

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O DOSEAMENTO DE FLAVONOÍDES DE *Bauhinia cheilantha* (BONGARD) STEUDEL****Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho, Tiago de Lima Barros Gomes, Késsio Carlos de Macedo Cardoso, Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim\***

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife – PE, Brasil

**Ulysses Paulino de Albuquerque**

Área de Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife – PE, Brasil

Recebido em 6/2/09; aceito em 13/8/09; publicado na web em 21/1/10

OPTIMIZATION OF ANALYTIC METHODOLOGIES FOR QUANTIFYING FLAVONOIDS OF *Bauhinia cheilantha* (BONGARD) STEUDEL. The present study examined the optimization of stabilization and extraction processes of the flavonoids of *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. Four drying temperatures (room temperature, 40, 60 and 80 °C) and seven extraction systems (distilled water, 100% methanol, 80% methanol, 100% ethanol, 80% ethanol, 80% acetone and 60% acetone) were examined. The results demonstrated a reduction in flavonoid levels with increasing drying temperatures; and 80% acetone, 80% ethanol, and methanol p.a extraction systems were found to be most efficient and its weren't differents statistically ( $p < 0.05$ ).

Keywords: pata-de-vaca; rutin; *Bauhinia cheilantha*.**INTRODUÇÃO**

No Brasil pode-se encontrar cerca de 20% das espécies pertencentes ao gênero *Bauhinia* (Caesalpinaceae) das quais, muitas são empregadas na medicina popular, comercializadas em feiras livres ou estão presentes na composição de diversos produtos, pois apresentam indicações populares como antidiabética, anti-hipertensiva e contra o mau colesterol que, geralmente, são atribuídas às substâncias fenólicas encontradas em suas folhas, principalmente flavonoides.<sup>1-3</sup>

Os flavonoides compõem um grupo economicamente importante, sendo utilizados nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Estas substâncias têm origem na via dos fenilpropanoides e apresentam mais de nove mil estruturas identificadas.<sup>4</sup> O núcleo fundamental é constituído por dois anéis fenólicos, no qual o anel A é proveniente da rota do acetato (Malonil-CoA), enquanto o anel B juntamente à cadeia propiônica que forma o anel heterocíclico C é oriundo da rota do chiquimato (p-Cumaril-CoA), podendo estar ligados a carboidratos (heterosídeos), não associados (agliconas) ou ainda polimerizados (antocianinas).<sup>4,5</sup>

Esses compostos possuem uma série de propriedades medicinais e, muitas destas, estão sendo testadas empiricamente como a atividade anti-inflamatória,<sup>6</sup> antimicrobiana,<sup>7,8</sup> antioxidante,<sup>9,10</sup> hipocolesterolemia,<sup>11,12</sup> hipoglicemiante<sup>13</sup> e até para prevenir acidentes isquêmicos.<sup>14</sup> Uma revisão mais detalhada sobre flavonoides e suas propriedades pode ser encontrada em Harborne e Williams.<sup>15</sup>

Diversas técnicas podem ser empregadas para a detecção e doseamento de flavonoides em amostras vegetais, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (CL-EM), cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria UV/Visível, entre outras.<sup>16-20</sup> Destaca-se a espectrofotometria como uma técnica bastante acessível, prática e menos onerosa e, devido às duplas ligações presentes nos anéis aromáticos, os flavonoides podem ser analisados na região do ultravioleta ou visível.<sup>21,22</sup>

Diversos fatores podem influenciar o teor dos princípios ativos no

processo analítico, como a estabilização e a escolha correta do sistema extrativo. A estabilização impede as reações de hidrólise e evita a alteração das substâncias originalmente presentes na planta, sendo a secagem em estufas uma opção mais eficiente, entretanto, temperaturas elevadas podem degradar ou alterar a composição química das amostras.<sup>23</sup> Outro fator importante refere-se à escolha do solvente para extração, sendo mais utilizados para compostos fenólicos solventes orgânicos, como etanol, metanol e acetona, ou a mistura destes com água, visando a otimização e o aumento do rendimento.<sup>24,25</sup>

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi otimizar a metodologia analítica (temperatura de secagem e sistema extrativo) para quantificação de flavonoides foliares de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel.

