

4.03.99- Farmácia

VALIDAÇÃO DE MÉTODO UPLC PARA SEPARAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES EM EXTRATOS DE *Thuja occidentalis*

- Danielle B. de Santana^{1*}, Sâmia A. Souza e Silva², Irinaldo D. Basílio Júnior², Ticiano G. do Nascimento³
1. Estudante de Mestrado em Ciências farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia (ESENFAR) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
 2. Doutorado, ESENFAR-UFAL
 3. Doutorado, ESENFAR-UFAL/Orientador

Resumo:

Thuja occidentalis é largamente utilizada na medicina tradicional, sendo os flavonoides metabólitos de interesse da espécie, devido ao potencial farmacológico descrito na literatura. Contudo, não há descrito método para a quantificação e identificação desses, sendo objetivo desse trabalho desenvolver e validar um método cromatográfico para a identificação e quantificação de flavonoides presentes no vegetal. Para tal, o extrato hidroalcolico das partes aéreas da planta foi realizado e submetido à cromatografia de líquida de desempenho ultra acoplado ao detector de arranjo diode (UPLC-DAD) e o perfil cromatográfico e tempo de retenção dos picos obtidos no extrato foram comparados com os padrões dos flavonoides. Os flavonoides foram separados por meio de uma coluna de fase reversa (C18, 250 x 4,6 mm; 5 µm) num tempo total de 37 min. Adicionalmente, procedeu-se a validação do método, seguindo os parâmetros estabelecidos pela ANVISA, os testes foram realizados em triplicata e nos três níveis exigidos. Foi possível identificar por meio do método cinco flavonoides: catequina, amentoflavona, quercetrina, miricetrina e rutina. O método atendeu a todos os requisitos indicados para validação de uma matriz vegetal, com boa linearidade (acima de 0,998), precisão (2,589% a 5,888%), exatidão (92,44% a 101,86%), o que possibilita sua utilização na prática laboratorial, sendo um método fácil, rápido, e que pode ser reproduzido e utilizado como marcador do controle da qualidade do extrato vegetal.

Palavras-chave: Cromatografia; metabólitos; plantas medicinais.

Apoio financeiro: CAPES, CNPQ e FAPEAL.

Introdução:

Thuja occidentalis é uma planta conífera, monóica e perene, pertencente à família *cupressaceae*, conhecida popularmente como árvore da vida e é proveniente da América do norte e cultivada como planta ornamental no Brasil e outros países. Thuja apresenta propriedades curativas e é utilizada há anos na medicina tradicional, na forma de tinturas e preparações homeopáticas para tratar uma variedade de enfermidades, entre elas: reumatismo, amenorreia, cistite, psoríase, carcinomas uterinos e enxaquecas. (JOSEPH et al., 2013; AKKOL et al., 2015; SAMPAIO et al., 2015).

Estudos fitoquímicos realizados com a Thuja indicaram a presença de diversos compostos como: terpenóides, esteróides, citoquinas, lignanas e polissarídeos. E que suas propriedades medicinais estão nas partes aéreas da planta, ricas em óleos essenciais, destacando-se a Tujona como majoritária, assim com a presença significativa dos flavonoides catequina, miricetina, quercetina, quercetrina, canferol e canferol-3-O- α -ramnosídeo. (AKKOL et al., 2015; LOKESH et al., 2011; AHMAD et al., 2013; JASUJA et al., 2015).

O grupo químico dos flavonóides em estudos farmacológicos envolvendo a fração etanólica da *Thuja occidentalis* foi responsável pela atividade antiabética, hepatoprotetora, antitumoral, antiulcerativa, antioxidante e antilipidêmica. (DUBEY, S. K.; BATRA, A., 2009a; DUBEY, S. K.; BATRA, A., 2009b; OJESWI et al., 2010).

Ao constatar os compostos fenólicos como o grupo de metabólitos majoritário na espécie, confirmada previamente por cromatografia de camada delgada (CCD) (FIGUEIRÉDO et al., 2014), surge à necessidade de elaborar um método que permita a quantificação desses metabólitos, devido o potencial farmacológico dos metabólitos de interesse.

