

Validação de metodologia analítica para controle de qualidade de cultura de calos de *Dipteryx odorata* por HPLC-DAD

Renata S. Fernandes¹ (PG), Miriam V. Lourenço¹ (PQ), Mozart A. Marins¹ (PQ), Suzelei de C. França¹ (PQ), Carlos E. S. Miranda² (PQ), Ana H. Januário^{1,*} (PQ)

anahjanuario@hotmail.com

¹Unidade de Biotecnologia - Universidade de Ribeirão Preto

²Curso de Ciências Farmacêuticas - Universidade de Ribeirão Preto

Palavras Chave: *Dipteryx odorata*, HPLC-DAD, isoflavona

Introdução

Em estudos anteriores, tem sido observado que culturas de células *in vitro* de *Dipteryx odorata* (Fabaceae) são fontes promissoras de isoflavonóides, dos quais se destaca, como composto majoritário, a 7-hidróxi-4',6'-dimetóxi-isoflavona (isoflavona 1).

Os isoflavonóides têm adquirido considerável importância por exibirem diversas atividades biológicas: antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antiinflamatória, estrogênica e contraceptiva¹.

Neste trabalho, foi feito um procedimento de validação analítica para determinação do teor da isoflavona 1 em culturas de calos de *Dipteryx odorata* cultivadas *in vitro* empregando-se HPLC-DAD.

No procedimento de validação da metodologia, foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação.

Materiais e Métodos

Plântulas cultivadas 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 + 0,5 mg/L de 6-BAP + 340 mg/L de KH₂PO₄ + 30 g/L de sacarose e 2,0 g/L de Phytigel® para a indução de calos. Os calos obtidos foram subcultivados em intervalos de 30 dias, liofilizados, triturados e submetidos a processos de extração com MeOH em triplicata.

Para as análises cromatográficas empregou-se um cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodo (modelo SPD- M10A *vp*) e injetor automático modelo (SIL-10AD *vp*), com volume de injeção de 20 µL; coluna Supelcosil™ LC18 (4,6 x 250 mm, Supelco®), partículas de 5 µm. Com respeito ao sistema eluente, foi utilizado um gradiente de MeOH/H₂O (0,1% ácido acético) 50% → 100% (20 min), 100% → 50% (10 min) com fluxo de 0,9 mL/min e detecção no UV em 254nm.

A isoflavona 1 foi utilizada como padrão externo secundário e foi construída uma curva de calibração de quatro pontos.

Resultados e Discussão

A curva analítica obtida $y = 359212,3984 + 89573247,8904x$ apresentou-se linear no intervalo de concentração de 0,001 a 0,1 mg/mL com coeficiente de correlação 0,999.

O teor médio da isoflavona 1, encontrado nos extratos metanólicos dos calos de *D. odorata*, foi de $150,66 \pm 12,13$ mg/g PS, e apresentou nível de recuperação de $90,72 \pm 7,55\%$.

O método apresentou uma boa precisão com desvio padrão relativo (RSD) de 8,04% para as medidas de área relativa, o qual é inferior aos 15% recomendados pela literatura².

Os limites foram calculados, obtendo-se os valores de 1,9 µg/mL para o limite de detecção e de 6,2 µg/mL para o limite de quantificação.

Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que o procedimento analítico proposto é simples e eficaz para a detecção e dosagem da isoflavona 1 dentro dos parâmetros recomendados pela RE 899/03 - ANVISA², podendo contribuir para a avaliação do teor dessa classe de substâncias em controle de qualidade de cultura de células cultivadas *in vitro* dessa espécie vegetal.

Agradecimentos

CAPES, UNAERP

¹ 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.S.; Mehta, R.G.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. *Journal of Natural Products* **2003**, *66*, 583.

² http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm