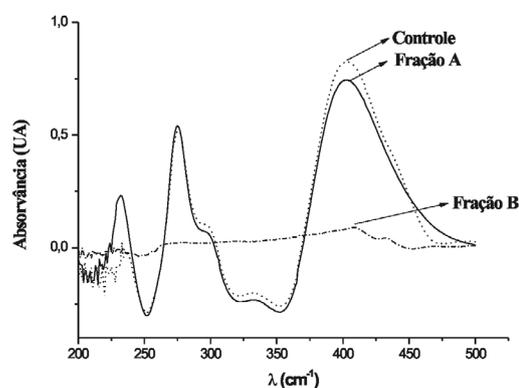


Figura 2 - Espectros de absorção da fração hidroalcoólica a 70% (fração A), fração de éter de petróleo (fração B) e controle na faixa de 200 a 500 nm.

Observou-se que a cinética de complexação do AlCl_3 com os flavonoides apresenta um perfil lento com comprimento de onda máximo de 403 nm (Figura 1), independente do volume utilizado, sendo este o comprimento de onda selecionado para as leituras das amostras. Adicionalmente, através da análise das curvas e dos dados brutos, observou-se que as absorvâncias não sofrem alterações significativas após 30 min.

A avaliação do volume da solução de AlCl_3 , por sua vez, está apresentada na Tabela 1:

O máximo de absorvância foi observado no volume de 2 mL, havendo um decréscimo dessa com o aumento do volume para 3 mL, indicando que o volume de 2 mL proporciona o máximo de complexação. A análise estatística realizada pela ANOVA *One-Way*, confirma que há diferença estatística entre os volumes testados ($F_{\text{calculado}} = 55,71$; $F_{\text{tabelado}} = 5,14$).

Avaliação da concentração da solução hidroalcoólica

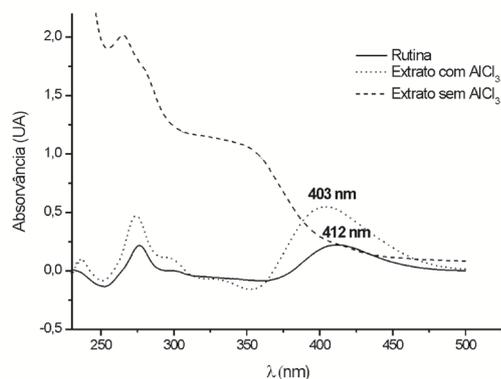


Figura 3 - Espectros de varreduras da análise de especificidade.

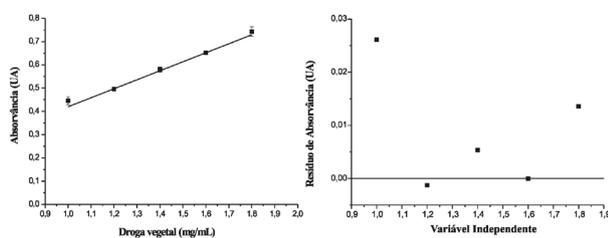


Figura 4 – Gráficos de linearidade e análise de resíduo das médias das curvas.

Tabela 1 – Resultado da avaliação dos volumes testados da solução de $AlCl_3$.

Exp.	$AlCl_3$ (% m/v)	Volume (mL)	Abs (U.A.) \pm dp*
1	2,5	1	0,490 \pm 0,004
2	2,5	2	0,520 \pm 0,003
3	2,5	3	0,506 \pm 0,006

Tabela 2 - Resultados obtidos na análise da precisão intermediária e reprodutibilidade, expressos em concentração de rutina.

Precisão Intermediária				
	Dia 1 (mg/100 g)	Dia 2 (mg/100 g)	Analista	Dia
Analista 1	27,19 \pm 0,14	26,21 \pm 0,07	F calculado= 1,59	F calculado= 4,98
Analista 2	27,14 \pm 0,21	26,78 \pm 0,48	F tabelado= 161,45	F tabelado= 161,45
Reprodutibilidade				
Equipamentos	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média (mg/100 g)
1	26,50	26,69	26,23	26,47 \pm 0,23
2	26,37	26,55	25,55	26,49 \pm 0,11