A determinação de flavonoides totais é amplamente utilizada como controle para drogas vegetais, extratos e produtos acabados para diversas espécies, sendo estes detectados e/ou doseados pelas técnicas espectroscópicas e cromatográficas. (PETRY, R. D.; ORTEGA, G. G.; SILVA, W. B., 2001)

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é o método mais eficiente para o controle de qualidade de matrizes vegetais, e tendo em vista a ausência de métodos analíticos validados descritos na literatura para a quantificação dos flavonoides presentes na espécie vegetal *Thuja occidentalis*. Observando esta necessidade, o presente estudo tem por objetivo desenvolver um método validado de cromatografia de líquida de desempenho ultra acoplado ao detector de arranjo diode (UPLC-DAD) para a quantificação de flavonoides presentes nas partes aéreas da fração hidroalcolica da *Thuja occidentalis*, utilizando padrões comerciais dos flavonoides e seguindo os parâmetros da ANVISA sobre validação de métodos analíticos para o controle e qualidade de drogas/extratos vegetais, que envolvem: especificidade/seletividade, Linearidade, Sensibilidade, Exatidão, Precisão, (repetitividade, precisão intermediária), Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Robustez.

Metodologia:

Materiais: A planta *Thuja occidentalis* foi adquirida através da floricultura Rio Verde plantas e jardins (Maceió-AL, Brasil). Padrões dos flavonoides: catequina, miricetrina, rutina, amentoflavona e quercetrina foram adquiridos em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Etanol, ácido acético e metanol de grau HPLC foram adquiridos em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Milli-q water foi adquirida no Hospital Universitario Professor Alberto Antunes (Maceió-AL, Brasil).

Preparação do extrato: as folhas frescas da planta foram removidas, pulverizadas e deixadas em contato com a solução extratora de etanol/água na proporção de 2:1 em bêquer de vidro por uma semana em temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi filtrada e o solvente removido por meio de um rota evaporador (Fisatom, São Paulo, Brazil). Obtendo-se o extrato bruto.

Preparação das soluções padrões e da amostra: Os padrões de flavonoides foram dissolvidos em metanol para obter soluções estoque na faixa de concentrações de 5 a 50 µg/mL. O extrato bruto de Thuja foi diluído em metanol para obter soluções na faixa de concentrações entre 100 a 2000 µg/mL.

Instrumentação e condições cromatográficas: O perfil cromatográfico das amostras do extrato de *Thuja occidentalis* foi realizado utilizando uma cromatografia líquida de desempenho ultra acoplado ao detector de arranjo diode (UPLC-DAD) da Shimadzu, composto pelos seguintes módulos: a bomba de alta pressão (Nexera modelo LC-20ADXR), desgaseificador (modelo DGU-20A3R), Auto-injetor (modelo SIL-20AXR), coluna cromatográfica forno (CTO-20A), detectores de arranjo de diodos (modelo EPDM-20A) e detector de ultravioleta (modelo SPD-M20A), um controlador (Modelo CBM-20A) e um software Shimadzu Labsolution.

A separação dos compostos fenólicos, flavonoides e demais constituintes ocorreu utilizando uma coluna de fase reversa (C18, 250 x 4,6 mm; 5 µm. Jupiter, phenomenex), e pré-coluna C:18. A fase móvel que consistiu de solvente A (1% ácido acético em água Milli-Q) e o solvente B (metanol), bombeado num fluxo de 0,8 ml / min. Temperatura do forno de 30 – 32 C°. O gradiente de eluição inicial consistiu de solvente B (25%) com uma variação da porcentagem para 60% no tempo 13 min, 95% no tempo 27.01, em seguida voltando a 25 % no tempo 32.01 minutos e volta à condição inicial a 37.01 min. Perfazendo o tempo total de 37 min de leitura. A robustez foi determinada com ácido acético a 0,1, 0,2 e 0,3 %.