**PARTE EXPERIMENTAL****Equipamentos**

As análises quantitativas foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-Mini 1240 com cubeta de vidro Equilab de 10 mm de caminho óptico. Foram utilizados no estudo: agitador eletromagnético e Tamises Bertel, balança analítica eletrônica Shimadzu AX200, estufa de secagem Nova Técnica NT-513, placa de aquecimento Tecnal TE-018 e triturador Berman BM30.

**Reagentes e padrão de referência**

Neste estudo foram usados os seguintes solventes: metanol p.a. (Vetec), etanol p.a. (Vetec) e acetona p.a. (Merck). Para a metodologia analítica utilizaram-se água destilada, ácido acético glacial p.a. (Merck), solução metanólica de piridina a 20% (Vetec) e reagente cloreto de alumínio em metanol a 50,0 mg/mL (Vetec). Como padrão para flavonoides foi empregada rutina 99,5% (Merck).

**Metodologia analítica**

Seguiu-se a metodologia descrita por Peixoto Sobrinho e colabo-

\*e-mail: elba@ufpe.br

radadores com adaptações.<sup>26</sup> Os extratos foram preparados com 500,0 mg das amostras secas e pulverizadas com granulometria de 60 mesh em Erlenmeyers de 50 mL, aos quais foram adicionados 25,0 mL do solvente e extraídos, sob aquecimento, em placa de aquecimento durante 30 min, sendo filtrados para balões volumétricos de 50 mL. Em cada Erlenmeyer foram adicionados 25,0 mL do solvente e novamente filtrado, aferindo-se o volume do balão com o mesmo solvente. Deste extrato foi pipetada e transferida alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 25 mL, ao qual foram acrescentados 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL da solução metanólica de piridina a 20% e 2,5 mL do reagente cloreto de alumínio em metanol a 50,0 mg/mL, completando-se o volume com água destilada. Após 30 min, as leituras foram realizadas a 420 nm em cubetas de vidro.

Para construção das curvas de calibração, foram preparadas soluções metanólicas de rutina a 0,5 mg/mL, sendo retiradas 6 alíquotas para balões volumétricos de 25 mL. Em cada balão foram acrescentados 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL da solução de piridina e 2,5 mL do reagente cloreto de alumínio, completando-se o volume com água destilada. Após 30 min em temperatura ambiente, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando-se água destilada como solução-branco para zerar o aparelho.

### Material vegetal

As amostras foliares de *B. cheilantha* utilizadas para os testes de estabilização e extração, foram coletadas num remanescente de caatinga com 20 hectares, dentro da Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA (08°14' 18,2"S e 35°54' 57,1"W), localizada no município de Caruaru, Agreste Pernambucano, no mês de junho/2007 entre 9 e 11 h. Os parâmetros para coleta do material foram folhas inteiras, mesmo estágio de desenvolvimento e ausência de predação. A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. U. P. de Albuquerque, do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e as exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Prof. Vasconcelos Sobrinho da mesma instituição, sob os n°. 49684-49704.

### Estabilização

Para avaliar o processo de estabilização sobre o conteúdo de flavonoides presentes na amostra de *B. cheilantha*, 50,0 g de folhas frescas foram postas separadamente em bandejas e simultaneamente desidratadas à temperatura ambiente (25 °C) e em estufa a 40, 60 e 80 °C. Após aferições sucessivas, com intervalos de 1 h, sem alteração de no máximo 1,0% no peso, foi determinada a perda por dessecação conforme a equação  $D(\%) = [( \text{peso amostra fresca} - \text{peso da amostra seca} ) / \text{peso amostra fresca}] \times 100$ , onde  $D(\%)$  representa a perda percentual por dessecação. As amostras foram pulverizadas e quantificadas pela metodologia mencionada anteriormente. Para cada variável foram realizadas 6 réplicas.

### Sistemas extrativos

Após secagem das folhas frescas à temperatura ambiente, os extratos foram preparados com os seguintes sistemas extrativos: água destilada, metanol p.a, metanol 80%, etanol p.a, etanol 80%, acetona 80% e acetona 60%. Para cada sistema extrativo foram realizadas 6 réplicas.