O incremento na concentração do etanol proporcionou um aumento da absorvâncias proporcionalmente, obtendo-se um coeficiente de correlação linear de 0,98. A partir da análise dos interferentes lipofílicos, a amostra obtida com etanol a 70% (v/v) apresentou na fração A um pico máximo de absorvância no mesmo comprimento de onda da solução-controle (403 nm) (Figura 2). A fração B, por sua vez, apresentou absorvância de 0,09 U.A. em 403 nm, indicando a presença de interferentes lipofílicos. Para a SE obtida com etanol a 40%, não foi verificada absorvância na fração B indicando a ausência de interferentes. Dessa forma, a absorvância apresentada na fração B da SE a 70%, pode ser considerada significativa (Petry *et al.*, 2001), considerando que a diferença entre as médias obtidas com as soluções hidroalcoólicas de 70% e 40% em 403 nm é de 0,0951 U.A. O espectro da SE a 40% não foi ilustrado, por apresentar o mesmo comportamento da solução-controle.

Avaliação da quantidade de droga vegetal

A influência da proporção de droga vegetal sobre a resposta do método analítico foi avaliada na faixa de 0,5 a 1,5 g. A partir do tratamento estatístico realizado, observou-se o comportamento linear ($R^2 = 0,99$) nas absorvâncias verificadas nessa faixa e uma diferença estatisticamente significativa entre essas quantidades da droga vegetal ($F_{\text{calculado}} = 4490,44$; $F_{\text{tabelado}} = 5,14$). As absorvâncias médias obtidas das amostras foram de 0,335 ($\pm 0,005$) U.A. (0,5 g); 0,575 ($\pm 0,004$) U.A. (1,0 g); e 0,824 U.A. ($\pm 0,009$) (1,5 g), a partir da mesma diluição.

Validação dos procedimentos analíticos

Para o parâmetro especificidade, os espectros de absorção das amostras analisadas encontram-se ilustrados na Figura 3.

Para as amostras analisadas, o comprimento de onda máximo determinado para a leitura (403 nm) é distinto do comprimento de onda máximo da rutina isolada (412 nm), demonstrando que o método mostrou-se específico para as amostras ora analisadas, mesmo diante da pequena diferença dos comprimentos de ondas observados.

A partir da análise de linearidade pelo método dos mínimos quadrados, obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,97757 e a equação proposta $Abs = 0,3747x + 0,0589$, não havendo falta de ajuste de acordo com ANOVA. A adequação do ajuste linear à curva de calibração foi confirmada através do gráfico de resíduo, que apresenta erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (Figura 4). Ainda como resultado da avaliação da linearidade, calculou-se os limites de detecção e quantificação. Os resultados encontrados foram de 0,15 mg/mL para LD e 0,23 mg/mL para LQ.

Os resultados obtidos com o parâmetro precisão, precisão intermediária e reprodutibilidade, estão dispostos na Tabela 2. Para o parâmetro repetitividade os resultados apresentaram uma média de 25,80 mg/100 g e CV de 0,73%.

Tabela 3 - Resultados obtidos para os parâmetros de robustez.

Parâmetros	Variáveis	Média (mg/100 g) ± dp	CV%	Fatores
Fabricante de álcool etílico	Vetec®	26,76 ± 0,23	0,84	F calculado= 2,96
	Dinâmica®	26,44 ± 0,23	0,87	F tabelado= 7,71
Estabilidade da SE	0 h	26,44 ± 0,23	0,87	F calculado= 1,32
	24 h	26,24 ± 0,19	0,72	F tabelado= 7,71
Estabilidade da solução de AlCl ₃	0 h	25,99 ± 0,15	0,57	F calculado = 2,00
	24 h	25,74 ± 0,26	1,01	F tabelado = 7,71

Os resultados da robustez estão sumarizados na Tabela 3, em relação aos parâmetros avaliados.

DISCUSSÃO

Conforme observado nos espectros da Figura 1, selecionou-se o comprimento de onda de 403 nm para a medida de absorvância dos flavonoides totais, levando em consideração a absorvância máxima observada dos flavonoides após complexação com Al³⁺.

Na avaliação da complexação do AlCl₃ com os flavonoides presentes em *T. occidentalis*, visando obter o tempo ótimo de leitura, observou-se um perfil cinético de complexação lenta, devido ao fato da absorvância máxima permanecer estável após transcorridos 30 min da adição da solução de AlCl₃. O incremento de 0,003 U.A./5 min observado após esse tempo é irrelevante do ponto de vista das exigências analíticas incidentes no caso de uma matriz vegetal complexa (Petry *et al.*, 1998). Nesse caso, a cinética possibilita a determinação do tempo de leitura das amostras, o qual foi selecionado 30 min, menor tempo de leitura que proporcionou a máxima absorvância.

