

Validação do método de extração e quantificação de 7-hidróxi- 4',6-dimetóxi-isoflavona em culturas de células em suspensão e calos de *Dipteryx odorata*

Renata dos Santos Fernandes¹; Miriam Vergínia Lourenço¹; Carlos E. S. Miranda¹; Suzelei de Castro França¹; Ana Helena Januário^{2*}

¹Universidade de Ribeirão Preto-Unaerp- 14096-380- Ribeirão Preto- SP

²Universidade de Franca-Unifran- 14404-600- Franca- SP

*anahjanuario@unifran.br

Resumo: O presente trabalho consiste no desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE/DAD para a detecção da 7-hidróxi-4',6-dimetóxisoflavona em culturas de células em suspensão e calos de *Dipteryx odorata* cultivados *in vitro*. Os parâmetros de validação: curva analítica, linearidade, precisão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação foram avaliados e os resultados obtidos demonstraram que o procedimento analítico proposto para a detecção e dosagem desta isoflavona está dentro dos parâmetros recomendados pela RE899/03-ANVISA, podendo ser utilizado para o controle de qualidade de culturas de células cultivadas *in vitro* desta espécie vegetal.

Palavras-chave: CLAE/DAD; *Dipteryx odorata*; isoflavona

Introdução

A coleta de plantas medicinais em larga escala pode representar um sério problema ecológico, pois, pode causar uma severa redução ou mesmo a extinção de uma determinada espécie vegetal. Uma solução interessante para esse problema seria o cultivo de tecidos vegetais *in vitro*.

O cultivo de tecidos vegetais *in vitro* pode minimizar os efeitos negativos provocados por fatores ambientais, bem como assegurar um maior controle sobre as condições de temperatura, luz e nutrientes. Como resultado disso, a produção de compostos de valor econômico seria viabilizada [1].

As plantas não são exclusivamente utilizadas como fonte potencial de princípios ativos isolados, quimicamente definidos, mas o uso de

extratos é uma alternativa, desde que a atividade farmacológica esteja definida, assim como os compostos responsáveis por esta atividade. Em alguns casos, o efeito terapêutico pode resultar da ação de vários princípios ativos. Para assegurar o controle de qualidade e a ação farmacológica, esse tipo de fármaco deve ser padronizado em um certo teor de princípios ativos. No caso dos princípios ativos não serem conhecidos, os compostos mais representativos do extrato deverão ser selecionados como padrões [2].

Técnicas cromatográficas como a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), CCDC (Cromatografia em Camada Delgada Comparativa), CG (Cromatografia Gasosa) ou eletroforese capilar acopladas a técnicas espectroscópicas, têm sido largamente usadas para identificação de material ou extratos vegetais.

A CLAE é utilizada rotineiramente em fitoquímica tanto para isolamento de produtos naturais como para o controle de pureza de compostos isolados. Os cromatogramas que são empregados como impressão digital são comparados àqueles de amostras desconhecidas para permitir a identificação de drogas ou para efetuar pesquisa de adulterações. A CLAE/DAD, (DAD: Detector de Arranjo de Diodo) tem sido muito utilizada para a análise de extratos vegetais, fornecendo informações importantes quanto ao tipo de constituintes presentes. Na literatura, são encontrados vários exemplos da utilização dessa técnica, tanto para obtenção como para quantificação de seus componentes. [3,4,5].

Dipteryx odorata (Aubl.) Willd. (Fabaceae) é conhecida popularmente na região amazônica pelo nome “cumaru”[6].

Dados de literatura relatam a presença de diversas isoflavonas nesta espécie vegetal. Na casca do caule de *D. odorata* destaca-se a presença da dipterixina e odoratina, [7,8] enquanto que na madeira foram encontradas as isoflavonas: odoratin, dipterixin, retusin, 8-metóxi-retusin e 3-hidróxi-8-metoxi-retusin [9,10]. Culturas *in vitro* desta espécie também se mostraram fontes promissoras no acúmulo de isoflavonas [11].

Os isoflavonóides têm adquirido considerável importância por exibirem diversas atividades biológicas: antioxidante, antifúngica, bactericida, antiinflamatória, estrogênica e contraceptiva [12].