Validação do método: para a avaliação de adequabilidade de todo o procedimento de determinação e quantificação dos flavonoides no extrato de *Thuja occidentalis*, o método foi validado de acordo com as determinações da ANVISA (BRASIL, 2003), para especificidade, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e robustez. A especificidade do método foi estimada, amostras contaminadas com padrão e soluções em brancos foram preparadas a partir da amostra real e analisada da mesma forma. A Recuperação e a acurácia do método foi realizada ao diminuir a concentrações da solução padrão misturada em três níveis diferentes de concentração. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram definidos como o menor valor analisado do composto que produz um pico reprodutível da variação da triplicata (3σ) e décupulo (10σ), respectivamente, na base do sinal de ruído dos analitos.

Resultados e Discussão:

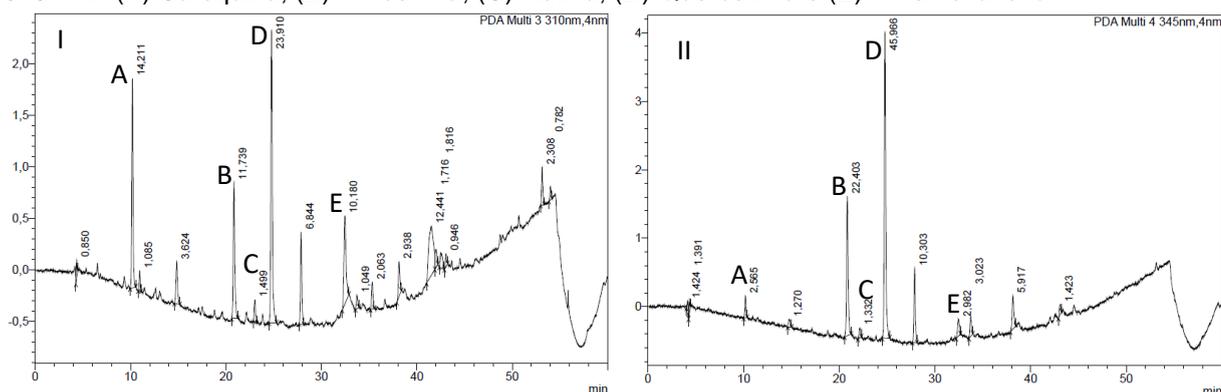
Perfil cromatográfico UPLC-DAD: o extrato de *Thuja occidentalis* exibiu picos similares aos flavonoides usados como padrões, confirmando a presença destes na planta. A figura 1. Mostra o perfil cromatográfico do extrato de Thuja nos comprimentos de onda 310 nm e 345 nm. Por meio da comparação dos tempos de retenção dos picos dos flavonoides padrões com os flavonoides presentes no extrato, foi possível identificar a presença dos seguintes flavonoides: catequina, miricetrina, amentoflavona, rutina e quercetrina. Foi observado que o comprimento de onda de 310 nm é mais sensível para a identificação de catequina e amentoflavona em relação ao comprimento de onda 345 nm, onde os picos destes flavonoides são muito fracos. Já o comprimento de onda de 345 nm obteve menos interferência para os demais flavonoides identificados no extrato. Os demais picos presentes no extrato não foram identificados devido à ausência de padrões.

Validação: O método proposto seguiu os parâmetros estabelecidos pela ANVISA.

Especificidade: não foram encontrados picos de interferentes nos tempos de retenção ao injetar o diluente (metanol) no sistema. Os flavonoides foram identificados com base nos tempos de retenção dos padrões individuais dos flavonoides co-injetados. Todos os flavonoides foram separados um do outro. O método foi apenas válido para os cinco flavonoides identificados com os padrões de referência usados. O método mostrou uma boa separação para todos flavonoides, como mostrado na figura 1.

Linearidade: As áreas de pico em cada nível de flavonoides foram calculadas para assegurar a linearidade do método. Os gráficos de cada área de pico versus cada concentração correspondente de flavonoides foram plotados. O coeficiente de correlação da linha de regressão para cada padrão de flavonoides foi de 0.998 a 0.999, mostrando que o método é linear. Os resultados estão resumidos na tabela 1.

Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato de *Thuja occidentalis* na concentração de 2000 µg/ml. (I) 310 nm, (II) 345 nm. (A) Catequina, (B) Miricetrina, (C) Rutina, (D) Quercetrina e (E) Amentoflavona



Exatidão: O experimento de recuperação foi realizado para avaliar a exatidão do método. A resposta dos três níveis (50%, 100%, 150%) de amostras de extratos contaminadas com padrão em triplicata produziu uma variação de recuperação máxima de 9,416% para a miricetrina. As variações de precisão/recuperações foram calculadas a partir da resposta de cada flavonoide individual. Os resultados demonstraram que o método é capaz de quantificar quatro flavonoides nos extratos de *Thuja* com exatidão. Os resultados estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de Linearidade, Precisão e Exatidão.

Nome	Linearidade		Precisão						Exatidão		
	Equação de regressão (Y=ax+b)	Coefficiente de Correlação (r)	500µg/mL DPR%	1000µg/mL DPR%	1500µg/mL DPR%	500µg/mL DPR%	1000µg/mL DPR%	1500µg/mL DPR%	50 R%	100 R%	150 R%
Miricetrina	y = 2909.2x - 2901.6	0.998	1.037	0.772	2.589	1.075	1.197	0.877	101.859	92.443	97.623
Quercetrina	y = 1581.3x - 2112.2	0.998	1.176	0.337	1.204	1.788	0.293	0.888	101.382	100.121	99.509
Amentoflavona	y = 5435.9x - 12520	0.999	2.421	2.439	0.664	3.513	5.636	5.688	100.504	97.146	99.168
Rutina	y = 2231.1x - 2325.6	0.999	1.661	2.517	0.696	5.111	2.803	1.74	97.052	95.802	96.635

*DPR= desvio padrão relativo; R%= Recuperação; Dados em µg/mL.

Precisão: A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A precisão intra-dia (repetibilidade) foi avaliada utilizando os resultados das quatro preparações contendo cada flavonoide. O Desvio padrão relativo (DPR) máximo dos flavonoides individuais foi de 2,589 (tabela 1). A precisão intermediária (inter-dia) foi avaliada por geração de dados em dias diferentes e teve um DPR máximo de 5,888% (tabela 1). Demonstrando que o método é preciso para a quantificação dos quatro flavonoides.

Tabela 2. Parâmetros de Robustez, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.

Nome	Robustez						LD µg/mL	LQ µg/mL
	Temperatura (°C)			Fase móvel ácida (%)				
	30 DPR%	31 DPR%	32 DPR%	0,1 DPR%	0,2 DPR%	0,3 DPR%		
Miricetrina	0.747	3.295	4.226	2.418	1.146	1.597	0.169	0.564
Quercitrina	1.781	0.69	1.19	1.112	1.677	1.308	0.600	2.001
Amentoflavona	3.083	5.551	6.083	2.386	0.558	1.689	0.489	1.631
Rutina	5.283	5.969	3.862	1.157	12.126	17.579	1.380	4.600

*DPR%= desvio padrão relativo; Dados em µg/mL.

Limite de detecção e limite de quantificação: os limites de detecção e quantificação dos flavonoides presentes no extrato foram determinados por soluções padrões e amostras contaminadas com padrão, como a menor concentração dando um sinal de ruído na proporção de 3 e 10 respectivamente. Os resultados de LD e LQ podem ser visualizados na tabela 2. Os LD dos flavonoides estavam na faixa de 0,169 a 1,38 µg/mL. Os resultados demonstram que o método é suficientemente sensível.

Robustez: o teste de robustez foi desenvolvido ao variar parâmetros operacionais do UPLC-DAD, como pH e temperatura, ao analisar a amostra do extrato de 500 µg/mL. Na tabela 2. É possível visualizar o desvio padrão relativo ao variar os parâmetros. Através da análise estatística ANOVA, observou-se que a variação do pH do método altera as concentrações do flavonoide Miricetrina e Amentoflavona com valor de p significativo de 0.0333 e 0.0012 respectivamente, ou seja ao alterar o pH do meio a quantidade destes flavonoides varia, já para a quercitrina e rutina não houve diferença significativa com valor de p igual a 0.861 e 0.467 respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas ao variar a temperatura do método para os quatro flavonoides. Demonstrando que o método proposto é robusto para quantificação da quercitrina e rutina.