### Análise estatística

Foram utilizados testes para avaliar a normalidade e os resultados foram submetidos a análises de variâncias para comparar os teores de

flavonoides de *B. cheilantha*, complementando-se o estudo, quando necessário, com o teste de Tukey para comparar as médias. Testes de correlação foram empregados para relacionar o teor de flavonoide no estudo de estabilização. As análises foram realizadas ao nível de 95% de confiança ( $\alpha = 0,05$ ) através do programa BioEstat 4.0.<sup>27</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de Kolmogorov-Smirnov mostrou que os dados possuem distribuição normal e, por isso, foram empregados testes paramétricos para avaliar os resultados. A equação de correlação e o coeficiente de determinação obtidos para a curva de calibração usada para quantificar as amostras de *B. cheilantha* foram, respectivamente,  $y = 0,0263x + 0,0002$  e  $R^2 = 0,9995$  (Figura 1).

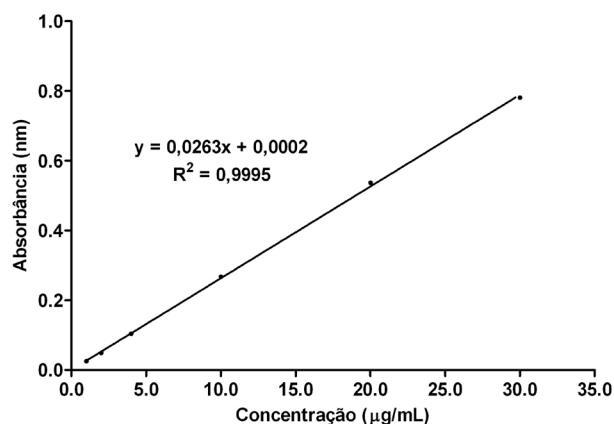


Figura 1. Curva de calibração construída com rutina (0,5 mg/mL) a 420 nm, onde a equação de correlação e o coeficiente de determinação obtidos foram  $y = 0,263x + 0,0002$  e  $R^2 = 0,9995$

Os percentuais de perda por dessecação das amostras variaram de 67,47 a 68,99% e a estabilização ocorreu entre 2 h e 45 min e 22 h e 30 min (Tabela 1). A análise de variância realizada com os resultados obtidos a diferentes temperaturas de secagem mostrou que as amostras estabilizadas à temperatura ambiente apresentaram maior teor de flavonoides ( $4,289 \pm 0,120$ ), apontando perdas com o aumento da temperatura. Entretanto, o teste de Tukey apontou diferenças estatísticas apenas para a temperatura de 80 °C. A correlação linear de Pearson mostrou uma relação inversamente proporcional ( $r = -0,9511$ ;  $p < 0,05$ ) entre a temperatura de secagem e os teores de flavonoides das amostras, indicando que o aumento da temperatura provoca uma redução nos teores de flavonoides. Os teores de flavonoides extraídos das folhas de *B. cheilantha* submetidas a diferentes temperaturas de secagem encontram-se na Tabela 1.

Estes dados corroboram com os encontrados por Negri que, avaliando a estabilização das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae), observou uma relação inversa entre os teores de flavonoides e a temperatura de secagem, comprovando a influência deste fator sobre os compostos fenólicos avaliados.<sup>28</sup> Neste mesmo trabalho foi observado que os teores de fenóis totais e taninos (em menor escala) diminuíram com o aumento da temperatura de secagem, encontrando-se os maiores teores para as amostras secas a 40 °C.<sup>28</sup>

Estudo com *Salix purpurea* L. (Salicaceae) mostrou que a estabilização a 60 e 90 °C exerce forte influência sobre sua composição química foliar, podendo determinar mudanças qualitativas, como a oxidação de compostos fenólicos em quinonas, e/ou quantitativas, reduzindo os teores de flavonoides em relação às folhas frescas, onde as flavanonas e flavonas glicosídicas se apresentaram mais sensíveis que os flavonóis glicosídeos.<sup>29</sup> O processo de estabilização

**Tabela 1.** Teores de flavonoides foliares de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel obtidos após a utilização de diferentes temperaturas de secagem