Em estudo anterior a isoflavona 7-hidróxi-4',6-dimetóxisoflavona (**1**) isolada dos calos de *D. odorata* se mostrou ativa contra a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do *Tripanosoma cruzi* [11]. Embora esta isoflavona seja um composto de larga ocorrência em espécies de leguminosas, sua origem biossintética ainda é debatida, e estudos de detecção e quantificação deste composto e seus derivados em cultura de células são de grande importância em estudos biossintéticos [13].

Validação

Para garantir que uma nova metodologia analítica gere informações confiáveis e facilmente interpretáveis sobre a amostra, a mesma deve passar por um procedimento de avaliação denominada validação. A validação de uma metodologia é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao

longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para o registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que definem as diretrizes a serem adotadas no procedimento de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que as metodologias e os sistemas são adequados para o uso proposto [14].

No Brasil, há duas agências credenciadas para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, os quais são, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899 de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 03/2003 [14].

Segundo a ANVISA, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados [15,16,17].

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo implementar e validar um método analítico capaz de detectar e quantificar a 7-hidróxi-4',6-dimetóxisoflavona (**1**), principal metabólito secundário presente nas culturas de células em suspensão e calos de *Dipteryx odorata*, popularmente conhecida como afrormosina, afromosina ou castanina (Figura 1), visando o controle de qualidade de cultura de células cultivadas *in vitro* desta espécie vegetal.

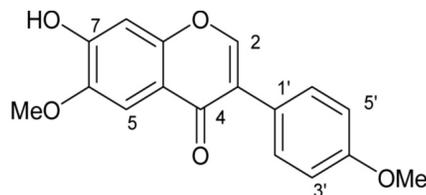


Figura 1. Estrutura da 7-hidróxi-4',6-dimetóxisoflavona (**1**).

Materiais e Métodos

Material Vegetal

Raízes de plântulas de *D. odorata* cultivadas *in vitro* foram seccionadas e inoculadas em meio de cultura MS suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenóxiacético) + 0,5 mg/L de 6-BAP (6-benzilaminopurina) + 340 mg/L de KH_2PO_4 + 30 g/L de sacarose e 2,0 g/L de Phytigelâ para a indução de calos. Os calos obtidos foram subcultivados em intervalos de 30 dias. As suspensões celulares, por sua vez, foram obtidas através da transferência dos calos do meio semi-sólido para meio líquido. As culturas de células em suspensão e os calos de *Dipteryx odorata* cultivados *in vitro*, foram liofilizados, triturados e submetidos a processos de extração com MeOH. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

Instrumentação e parâmetros cromatográficos

Os extratos foram submetidos à análise em um cromatógrafo Shimadzu (modelo LC-10AD VP) com detector de arranjo de diodo (modelo SPD- M10A vp) e injetor automático (modelo SIL-10AD vp), com volume de injeção de 20mL. Foi utilizada uma coluna Supelcosil™ LC18 (4,6 x 250 mm, Supelco®), com partículas de 5 mm). No sistema eluente, foi adotada a eluição com gradiente envolvendo a mistura binária MeOH/H₂O (0,1% ácido acético). A composição da fase móvel variou de 50% a 100% (20 min), de 100% a 50% (6 min), 50% (10 min) com fluxo de 0,9 mL/min. Foi utilizado um detector espectrofotométrico e a detecção foi feita na região do UV em 254nm.

Validação do Método

A quantificação do composto de interesse foi obtida através do método do padrão externo, o qual consiste na construção de uma curva de calibração, a partir de soluções-padrão de concentrações conhecidas.

Os parâmetros analíticos avaliados para o método de validação foram: linearidade, precisão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação.

Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados que expressem um

relação de proporcionalidade entre um sinal físico medido e a concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa analítica. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada gera a curva analítica, a qual pode ser matematicamente expressa pela equação da reta, cuja resolução permite a quantificação do analito.

Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação **r**. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Para o estudo da linearidade preparou-se uma solução estoque da isoflavona **1** na concentração de 10 mg/mL, dissolvendo-se a isoflavona **1** em metanol grau HPLC, foram realizadas diluições para a obtenção das seguintes concentrações: 10; 1; 0,1; e 0,01 mg/mL. A curva de calibração foi construída plotando-se os valores médios das áreas dos picos cromatográficos em função das concentrações.

Precisão

A precisão reflete a concordância entre os resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Pode ser expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. Pode ser considerada em três níveis diferentes: repetibilidade intra e inter-ensaio e reprodutibilidade. É calculada através da seguinte equação:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad \text{DPR} = \text{desvio padrão relativo}$$
$$\text{CMD} \quad \text{DP} = \text{desvio padrão}$$
$$\text{CMD} = \text{concentração média determinada}$$

A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade (precisão intra-corrída), injetando-se em triplicata os extratos metanólicos dos calos e células em suspensão de *D. odorata*, registrando-se os valores das áreas dos picos cromatográficos e calculando-se o desvio padrão das determinações.

Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação),

R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada ao material teste, que é passível de ser extraída e quantificada.

Para a avaliação da recuperação foram preparadas, amostras de calos e células em suspensão na concentração de 0,01 mg PS/mL, onde PS = Peso Seco, utilizando metanol como solvente. Outras três soluções de calos e células em suspensão foram preparadas, adicionando-se a cada solução, 10 mL de uma solução 0,01 mg/mL da isoflavona **1** empregada como padrão. As determinações de concentração de cada solução foram feitas em triplicata, e calculadas as porcentagens de recuperação.

Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade de um método distinguir pequenas variações de concentração, sendo determinada através dos limites de quantificação e de detecção.

Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. A magnitude do sinal físico medido deve ser três vezes a magnitude do sinal do ruído.

$$LD = \frac{DPc}{IC} \times 3 \quad DPc = \text{desvio padrão da curva} \\ IC = \text{coeficiente angular da reta}$$

Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. A magnitude dessa concentração limite deve ser dez vezes a magnitude do sinal do ruído.

$$LD = \frac{DPc}{IC} \times 10 \quad DPc = \text{desvio padrão da curva} \\ IC = \text{coeficiente angular da reta}$$

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pela divisão do desvio padrão da curva de calibração pelo seu coeficiente angular, multiplicados por 3,0 e 10,0, respectivamente. As determinações foram calculadas em 10 replicatas.

Resultados e Discussão

A análise qualitativa dos extratos metanólicos das culturas de calos e células em suspensão de *D. odorata* por CLAE apresentaram o mesmo perfil cromatográfico (Figura 2), sendo o teor da isoflavona **1** nas culturas de calos de $41,353 \pm 1,954$ mg/gPS e nas células em suspensão de $37,779 \pm 0,444$ mg/gPS (Tabela 1).

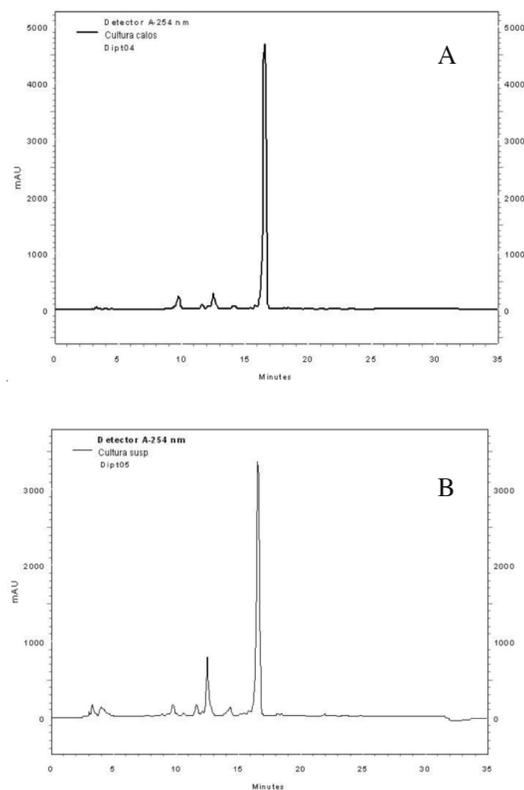


Figura 2. Perfil cromatográfico obtido por CLAE das culturas de células de *D. odorata* a 254 nm. A) Cultura de calos e B) Cultura de células em suspensão.

Essa análise demonstrou que o composto majoritário presente nas amostras corresponde a isoflavona **1** (Figura 3A), que apresenta $t_R = 16,45$ min e cujo espectro no UV possui dois máximos de absorção a 258 e 320 nm (Figura 3B).

