

# Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcóolicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá)

## Total flavonoid content determination in aerial parts of *Passiflora alata* Dryander (maracuja)

Raquel D. Petry, Kellen C.B. de Souza, Valquíria L. Bassani, Pedro R. Petrovick & George González Ortega<sup>1</sup>

**RESUMO** – O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico de doseamento de flavonóides totais, presentes em partes aéreas de *Passiflora alata*. O material vegetal foi extraído sob refluxo, durante 30 minutos, utilizando etanol a 40 % (V/V), sem hidrólise prévia dos glicosídeos flavonóidicos e sem uso de outros solventes orgânicos. A interferência de substâncias lipofílicas no comprimento de leitura foi avaliada por remoção destas mediante extração em fase sólida, utilizando soluções extrativas obtidas com etanol a 20, 40 e 80 % (V/V). Os flavonóides foram complexados com cloreto de alumínio e a absorção lida, 30 minutos após, a 397 nm, utilizando amostra não complexada como branco. O teor de flavonóides foi expresso em gramas de apigenina por 100 g de droga vegetal seca. Os testes de reprodutibilidade, realizados com amostras diferentes e considerando análises realizadas em dias diferentes, foram satisfatórios. O teste de recuperação indicou, porém, que o teor de flavonóides calculado é dependente da proporção droga:solvente, utilizada na fase de preparação da solução extrativa. Para efeitos comparativos, a confiabilidade dos resultados fica restrita ao estabelecimento de condições experimentais precisas. O teor de flavonóides calculado para *P. alata* (0,55 g%) foi comparativamente menor ao calculado para *P. incarnata* (0,94 g%) e *P. edulis* (0,90 g%), sob as mesmas condições experimentais. A análise comparativa utilizando o comprimento de onda de 425 nm, preconizado por diversas farmacopéias, revelou falta de especificidade e a presença de erros analíticos evidentes.

**PALAVRAS-CHAVE** – *Passiflora alata*; *Passiflora incarnata*; teor de flavonóides totais, método analítico; validação.

**SUMMARY** – This work aims the development and validation of an assay for the total flavonoid content determination, in aerial parts of *Passiflora alata*. The drug was extracted by reflux using ethanol 40% (V/V), without previous acid hydrolysis nor other organic solvents. The interference effect due to lipophilic substances was determined by solid phase extraction using 20, 40 and 80% (V/V) hydroalcoholic mixtures. The flavonoids were complexed with aluminum chloride reagent and the absorption was determined at 397 nm, 30 min after the aluminum chloride addition. The total flavonoid content was expressed as apigenin (g %) related to 100 g of dried drug. The reproducibility tests led to satisfactory results when different samples and analysis daytimes were considered. The recovery assay, however, showed that different extraction drug:solvent ratios brought about unlike flavonoid contents. Consequently, for comparative purposes the results confidence is attached to well defined experimental parameters. Under the same analytical conditions, *P. alata* showed smaller flavonoid content (0.55 g %) than *P. incarnata* (0.94 g %) and *P. edulis* (0.90 g %). On the other hand, a comparative study carried out using the 425 nm wavelength, as recommended by several pharmacopoeias, indicated lack of specificity and analytical errors occurrence.

**KEY WORDS** – *Passiflora alata*; *Passiflora incarnata*; total flavonoids content; method validation.

## INTRODUÇÃO

*Passiflora alata* Dryander (folhas) consta nas três primeiras edições da Farmacopéia Brasileira<sup>3</sup>, sem no entanto, preconizar um método analítico quantitativo, que permita a avaliação fidedigna da qualidade da droga. Um dos fatores que dificulta o doseamento de substâncias ativas, presentes nesta espécie, é a insuficiência de estudos fitoquímicos e farmacológicos, apesar do caráter oficial da mesma. Os flavonóides relacionados, em sua maioria C-glicosilados, parecem constituir a melhor opção de escolha de marcadores de qualidade, da mesma forma como relatado para *P. incarnata* e *P. edulis*<sup>1,2,6,7,8,9</sup>.

Um dos métodos de quantificação do teor de flavonóides totais mais frequentemente utilizado é o método espectrofotométrico adotado pelas Farmacopéias Alemã (DAB-10)<sup>2</sup> e Suíça (Ph. Helv. VII)<sup>7</sup>. O método é geral e preconizado para *Passiflora incarnata* e outras espécies vegetais ricas em flavonóides, como a *Camomila recutita*, *Crataegus spp.* e *Betula alba*. Contudo, diversos autores assinalam para o mesmo diversas fontes de erro analítico, decorrentes do método ter sido desenvolvido, de forma específica, para a análise da rutina e flavonóides O-glicosilados, mas não para flavonóides C-glicosilados, que resistem a hidrólise ácida<sup>1,4,8,9</sup>.