Temperatura (°C)	Tempo de estabilização	Dessecação (%)	Teor ± DP (% p/p)	CV (%)
Ambiente (25)	22 h e 30 min	68,99	4,289 ± 0,120 a	2,802
40	5 h e 15 min	67,63	4,138 ± 0,106 a	2,565
60	3 h e 30 min	67,47	4,109 ± 0,091 a	2,221
80	2 h e 45 min	68,35	3,830 ± 0,177 b	4,634

DP = Desvio-Padrão; CV = Coeficiente de Variação; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (n = 6; p < 0,05).

dos ramos de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae), por diferentes temperaturas, reduziu significativamente os teores de rutina e quercitrina quando comparados ao material fresco, enquanto que à temperatura de 50 °C, estes mesmos flavonoides não apresentaram alterações.<sup>30</sup>

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos teores de flavonoides obtidos por diferentes sistemas extrativos. Os resultados da análise de variância complementada pelo teste de Tukey, aplicados para avaliar a eficiência da extração, apontaram diferenças significativas entre os sistemas utilizados, indicando que as extrações com acetona 80% (4,661 ± 0,155), etanol 80% (4,595 ± 0,071) e metanol p.a. (4,465 ± 0,164) foram os mais eficientes.

**Tabela 2.** Teores de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel obtidos por diferentes sistemas extrativos

Sistema	Teor ± DP (% p/p)	CV (%)
Água	1,394 ± 0,103 a	7,363
Metanol p.a.	4,465 ± 0,167 bc	3,747
Metanol 80%	4,332 ± 0,111 b	2,570
Etanol p.a.	4,402 ± 0,131 bd	2,968
Etanol 80%	4,595 ± 0,071 cd	1,547
Acetona 80%	4,661 ± 0,155 c	3,336
Acetona 60%	4,379 ± 0,141 bd	3,218

DP = Desvio-Padrão; CV = Coeficiente de Variação; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (n = 6; p < 0,05).

Os estudos realizados sobre a otimização de sistemas extrativos são relativos a compostos fenólicos, não sendo citados na literatura trabalhos específicos para flavonoides. Uma vez que os flavonoides são também polifenóis, podemos comparar nossos resultados com os obtidos por Kim e colaboradores que, ao avaliarem a extração de polifenóis contidos nos frutos de *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae) por metanol (p.a. e 50%), etanol (p.a. e 50%) e acetona (40, 50 e 60%), encontraram diferenças estatísticas entre os teores, revelando que o uso de acetona promoveu extrações mais eficientes em todos os níveis.<sup>31</sup> Contudo, outro estudo realizado com a finalidade de extrair compostos fenólicos de *T. cacao* com metanol, clorofórmio, sistema I (clorofórmio, éter e diclorometano) e sistema II (metanol e diclorometano) mostrou que o metanol apresentou melhor eficiência.<sup>32</sup>

## CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a estabilização é um importante processo para a manutenção dos princípios ativos presentes nas amostras de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel e que pode ser extrapolado para outras espécies; entretanto, foi observada uma correlação inversamente proporcional, indicando que a temperatura de secagem empregada não deve exceder 60 °C, pois temperaturas acima desta podem reduzir os níveis de flavonoides.

Obteve-se, também, que os sistemas mais eficientes para a extração de flavonoides de *B. cheilantha* foram acetona 80%, etanol 80% e metanol p.a., não havendo diferenças significativas entre ambos. Contudo, há ressalvas no uso de acetona e metanol com a finalidade

de extrair compostos ativos para a fabricação de fitomedicamentos, por possuírem custo mais elevado e sua toxicidade torna-se um fator determinante, pois ao comercializar seus produtos a indústria tem que assegurar que todo o solvente utilizado no processo de extração tenha sido eliminado para não causar riscos ao consumidor, enquanto que solventes de baixa toxicidade ou atóxicos, como o etanol, além de possuírem menor custo, não apresentam tal risco à saúde e causam menos impacto ambiental.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) pelo apoio logístico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Mestrado a T. J. S. Peixoto Sobrinho, à FACEPE/CNPq pela Bolsa de Iniciação Científica concedida a K. C. M. Cardoso e à PROPESQ/UFPE pela Bolsa de Iniciação Científica concedida a T. L. B. Gomes.