Tabela 1. Teor da Isoflavona 1 nas matrizes de *D. odorata* avaliadas.

Matriz	Concentração (mg/gPS)*
Calos	41,353 ± 1,954
Células em suspensão	37,779 ± 0,444

* Média +/- desvio padrão

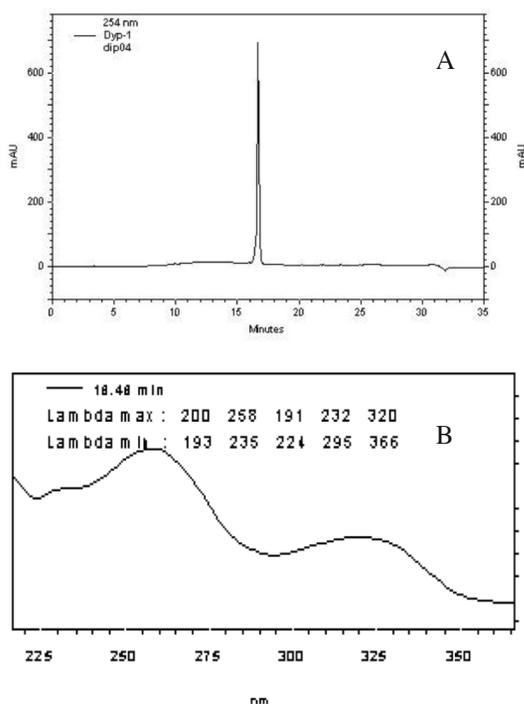


Figura 3. A) Cromatograma obtido por CLAE; B) Espectro no UV da isoflavona 1.

Para as análises qualitativas e quantitativas foi utilizado como padrão secundário a própria isoflavona **1**, previamente isolada e identificada por JANUÁRIO [4]. Foi construída a curva de calibração para a isoflavona **1** (Figura 4) com quatro pontos no intervalo de concentração de 0,001 a 1 mg/mL. A curva apresentou uma excelente linearidade entre a concentração e a área do pico correspondente a isoflavona, a qual é demonstrada pelo $R = 0,99987$. A equação de regressão linear obtida foi: $y = 8,96 \times 10^7 x + 359212,3984$, onde x é a concentração e y é a área do pico.

Curva de Calibração

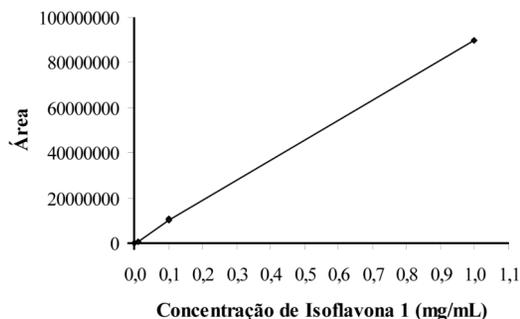


Figura 4. Curva de Calibração da isoflavona 1 pelo método cromatográfico, CLAE.

Os resultados de precisão e recuperação são apresentados na Tabela 2 e demonstraram que apesar dos cromatogramas dos calos e das células em suspensão serem bastante similares, a precisão obtida para as células em suspensão foi muito boa com valor da ordem 1,95 %, enquanto que para os calos esse valor foi superior de 8,04 %. Essa discordância entre os resultados deve-se, possivelmente, às diferenças existentes entre as matrizes. Enquanto que os calos apresentam-se como uma massa de células desorganizadas e parcialmente desdiferenciadas, nas células em suspensão sua aparência é mais uniforme.

Tabela 2. Resultados da precisão e recuperação das matrizes testadas.

Matriz	Precisão (%)	Recuperação (%)
Calos	8,04	90,720
Células em suspensão	1,95	78,401

Foram obtidos limites de detecção e de quantificação de (0,0018 mg/mL) e (0,062 mg/mL), respectivamente, os quais foram determinados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, utilizando-se o fator multiplicador apropriado.

Conclusões

O método analítico proposto para extração, detecção e quantificação da isoflavona 7-hidróxi-4',6-dimetóxisoflavona (**1**) em cultura de células em suspensão e calos de *Dipteryx odorata* apresentou resultados satisfatórios em todas as etapas do processo de validação, dentro dos parâmetros recomendados pela RE 899/03-ANVISA, mostrando ser sensível, preciso e linear, podendo contribuir para o controle de qualidade de culturas de células cultivadas *in vitro* desta espécie vegetal.