Aplicabilidade: o método analítico foi aplicado com sucesso na identificação simultânea dos cinco flavonoides encontrado no extrato de *Thuja occidentalis*. Os resultados apresentados na Figura 1. corroboram

com a composição de flavonoides que já foi descrita na literatura anteriormente (NASER et al., 2005). O que sugere, que o método proposto é preciso e exato em identificar e quantificar os principais flavonoides presentes nos extratos de *Thuja occidentalis*.

Conclusões:

O perfil cromatográfico UPLC-UV do extrato de *Thuja occidentalis* mostrou picos e tempos de retenção semelhantes aos flavonoides utilizados como padrões, permitindo a identificação dos seguintes flavonoides: rutina, catequina, amentoflavona, miricetrina, quercetrina.

O método de UPLC-DAD desenvolvido para a análise simultânea da composição dos flavonoides do extrato de *Thuja occidentalis*. A preparação do procedimento foi simples e direta, sem requerer derivatização. Os cinco flavonoides foram separados usando coluna capilar de C18, 250 x 4,6 mm; 5 µm, num tempo total de 37 min. O método mostrou-se livre de interferentes dos diluentes usados e demonstrou especificidade para os cinco flavonoides identificados. A sensibilidade do método mostrou que o método é aplicável para a análise do extrato de *Thuja occidentalis*.

O método foi validado para a quantificação de quatro flavonoides presentes na Thuja: miricetrina, quercetrina, rutina e amentoflavona. Não foi possível quantificar a catequina por apresentar picos muito baixos em concentrações muito baixas. E o método apresentou robustez apenas para os flavonoides quercetrina e rutina, uma vez que foi observado que a variação do pH altera a concentração de amentoflavona e miricetrina.

O método seguiu as determinações da ANVISA, e mostrou ser específico, preciso e exato para a análise do extrato *Thuja occidentalis* e seus flavonoides majoritários. Esse método pode ser aplicado como marcador e monitorar a qualidade dos extratos de *Thuja occidentalis*.

Referências bibliográficas

- AHMAD et al. Novel investigations on *Thuja occidentalis* extract on rabbit hematological and biochemical parameters. **International Research Journal of Pharmacy**, Paquistão, v. 4, n. 3, p. 135-140, 2013.
- AKKOL et al. *Thuja occidentalis* L. and its active compound-thujone: Promising effects in the treatment of polycystic ovary syndrome without inducing osteoporosis. **Journal of Ethnopharmacology**, Turkey, v. 168, p. 25-30, 2015.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2003. Disponível em: http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf. Acesso em: 28/09/2016.
- DUBEY, S. K.; BATRA, A. Antioxidant activities of *Thuja occidentalis* Linn. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, India, v. 2, n. 1, p. 73-76, 2009.
- DUBEY, S. K.; BATRA, A. Role of phenolics in anti-atherosclerotic property of *Thuja occidentalis* Linn. **Ethnobotanical Leaflets**, India, v. 13, n. 1, p. 791-800, 2009.
- FIGUERÊDO, C. B. M. et al. Abordagem terapêutica para o Papilomavírus humano (HPV). **Rev. Bras. Farm.**, v. 94, n. 1, p. 4-17, 2013.
- JASUJA et al. Essential oil and important activities of *Thuja orientalis* and *Thuja occidentalis*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, India, v. 18, n. 4, p. 931-949, 2015.
- JOSEPH, et al. Successful treatment of verruca vulgaris with *Thuja occidentalis* in a renal allograft recipient. **Indian Journal of Nephrology**, v. 23, n. 5, p. 362-364, 2013.
- LOKESH et al. Neuropharmacological exploration of *Thuja occidentalis*. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 23, p. 143-148, 2011.
- NASER et al. *Thuja occidentalis* (arbor vitae): a review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Germany, v. 2, n. 1, p. 69-78, 2005.
- OJESWI et al. Protective effect of *Thuja occidentalis* against DMBA-induced breast cancer with reference to oxidative stress. **Human & Experimental Toxicology**, India, v. 29, n. 5, p. 369-375, 2010.
- PETRY, R. D.; ORTEGA, G. G.; SILVA, W. B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride-flavonoid complex. **Pharmazie**, v. 56, n. 6, p. 465-470, 2001.