No presente trabalho foi adotado o

método geral preconizado por Schmidt e González Ortega<sup>8</sup>, introduzindo modificações e validando-o para a droga vegetal partes aéreas de *Passiflora alata*, com ênfase no comprimento de onda de leitura, tempo de leitura, interferência causada por substâncias lipofílicas e reprodutibilidade.

## METODOLOGIA

### Extração, preparação e leitura das amostras

A extração foi realizada utilizando etanol a 40% (V/V). A metodologia utilizada para a preparação das soluções extrativas e amostras de leitura está descrita na Figura 1.

Recebido em 06.05.98

<sup>1</sup>Laboratório de Desenvolvimento Galênico - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Faculdade de Farmácia - UFRGS - Av. Ipiranga, 2752 - 90610-000 - Porto Alegre - RS.



Figura 1 – Metodologia geral de extração e comparação de amostras e leitura.

A proporção droga:solvente utilizada foi de 0,2:10, exceto quando especificado o contrário.

#### Seleção do comprimento de onda

A solução extrativa foi diluída na proporção 1:2.000(V:V) com etanol 40% (V/V). Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 230 a 500 nm, 30 minutos após a adição de 2 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio a 0,5% (m/V)\*.

#### Determinação do tempo de leitura

A solução extrativa foi diluída com etanol 40% (V/V) na proporção 1:2000 (V/V). As leituras das absorvâncias a 397 nm foram realizadas em intervalos de 5 minutos, durante uma hora, após adição de 2 mL de  $AlCl_3$  0,5%.

#### Determinação do coeficiente de absorção específica da apigenina

O valor de  $E^{1\%}$  da apigenina foi calculado a partir da absorvância de uma solução contendo 8,2 mg/100mL, 30 minutos após adição de 2 mL  $AlCl_3$  0,5%. A mesma, sem  $AlCl_3$  0,5%, foi utilizada como solução de compensação.

#### Avaliação do efeito de interferentes lipofílicos

A interferência de substâncias lipofílicas sobre a leitura a 397 nm foi avaliada por do-

\* A solução etanólica de cloreto de alumínio hexaidratado a 0,5% (m/V), calculado como base anidra, será abreviada como  $AlCl_3$  0,5%.

seamento do teor de flavonóides totais em soluções extrativas preparadas com misturas hidroalcoólicas a 20, 40 e 80% (V/V), e uma proporção droga:solvente de 0,4:10 (m/V). A metodologia de extração foi a mesma descrita na Figura 1. Aliquotas de 1,0 mL de cada uma das três soluções extrativas obtidas, após diluição na proporção 1:1000 (V/V) com os respectivos líquidos extratores, foram aplicadas, separadamente, em colunas de extração em fase sólida (Sep-pak® RP-18 - 100 mg). As colunas foram lavadas, primeiro com 7 mL de etanol 40% (V/V) (fração A) e depois com 7 mL de éter de petróleo (faixa dest. 40-60 °C) (fração B). A absorvância em 397 nm da fração A foi determinada, após adição de 2 mL  $AlCl_3$  0,5% e diluição 1:20 (V/V) com etanol 40%. Igual procedimento foi seguido para a fração B, diluída com éter de petróleo ao invés de etanol 40%. Em ambos casos, as respectivas frações sem  $AlCl_3$  0,5% foram utilizadas como soluções de compensação. O espectro de absorção, da fração B, na faixa de 200 a 600 nm foi obtido 30 minutos após a adição de  $AlCl_3$  0,5%, utilizando éter de petróleo como branco.

#### Doseamento quantitativo do teor de flavonóides em 397 nm

A preparação das amostras foi realizada conforme metodologia descrita na Figura 1. A solução extrativa foi diluída com etanol 40%, na proporção 1:2000 (V/V). A medida da absorvância em 397 nm foi feita 30 minutos após adição do  $AlCl_3$  0,5%. A solução extrativa diluída e não adicionada de  $AlCl_3$  0,5% foi utilizada como solução de compensação. O teor de flavonóides totais, expresso em gramas de apigenina por 100 g de droga seca, foi calculado pela Equação A.

