

# VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM SOLUÇÃO EXTRATIVA DE *Vitex agnus castus* (VERBENACEAE)

Angélica Gomes Coelho (bolsista do PIBIC/CNPq), Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos (colaborador, UFPI), Antônia Maria das Graças Lopes Citó (co-orientador, UFPI), José de Arimatéia Dantas Lopes (Orientador, Depto de Química – UFPI)

## Introdução

A Terapia Hormonal realizada atualmente no tratamento dos sintomas da Menopausa e Síndrome Pré-Menstrual tem demonstrado, através de alguns estudos, a ocorrência de múltiplos efeitos adversos. Nesse contexto, a produção de um fitoterápico a partir de *Vitex agnus castus* tem se mostrado alternativa eficaz e promissora para o tratamento destes sintomas (PRILEPSKAYA, *et al*, 2006). A espécie *Vitex agnus-castus* (VAC) age no equilíbrio estrógeno-progesterona através de ações indiretas via hipófise e estudos recentes apontam-na como fonte de fitoestrogênios, agindo, portanto, também através de ação direta (JARRY, *et al*, 2006). Para a regularização de fitoterápicos, um critério legalmente exigido é a validação dos métodos analíticos utilizados (RIBANI, *et al*, 2004). Neste trabalho buscou-se validar a metodologia analítica de quantificação de flavonóides em solução extrativa de *Vitex agnus-castus* (Verbenaceae) avaliando-se os parâmetros seletividade, linearidade, robustez, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

## Metodologia

A linearidade da metodologia desenvolvida foi avaliada através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de 3 (três) curvas de calibração autênticas, usando-se cinco concentrações do padrão isovitexina (4; 4,8; 5,6; 6,4 e 8 µg/mL). Após varredura espectrofotométrica, determinou-se o comprimento de onda ótimo de leitura em 327 nm. Os limites de Quantificação e Detecção (LQ e LD) e a precisão (a nível de repetibilidade) do método foram avaliados conforme o determinado pela legislação brasileira correspondente a validação de metodologias analíticas (RE 899/2003). Para avaliação da robustez foram realizadas três curvas de calibração, em três dias diferentes e em dois espectrofotômetros diferentes, com diferentes lotes de solvente. A exatidão foi averiguada através da técnica de recuperação do padrão, onde há adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra. Já a seletividade, foi avaliada e comprovada por comparação das absorvâncias do extrato de VAC, da isovitexina, do flavonóide kaempferol e de um placebo. A quantificação espectrofotométrica de Polifenóis Totais ocorreu pelo método de Folin-Ciocalteu e a quantificação de Flavonóides Totais de VAC ocorreu por leitura espectrofotométrica direta, utilizando-se como padrão a isovitexina.

## Resultados e Discussão

O método mostrou-se linear, obtendo-se Coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ) iguais a 0,999, tanto para a curva de isovitexina, quanto para a curva construída com o extrato hidroalcoólico, como pode ser visto nas figuras 1 e 2. As análises de variância dos dados fornecidos pelas curvas de calibração demonstraram que o método é linear, na faixa de concentração testada, obtendo-se  $F_{calculado}$  inferior ao  $F_{crítico}$  tanto para isovitexina quanto para o extrato hidroalcoólico.

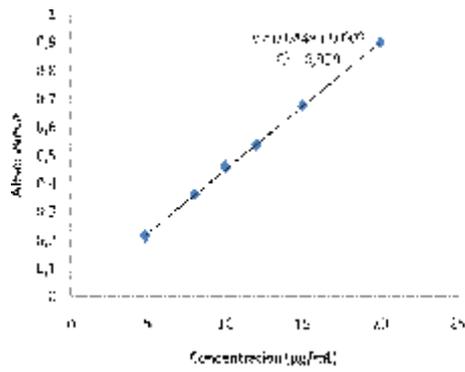


Figura 1 – Curva de calibração construída com padrão Isovitecina (4 – 8 µg/mL) em 327 nm.

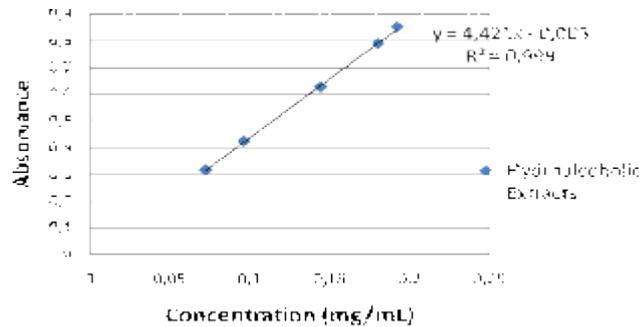


Figura 2 – Curva de calibração construída com Extrato Hidroalcoólico (0,072- 0,192 mg/mL) em 327 nm.