Para a avaliação da concentração da solução hidroalcoólica utilizada para a preparação da SE, observou-se que quanto maior a concentração da solução hidroalcoólica maior o processo de extração, inclusive sendo verificada uma diferença entre as colorações da SE, apresentando um verde mais intenso à medida que aumentava o grau alcoólico. Contudo, segundo Petry *et al.* (2001) concentrações próximas de 70% extraem um elevado teor de flavonoides, além de interferentes lipofílicos, como clorofila e óleos voláteis, que podem, por sua vez, superestimar os resultados encontrados. Dessa forma, a avaliação dos interferentes lipofílicos se fez de extrema relevância para avaliar a real influência da solução hidroalcoólica no processo extrativo.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se a presença significativa de interferentes lipofílicos na SE com etanol a 70% (v/v) e ausente na de 40% (v/v), sendo esta última selecionada para a continuidade os demais ensaios. Pois o aumento na extração observada para a SE a 70% se deve aos interferentes lipofílicos, e não ao aumento da extração de flavonoides. Devido aos resultados obtidos

com a SE a 40%, não foi necessária a avaliação com a solução hidroalcoólica a 20%.

Para a avaliação do volume da solução de AlCl₃ a 2,5% (m/v), verificou-se que as absorvâncias das amostras são sensíveis às variações de volume, conforme a análise estatística realizada. O volume de 1 mL proporcionou a absorvância mais baixa, indicando uma quantidade insuficiente de AlCl₃ para a complexação com os flavonoides presentes na amostra, desfavorecendo a formação do complexo. A complexação máxima foi atingida com o volume de 2 mL. E para o volume de 3 mL da solução foi observada uma diminuição da absorvância, em relação a 2 mL. Essa diminuição pode estar relacionada ao deslocamento no sentido da descomplexação, devido a maior presença de moles de AlCl₃. De acordo com a literatura, dentre os fatores que exercem influencia na formação do complexo flavonóide-Al³⁺, tem-se a razão entre estes (Marques *et al.*, 2012). Além disso, também há a dependência com as misturas de flavonoides presentes, sendo dessa forma específico e intrínseco para cada droga vegetal (Petry *et al.*, 2001). Dessa forma a quantidade de AlCl₃ é um fator de extrema importância a ser avaliado, inclusive para a espécie em estudo, em que não há estudos descritos na literatura. Logo, de acordo com os dados apresentados, selecionou-se o volume de 2 mL da solução de AlCl₃ a 2,5% (m/v) para o preparo das amostras, a fim de proporcionar a absorvância máxima para a quantificação dos flavonoides.

Em relação à quantidade de droga vegetal, optou-se pela utilização de 1,0 g, que apresentou absorvância média de 0,575, levando-se também em consideração a possibilidade de uma maior quantidade de droga vegetal (1,5 g) poder levar a saturação do solvente.

Para validação deste método, foram realizados os parâmetros indicados para métodos testes de finalidade da categoria I (Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas), de acordo com a RE 899/2003 da ANVISA (Brasil, 2003). Adicionalmente foram calculados os limites de detecção e quantificação, visando uma análise mais detalhada do método proposto.

Na validação, foi utilizada a rutina como flavonóide para a conversão de absorvância em teor de flavonoides totais, baseado em trabalhos descritos na literatura (Castellón *et al.*, 2000; Naser *et al.*, 2005) e na análise fitoquímica realizada pelo nosso grupo de pesquisa, que indicam a presença majoritária de derivados quercetínicos do grupo flavonol, na sua forma glicosilada (Figueiredo *et al.*, 2014). Dentro flavonoides presentes em abundância nessa espécie destaca-se a quercitrina (quercetina-3-O-rhamnosídeo). Nesse contexto, a quercitrina e a rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) são flavonóis que sofreram glicosilação do mesmo grupo hidroxila, possuindo em comum a aglicona quercetina (Garrett, 2014).