#### Equação A

$$C = \frac{A * FD}{m * E_{1cm}^{1\%}}$$

onde: C = concentração de apigenina em g por 100 g de droga seca; A = absorvância lida; FD = fator de diluição; m = massa de droga seca (g);  $E_{1cm}^{1\%} = 336,5$ .

#### Doseamento comparativo do teor de flavonóides totais em 425 nm

As amostras foram preparadas conforme descrito na Figura 1. A diluição foi com etanol 40%, na proporção 1:2500 (V/V). A absorvância em 425 nm foi medida 30 minutos após adição de 2 mL de  $AlCl_3$  0,5%, utilizando solução extrativa diluída, sem  $AlCl_3$  0,5%, como solução de compensação.

#### Teste de recuperação

Foram utilizadas soluções extrativas preparadas conforme descrito na Figura 1, com proporção droga:solvente de 0,4:10. A solução extrativa com fator de diluição 1:2500 (V/V) foi acrescida de quantidades crescentes de extrato com diluição 1:1000 (V/V), resultando em mais três soluções extrativas com fatores de diluição respectivos de 1:2273, 1:1923 e 1:1667 (V/V). Às soluções extrativas assim preparadas foi adicionado 2 mL de  $AlCl_3$  0,5%. As absorvâncias em 397 nm foram medidas 30 minutos após adição do reagente completante.

#### Reprodutibilidade

Extratos preparados conforme a metodologia geral (Figura 1), com proporção droga:solvente de 0,4:10, foram utilizados neste ensaio. Os fatores de variação considerados foram quatro amostras e quatro dias de análise diferentes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de doseamento de flavonóides totais esteve baseada na proposta por Schmidt e González Ortega<sup>8</sup> para *P. incarnata*, a qual foi modificada em alguns aspectos. A diferença do método espectrofotométrico preconizado pelas Farmacopéias Alemã e Suíça para *P. incarnata*<sup>2,7</sup>, a solução extrativa não foi submetida à hidrólise ácida nem à extração com acetona e acetato de etila, evitando diversos erros relatadas na literatura para drogas vegetais ricas em flavonóides C-glicosilados<sup>4,8,9</sup>.

O comprimento de onda de 397 nm foi escolhido para a medida da absorvância, levando em consideração a absorvância máxima observada no espectro de absorção (Figura 2) e o menor efeito interferente da clorofila e outros compostos lipofílicos. O  $I_{max}$  coincide com os relatados para diversos flavonóides presentes no Gênero *Passiflora*, quando complexados com  $AlCl_3$ <sup>5</sup>, o que torna o método, em princípio, aplicável a outras espécies de *Passiflora*.

A absorvância máxima permanece estável transcorridos 30 minutos da adição de  $AlCl_3$  0,5% (Figura 3), caracterizando uma reação de cinética lenta. O incremento de 0,004 U.A./minuto, observado após 30 minutos, é irrelevante do ponto de vista das exigências analíticas incidentes no caso de uma matriz vegetal complexa.

A escolha da apigenina como substância de referência levou em consideração os máximos de absorção observados no espectro desta após adição de  $AlCl_3$  0,5% (278, 301, 389 nm), além da semelhança espec-

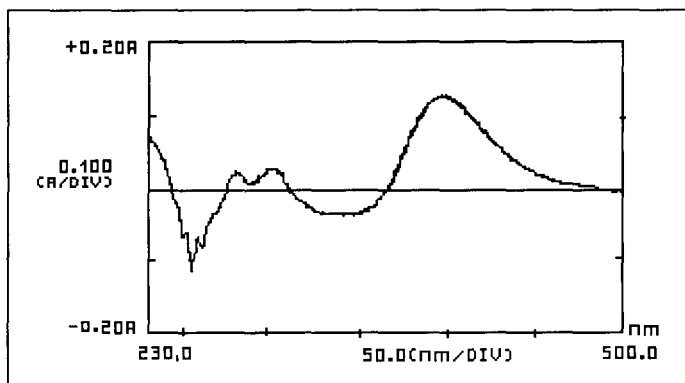


Figura 2 – Espectro de absorção de extrato hidroetanólico de *P. alata*, obtido após 30 minutos da adição de solução etanólica de  $AlCl_3$  a 0,5 %, na região de 230 a 500 nm, utilizando extrato sem  $AlCl_3$ , como solução de compensação.