O LD e LQ de isovitexina foram 0,0001795 e 0,0002719 mg/mL, respectivamente. Com esses resultados, verificamos que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar o padrão. Para o extrato de *Vitex*, o LD e LQ estimados foram 0,0018 e 0,0027 mg/mL, respectivamente. O procedimento demonstrou ainda boa exatidão, obtendo-se percentuais de recuperação superiores a 95% (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de recuperação de isovitexina para avaliação da exatidão.

Valor Teórico	Valor encontrado	% de Recuperação
4 µg/mL	3,8 µg/mL	95
8 µg/mL	8,21227 µg/mL	102,6534
12 µg/mL	12,19704 µg/mL	101,642

O método mostrou-se robusto, já que as curvas de calibração realizadas em diferentes condições não apresentaram desvios na linearidade (Figura 3).

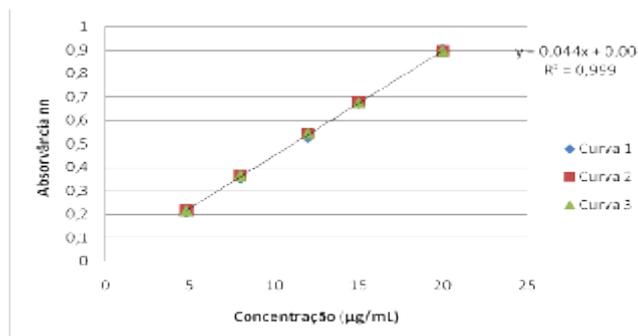


Figura 3 – Avaliação da linearidade em três curvas de calibração de isovitexina, realizadas sob diferentes condições.

Na avaliação da precisão, de acordo com os dados da tabela 2, o método mostrou boa repetibilidade, com um Coeficiente de Variação < 5%, que é o valor máximo aceitável estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2003).

**Tabela 2: Resultados de repetibilidade para o extrato da *Vitex agnus castus* a 0,144 mg/mL.**

Cinco Amostras					Média	DP	CV%
0,6266	0,6205	0,6153	0,628	0,6249	0,62306	0,0012	0,192598

DP = Desvio Padrão CV = Coeficiente de variação

Para o cálculo do teor de Fenóis Totais (FT), a curva de calibração construída com padrões de ácido gálico forneceu R<sup>2</sup> igual a 0,999 e utilizou-se a equação abaixo, chegando-se ao resultado de 6,7% em Fenóis Totais no Extrato hidroalcoólico de *Vitex agnus gastus*.

$$FT = \frac{A_1 \cdot FD}{(m-p) \cdot A^{1\%}}$$

Onde A1 = Absorbância; FD = Fator de Diluição; m = massa da matéria-prima vegetal; p = perda por dessecação; A1% = Absorção específica do produto reacional de ácido gálico.

No cálculo de Flavonoides Totais, chegou-se ao resultado de 0,28 g/100g de material vegetal no Extrato hidroalcoólico de *Vitex agnus gastus*.

## Conclusão

A partir da realização do presente trabalho pôde-se demonstrar que a metodologia espectrofotométrica proposta para quantificação de flavonóides no extrato de VAC, atende aos requisitos necessários para ser considerada validada.

**Apoio:** PIBIC/UFPI; CNPQ

## Referências Bibliográficas

BRASIL. Presidência da República. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos.. DF. 29 de maio. 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis>. Acesso em 2 de agosto de 2010.

JARRY, H.; SPENGLER, B.; WUTTKE, W.; CHRISTOFFEL, V. *In vitro* assays for bioactivity-guided isolation of endocrine active compounds in *Vitex agnus-castus*. **Maturitas**, v. 55, n. 1, p. 26-36, 2006.

PRILEPSKAYA, V.N., *et al.* *Vitex agnus castus* : Successful treatment of moderate to severe premenstrual syndrome. **Maturitas**. Vol. 55, p. 55-63, 2006.

RIBANI, M.; BOTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p: 771-780, 2004.

**Palavras Chave:** *Vitex agnus-castus*. Validação de metodologia analítica. Polifenóis Totais.