## REFERÊNCIAS

- Agra, M. F.; Freitas, P. F.; Barbosa Filho, J. M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 114.
- Albuquerque, U. P.; Monteiro, J. M.; Ramos, M. A.; Amorim, E. L. C.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 76.
- Silva, R. L.; Cechinel Filho, V.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 449.
- Zuanazzi, J. A. S.; Montanha, J. A. Em *Flavonóides*; Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., eds.; Ed. da UFRGS/UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, 2004, cap. 23.
- Martens, S.; Mithöfer, A.; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2399.
- Sala, A.; Recio, M. C.; Schinella, G. R.; Manez, S.; Giner, R. M.; Cerda-Nicolas, M.; Ros, J.-L.; *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *461*, 53.
- Cottiglia, F.; Loy, G.; Garau, D.; Floris, C.; Casu, M.; Pompei, R.; Bonsignore, L.; *Phytomedicine* **2001**, *8*, 302.
- Cushnie, T. P. T.; Lamb, A. J.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *26*, 343.
- Chicaro, P.; Pinto, E.; Colepicolo, P.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 239.
- Süzgeç, S.; Meriçli, A. H.; Houghton, P. J.; Çubukçu, B.; *Fitoterapia* **2005**, *76*, 269.
- Gläber, G.; Graefe, E. U.; Struck, F.; Veit, M.; Gebhardt, R.; *Phytomedicine* **2002**, *9*, 33.
- Fuhrman, B.; Volkova, N.; Kaplan, M.; Presser, D.; Attias, J.; Hayek, T.; Aviram, M.; *Nutrition* **2002**, *18*, 268.
- Jung, U. J.; Lee, M.-K.; Park, Y. B.; Kang, M. A.; Choi, M.-S.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 1134.
- Dajas, F.; Rivera-Megret, F.; Blasina, F.; Arredondo, F.; Abin-Carriquiry, J. A.; Costa, G.; Echeverry, C.; Lafon, L.; Heizen, H.; Ferreira, M.; Morquio, A.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36*, 1613.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481.
- Aguilar-Sánchez, R.; Ahuatl-García, F.; Dávila-Jiménez, M. M.; Elizalde-González, M. P.; Guevara-Villa, M. R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 239.
- Li, H.-B.; Jiang, Y.; Chen, F.; *J. Chromatogr. B* **2004**, *812*, 277.
- Matysik, G.; Wójciak-Kosior, M.; *Chromatographia* **2005**, *61*, 15.

19. Rolim, A.; Oishi, T.; Maciel, C. P. M.; Zague, V.; Pinto, C. A. S. O.; Kaneko, T. M.; Consiglieri, V. O.; Velasco, M. V. R.; *Int. J. Pharm.* **2006**, *308*, 107.
20. César, I. C.; Braga, F. C.; Vianna-Soares, C. D.; Nunan, E. A.; Pianetti, G. A.; Moreira-Campos, L. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1933.
21. Markham, K. R.; *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press: London, 1982.
22. Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B.; *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer: Berlin, 1970.
23. Falkenberg, M. B.; Santos, R. I.; Simões, C. M. O. Em *Introdução à análise fitoquímica*; Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmanm, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., eds.; Ed. da UFRGS/UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, 2004, cap. 10.
24. Oliveira, M. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2005.
25. Andreo, D.; Jorge, N.; *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* **2006**, *24*, 319.
26. Peixoto Sobrinho, T. J. S.; Silva, C. H. T. P.; Nascimento, J. E.; Monteiro, J. M.; Albuquerque, U. P.; Amorim, E. L. C.; *Rev. Bras. Cien. Farmac.* **2008**, *44*, 683.
27. Ayres, M.; Ayres Júnior, M.; Ayres, D. L.; Santos, A. A. S.; *BioEstat 4.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá: Belém, 2005.
28. Negri, M. L. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2007.
29. Julkunen-Tiitto, R.; Sorsa, S.; *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27*, 779.
30. Diniz, C. B.; Astarita, L. V.; Santarém, E. R.; *Acta Bot. Bras.* **2007**, *21*, 443.
31. Kim, K. H.; Lee, K. W.; Kim, D. Y.; Park, H. H.; Kwon, I. B.; Lee, H. J.; *Process Biochem.* **2003**, *70*, 41.
32. Azizah, H.; Ruslawatti, N. M.; Tee, T. S.; *Food Chem.* **1999**, *64*, 199.