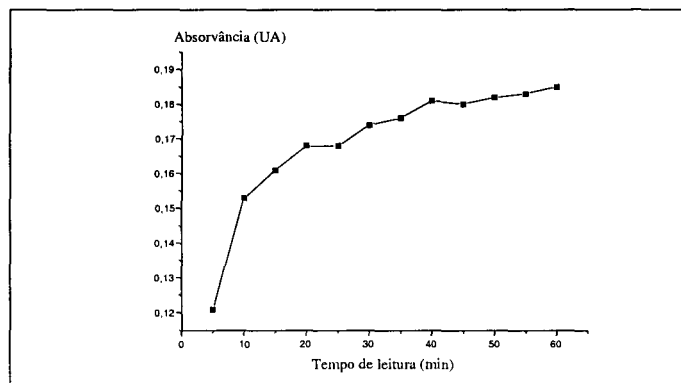


Figura 3 – Valores de absorvância observados para o extrato hidroetanólico de *P. alata* em função do tempo de leitura, após acrescida a solução de  $AlCl_3$  a 0,5 % (m/V).

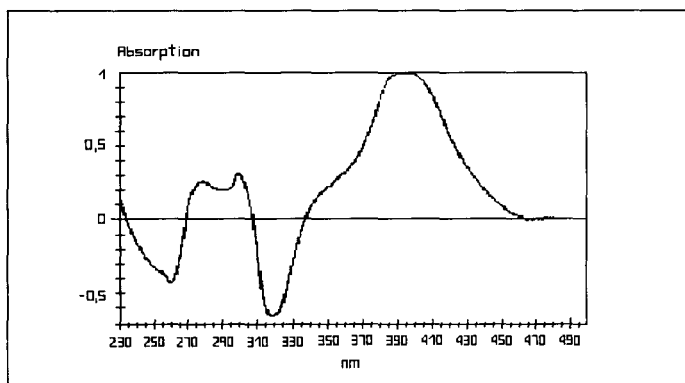


Figura 4 – Espectro de absorção da apigenina obtido após 30 minutos da adição de solução etanólica de  $AlCl_3$  a 0,5 %, na região de 230 a 500 nm, utilizando extrato sem  $AlCl_3$ , como solução de compensação.

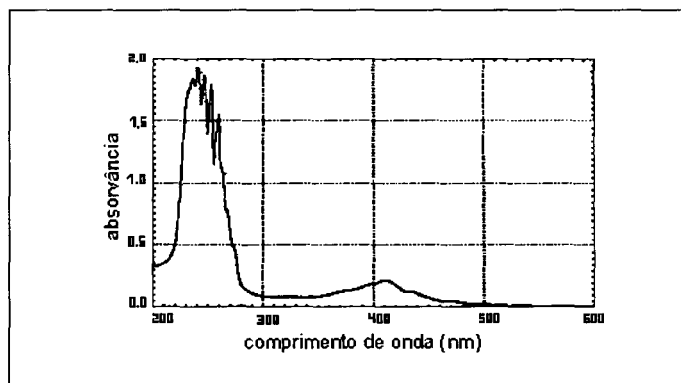


Figura 5 – Espectro da fração de éter de petróleo obtida por extração em fase sólida, a partir da solução extrativa diluída de *P. alata*, 30 minutos após adição de  $AlCl_3$ , na região de 200 a 600 nm e utilizando éter de petróleo como líquido de compensação.

tral com outros flavonóides com presença relatada no Gênero *Passiflora*, entre eles vitexina e orientina<sup>5,8</sup> (Figura 4). A escolha da absorção em 278 nm, embora forte, tem o inconveniente da possível interferência de outros compostos aromáticos não flavonóides. A absorção em 389 nm, por outro lado, localiza-se em um platô, coincidindo com valores de absorvância máxima observados para *P. alata* e *P. edulis*. O coeficiente de absorção específica ( $E^{1\%}$ ) da apigenina, em 397 nm, calculado nas mesmas condições experimentais que a solução extrativa de *P. alata*, foi de 336,5.

O efeito de interferentes lipofílicos, como carotenóides e clorofilas, tem sido relatado para o método de doseamento de flavonóides totais, utilizando  $AlCl_3$  como agente complexante<sup>4,8,9</sup>. A análise do espectro UV-VIS da fração lipofílica, obtida com éter de petróleo, revelou uma interferência forte na região de 210 a 280 nm e outra menor, centrada em torno de 420 nm (Figura 5).