Essa aglicona sofre desvio batocrômico, ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda através da formação de

complexos estáveis com o Al^{+3} que se dá pela ligação com grupos hidroxilas livres nas posições 3-,5- e 3'4'-OH, possibilitando a sua quantificação. Logo, a utilização da rotina para determinação de flavonoides totais nessa espécie, utilizando o valor de absorção específica do complexo rutina- Al^{+3} permite uma maior precisão do que tange a determinação total de flavonoides por espectrofotometria no UV para *T. occidentalis*. (Marques *et al.*, 2012; Peixoto-Sobrinho *et al.*, 2012).

Dentre os parâmetros analisados na validação, no parâmetro seletividade observou-se que os espectros das amostras analisadas apresentaram absorvâncias numa faixa semelhante quando complexado com $AlCl_3$, característica dos derivados quercetínicos, mas distinto ao da rutina isolada, visto a presença de outros flavonoides que influenciam no comprimento de absorção máxima da amostra obtida através da SE.

Na linearidade, o gráfico obtido a partir da média das três curvas autênticas comprova a relação linear entre o aumento da concentração do analito e a resposta espectrofotométrica na faixa de intervalo analisado, visto que para drogas vegetais o valor mínimo do coeficiente de determinação é de 0,98; sendo 99,2% da variabilidade experimental explicada satisfatoriamente pela equação obtida.

O método desenvolvido demonstrou ser preciso nos três níveis avaliados: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Na precisão intermediária foi demonstrado que o método é preciso para análises realizadas por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes, estando à variação encontrada dentro dos limites especificados, uma vez que os dados não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA *Two-Way*. Para a reprodutibilidade foi atendida, quando avaliados equipamentos distintos, de acordo com a ANOVA *One-Way* ($F_{\text{calculado}} = 0,01$; $F_{\text{tabelado}} = 7,71$). Para o parâmetro repetitividade os resultados apresentaram um CV de 0,81%, abaixo do valor máximo especificado pela legislação.

O método mostrou ser robusto quanto à variação dos fabricantes de álcool etílico P.A, estabilidade da SE e de $AlCl_3$ 2,5% (v/v) na presença de luz e nos tempos 0 e 24 h. Os resultados apresentaram $F_{\text{calculados}}$ inferiores aos $F_{\text{tabelados}}$, conforme ANOVA *One-Way*, demonstrando que não há diferença entre as variáveis analisadas.

Visto a complexidade da composição das drogas vegetais, os procedimentos analíticos determinados no presente trabalho possibilitaram a obtenção de um método de doseamento de flavonoides totais para as partes aéreas de *T. occidentalis*, levando em consideração os fatores inerentes da espécie, em especial os flavonoides presentes na espécie. Ao final, o método desenvolvido possibilita sua utilização como um método de diluição direta na prática laboratorial, considerado de maior simplicidade em virtude do menor número de etapas experimentais. Contudo, deve-se ressaltar que essa análise é uma das etapas iniciais a serem atendidas e utilizadas no controle de qualidade da

presente espécie. Mas deve-se considerar a relevância desse estudo, visto a ausência de métodos de doseamento de flavonoides para *T. occidentalis* na literatura científica.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão das bolsas de pós-graduação. Ao Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT), UFPE, pela disponibilidade de utilização do moinho de facas para trituração da droga vegetal.

REFERÊNCIAS

Alves LDS, Figueirêdo CBM, Silva CCAR, Marques GS, Ferreira PA, Soares MFR, Silva R. MF, Rolim-Neto PJ. *Thuja occidentalis* L.: (Cupressaceae): Review of botanical, phyto-chemical, pharmacological and toxicological aspects. Int J Pharm Sci Res. 2014; 5(4):1163-77.

Alves LDS, Rolim LA, Fontes DAF, Rolim-Neto PJ, La Roca MF, Soares-Sobrinho JL. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. Quím Nova. 2010; 33(9):1967-72.

Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Orientações sobre “Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos”. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf. Acesso em: dezembro 2012.

Bergo SM, Lima AMA, Filiolia JE, Beutne R, Silvestre MC. Protocolo de tratamento homeopático das lesões provocadas pelo *Papiloma vírus* humano. Rev Pesq Homeopática. 2000; 15(1):3-27.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2 de junho de 2003.

Castellón MA, García DG, Méndez IC, Jorge MR, Crespo M. Obtenção e controle de qualidade da tintura-mãe de *Thuja occidentalis*. Rev Pesq Homeopática. 2000; 15(1): 67-75.

Chang LC, Song LL, Park EJ, Luyengi L, Lee KJ, Farnsworth NR, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Bioactive constituents of *Thuja occidentalis*. J Nat Prod. 2000; 63(9): 1235-8.