R.S. Fernandes, M.V. Lourenço, C.E.S. Miranda, S.C. França, A.H. Januário. Validation of the methodology for extraction and quantitation of the 7-hydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone in suspension cells and callus cultures of *Dipteryx odorata*.

Agradecimentos

Ao técnico de laboratório José Franciraldo de Lima pela manutenção das culturas de *D. odorata* e a CAPES pelo suporte financeiro.

Received August 06 2008

Accepted November 05 2008

Abstract: The present work consists of the development and validation of HPLC analytical methodology for the evaluation of 7-hydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone in cells suspension and callus culture of *Dipteryx odorata*. The validation parameters: analytical curve, linearity, precision, recovery, detection limit and quantification limit were determined and they demonstrated that the analytical procedures for the detection and quantification for this isoflavone follow the requirements of regulatory RE899/03- National Health Surveillance Agency (ANVISA) and could be applied to cells culture quality control of this vegetal species.

Keywords: CLAE/DAD; *Dipteryx odorata*; isoflavona.

Referências

- [1] Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, Chichester, 1st edn., 1997.
- [2] Hostettmann, K.; Queiroz, E. F.; Vieira, P. C. Princípios ativos de Plantas Superiores, EdUFSCar, 1^a ed., 2003.
- [3] Paiva, S.R.; Fontoura, L.A.; Figueiredo, M.R.; Mazzei, J.L.; Kaplan, M.A.C. Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L. e *Plumbago auriculata* LAM Química Nova 25 (5) (2002), 717.
- [4] Gikas, E.; Alesta, A.; Economou, G.; Karamanos, A.; Tzarbopoulos, A. Determination of isoflavones in the aerial part of red clover by HPLC-diode array detection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 31(8) (2008), 1181.
- [5] Heimler D.; Vignolini, P.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Romani, A. Simple extraction and rapid quantitative analysis of isoflavones in soybean seeds.
- [6] Andrade, E. H. A.; Zoghbi, M. B.; Carreira, L. M. M. Volatile Constituents of the Flower of *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. Journal of Essential Research 15 (2003), 211.
- [7] Nakano, T.; Alonso, J.; Grillet, R.; Martin, A. Isoflavonoids of the bark of *Dipteryx odorata* Willd. (Aubl) Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1 (9) (1979), 2107.
- [8] Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas 1^a Edição. São Paulo, Instituto Plantarum 303, 2002.
- [9] Hayashi, T.; Thomson, R.H. *Isoflavones from Dipteryx odorata*. *Phytochemistry* 13(9) (1974), 1943.
- [10] Sullivan, G. Occurrence of Umbelliferone in the seeds of

- Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. Journal of Agricultural and Food Chemistry 367 (1) (1982), 609.
- [11] Januário, A.H.; Lourenço, M. V.; Domézio, L. A.; Pietro, R. C. L. R.; Castilho, M. S.; Tomazela, D. M.; Silva, M. F. G.F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; França, S. C. Isolation and Structure Determination of Bioactive Isoflavones from Callus Culture of *Dipteryx odorata*. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 53 (5) (2005), 740.
- [12] Jang, D.S.; Park, E.J.; Hawthorne, M.E.; Vigo, J.S.; Graham, J.G.; Cabieses, F.; Santarsiero, B.D.; Mesecar, A.D.; Fong, H.H.; Mehta, R.G.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. Potencial cancer chemopreventive constituents of the seeds of *Dipteryx odorata* (tonka bean). J. Nat. Prod. 66(5) (2003), 583.
- [13] Farag, M.A.; Huhman, D.V.; Dixon, R.A.; Sumner, L.W. Metabolomics reveals novel pathway and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in medicago truncatula cell cultures. Plant Physiology 146 (2008), 387.
- [14] Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, 27(5) (2004), 771.
- [15] Lanças, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. RiMa, São Carlos, 2004.
- [16] Cass, Q. B.; Degani, A. L. G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e Validação, EdUFSCar, São Paulo, 2001.
- [17] Neto, E. M.; Shuqair, N. S. M. S. A. Q.; Balbino, E. E.; Carvalho, A. C. B. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. Revista Fitos. 1(3) (2006), 9.