O efeito da interferência lipofílica foi avaliado em função do teor alcoólico do líquido extrator, comparando os teores de fla-

vonóides totais de soluções extrativas preparadas com etanol a 20, 40 e 80% (V/V), em 397 nm. Os respectivos teores de flavonóides totais, expressos como apigenina, foram de 0,42, 0,57 e 0,76 g%. Esses teores evidenciam uma relação direta com a maior proporção de etanol no líquido extratos e, conseqüentemente, uma interferência crescente da fração lipofílica extraída. Soluções extrativas preparadas com etanol a 20 e 40% praticamente não diferiram no seu teor de flavonóides totais, após tratamento em coluna de extração sólida, o que permite assinalar uma menor interferência lipofílica associada à extração com etanol a 20%. Esta fase de purificação no método leva, contudo, à adsorção irreversível de uma pequena parcela dos flavonóides analisados, o que torna estes resultados aproximados.

Para as soluções extrativas preparadas com etanol a 80% e leitura a 397 nm, a comparação entre as absorvâncias obtidas com soluções livres da fração lipofílica e aquelas contendo ainda essa fração, sugere a possível formação de um complexo substâncias lipofílicas e  $AlCl_3$ , com  $E^{1\%}$  diferente do cal-

culado para a apigenina, que foi 336,5. Quando as absorvâncias foram medidas em 425 nm, essa possibilidade de erro torna-se mais evidente. Para soluções extrativas preparadas com etanol 40% e  $E^{1\%}$  de 122,6, para a apigenina complexada com  $AlCl_3$ , os teores de flavonóides calculados levam a valores discrepantes. Assim, os teores calculados em 425 nm, utilizando a Equação A, foram maiores que os calculados em 397 nm, apesar das absorvâncias medidas em 425 nm serem nitidamente menores (Tabela I).

Os fatores determinantes dessa discrepância são o emprego de  $E^{1\%}$  igual a 122,6 no denominador da Equação A, assim como a diferença das inclinações das curvas de absorção de *P. alata* e da apigenina, observadas na região próxima a 425 nm (Figuras 2 e 4). Este fato, conjuntamente com a interferência de substâncias lipofílicas, tornam o comprimento de onda de 425 nm inadequado para fins analíticos, corroborando restrições relatadas anteriormente na literatura<sup>4,8,9</sup>.

No teste de recuperação, os resultados mostraram uma perda paulatina da correlação entre aumento de concentração (DC) e o in-

cremento na absorvância (DA), resultando em uma recuperação percentual abaixo de 10% (Tabela II). Um comportamento semelhante foi relatado para *P. edulis*<sup>1</sup>, sendo o mesmo atribuído à falta de linearidade entre a con-

centração de flavonóides e a quantidade de AlCl<sub>3</sub>. Sobre esse tema, estudos de modelagem matemática, mediante análise de superfície de resposta, têm demonstrado que esse desvio da linearidade não é explicado somente

em função do possível esgotamento do AlCl<sub>3</sub>, caracterizando um fenômeno ainda mais complexo, que envolveria outras variáveis\*\*.

Para diferentes amostras analisadas, o coeficiente de variação foi de 4,2%, enquanto que para diferentes dias esse foi de 3,27% (Tabela III), indicando uma boa reprodutibilidade.

O teor de flavonóides totais, expresso como apigenina foi de 0,55 g%, relativo às partes aéreas de *P. alata*. Esse valor foi inferior ao teor de 0,94 g%, relatado para partes aéreas de *P. incarnata*<sup>8</sup> e *P. edulis*<sup>1</sup> (0,90 g%), utilizando a mesma proporção droga:líquido extrator, neste caso, etanol 40%.

O conjunto de resultados obtidos mostra que o método pode ser aplicado para fins de comparação e estabelecimento de critérios de qualidade relativos. No entanto, a observância de condições experimentais idênticas constituiu a principal restrição do método, sobretudo, em relação ao uso de etanol a 20 ou 40%, com eliminação da fração lipofílica, e as proporções de droga:líquido extrator:volume da solução de AlCl<sub>3</sub> 0,5%.