Dubey SK, Batra A: Hepatoprotective activity from ethanol fraction of *Thuja occidentalis* Linn. Asian J Res Chem. 2008a; 1(1):32-5.

Dubey SK, Batra A: Anti diabetic activity of *Thuja occidentalis* Linn. Res J Pharm Technol. 2008b; 1(4):362-5.

- Dubey SK, Batra A. Role of phenolic compound rich ethanol fraction of *Thuja occidentalis* Linn. in protective mechanism. *J Pharm Res.* 2009a; 2(2): 217-25.
- Dubey SK, Batra A. Antioxidant activities of *Thuja occidentalis* Linn. *Asian J Pharm Clin Res.* 2009b; 2(1): 73-6.
- Farmacopeia Brasileira. 5ª ed, Rio de Janeiro: Fiocruz; 2011.
- Fernandes AJD, Ferreira MRA, Randau KP, Souza TP, Soares LAL. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). *Sci World J.* 2012; 2012:1-7.
- Fetrow CW, Avila JR. Manual de Medicina Alternativa para o profissional. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2000.
- Figueirêdo CBM, Alves LDS, Silva CCAR, Ferreira PA, Marques GS, Santana ASCO, Randau KP, Pimentel RMM, Silva RMF, Rolim-Neto PJ. Physical-chemical characterization, anatomical and seasonal evaluation of *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae). *Int J Pharm Sci Res.* 2014; 5(5):1721-31.
- Figueirêdo CBM, Alves LDS, Silva CCAR, Soares MFR, Luz CCM, Figueirêdo TG, Ferreira PA, Rolim-Neto PJ. Abordagem terapêutica para o Papilomavírus humano (HPV). *Rev Bras Farm.* 2013; 94(1): 4-17.
- Garrett R. Quercetina. Disponível em: <http://qnint.s bq.org.br/qni/>.
- Madhuri S, Pandey G, Some anticancer medicinal plants of foreign origin. *Curr Sci.* 2009; 96(6): 779-83.
- Marques GS, Monteiro RPM, Leão WF, Lyra MAM, Peixoto MS, Rolim-Neto PJ, Xavier HS, Soares LAL. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonóides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. *Quím Nova.* 2012; 35(3):517-22.
- Naser B, Bodinet C, Tegtmeier M, Lindequist U. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A Review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. *eCAM.* 2005; 2(1): 69-78.
- Ojeswi BK, Khoobchandani M, Hazra DK, Srivastava MM. Protective effect of *Thuja occidentalis* against DMBA-induced breast cancer with reference to oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 2010; 29(5):369-75.
- Peixoto-Sobrinho TJS, Gomes TLB, Cardoso CM, Amorim ELC, Albuquerque UP. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Quím Nova.* 2010; 33(2): 288-91.
- Peixoto-Sobrinho TJS, Gomes TLB, Cardoso CM, Albuquerque UP, Amorim ELC. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. *Rev Bras Pl Med.* 2012; 14(4):586-91.
- Petry RD, Ortega GG, Silva WB. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride-flavonoid complex. *Pharmazie.* 2001; 56(6):465-70.
- Petry RD, De Souza KCB, Bassani VL, Petrovick PR, González Ortega G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). *Rev Bras Farm.* 1998; 79(1-2):7-10.
- Svajdlenka E, Mártonfi P, Tomasko I, Grancai D, Nagy M. Essential oil composition of *Thuja occidentalis* L. samples from Slovakia. *J Essent Oil Res.* 1999; 11:532-6.
- Soares LAL, Bassani VL, Ortega GG, Petrovick PR. Total flavonoid determination for the quality control of aqueous extractives from *Phyllanthus niruri* L. *Lat Am J Pharm.* 2003; 22(3):203-7.
- Tsiri D, Graikou K, Poblocka-Olech L, Krauze-Baranowska M, Spyropoulos C, Chinou I. Chemosystematic value of the essential oil composition of *Thuja* species cultivated in Poland-antimicrobial activity. *Molecules.* 2009; 14(11):4707-15.
- Ziliotto J, Farina C, Souza KCB. Validação de método analítico para doseamento de flavonoides totais em cápsulas contendo extrato seco de *Passiflora incarnata* L. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2012; 33(3); 341-6.

Recebido em 28 de junho de 2014

Aceito em 14 de agosto de 2014