**TABELA I**  
Teores de flavonóides totais determinados em soluções extrativas *Passiflora alata*, preparadas com etanol a 40%, em 397nm e 425 nm

Amostra	1	2	3	4
Comprimento de onda de leitura	397 nm	397 nm	425 nm	425 nm
T.F.T. (g %)	0,549	0,572	0,672	0,752
	0,569	0,530	0,692	0,663
	0,540	0,560	0,702	0,723
Média	0,553	0,554	0,689	0,713
CV (%)	2,68	3,91	2,22	6,37

Abreviaturas: TFT = teor de flavonóides totais calculado como gramas de apigenina por 100 gramas de droga seca. CV (%): coeficiente de variação percentual.

**TABELA II**  
Resultados do teste de recuperação para determinação do teor de flavonóides totais de soluções extrativas obtidas com etanol a 40%, em 397 nm

Concentração (mg/mL)	DC (%)	A	DA (%)	Desvio em relação à absorvância esperada (%)	CV (%)
0,40	-	0,316	-	-	4,52
0,44	10	0,347	9,81	0,19	1,36
0,52	30	0,391	23,7	6,30	1,03
0,60	50	0,422	33,5	16,5	0,89

Abreviaturas: DC - diferença percentual da concentração (mg/mL), A - média das absorvâncias lidas (U.A.). DA - diferença percentual das absorvâncias lidas em relação à absorção inicial de 0,316 U.A. CV (%) - coeficiente de variação percentual.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à FAPERGS e CAPES pelo suporte financeiro deste trabalho.

\*\* Petry *et al.* 1998. Resultados não publicados.

**TABELA III**

Resultados do teste de reprodutibilidade levando em consideração os fatores de variação dias e amostras diferentes

Dia	Amostras	massa (mg)	C (g/L)	A	T.F.T.
1º dia	A <sub>1</sub>	3999	1,9995	0,399	0,593
	A <sub>2</sub>	4003	2,0015	0,397	0,589
	A <sub>3</sub>	4003	2,0015	0,369	0,548
média de T.F.T.: 0,577 (s ± 0,025; C.V. 4,33 %)					
2º dia	A <sub>1</sub>	4003	2,0015	0,404	0,600
	A <sub>2</sub>	4004	2,0020	0,391	0,580
	A <sub>3</sub>	4001	2,0005	0,371	0,551
	A <sub>4</sub>	4005	2,0025	0,373	0,551
média de T.F.T.: 0,570 (s ± 0,024; C.V. 4,19 %)					
3º dia	A <sub>1</sub>	4004	2,0020	0,361	0,536
	A <sub>2</sub>	4002	2,0010	0,360	0,535
	A <sub>3</sub>	4006	2,0030	0,360	0,534
média de T.F.T.: 0,535 (s ± 0,001; C.V. 0,19 %)					
4º dia	A <sub>1</sub>	4007	2,0035	0,391	0,580
	A <sub>2</sub>	4001	2,0005	0,391	0,580
	A <sub>3</sub>	3999	1,9995	0,398	0,591
	A <sub>4</sub>	4004	2,0020	0,389	0,577
média de T.F.T.: 0,582 (s ± 0,0061; C.V. 1,06 %)					

Coefficientes de variação: a) amostras diferentes = 4,20 %  
b) entre os diferentes dias = 3,57 %

Abreviaturas: C: concentração; A: absorvância; C.V.(%): coeficiente de variação percentual; s: desvio padrão; T.F.T.: teor de flavonóides totais calculado como gramas de apigenina por 100 g de droga seca.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Souza, K. C. B. *Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de Passiflora edulis Sims. forma flavicarpa (maracujá)*. Porto Alegre: UFRGS, 1997. 156 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia)
- Deutsches Arzneibuch. 10. Ausgabe. Stuttgart: Govi, 1992.
- Farmacopéia Brasileira. 3. ed., São Paulo: Andrei, 1977.
- Glasl, H.; Becker, U. Flavonol-O-Glykoside: photometrische Gehaltsbestimmung. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 124(43):2147-2152, 1984.
- Mabry, T.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. Berlin: Springer, 1970.
- Pharmacopée Française. 10. ed. Paris: Adrapharm, 1980.
- Pharmacopoea Helvetica. 7.ed., Bern: Eidgenössische, 1987.
- Schmidt, P. C.; González Ortega, G. Passionsblumenkraut: Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von *Passiflorae herba*. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 133(47):4457-4466, 1993.
- Wagner, H.; Titel, G.; Bladt, S. Analyse und Standardisierung von Arzneidrogen und Phytopräparaten durch Hochleistungsflüssig-chromatografie (HPLC) und andere chromatographische Verfahren. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 123:515-521, 1983.