



## **Desenvolvimento e validação de método analítico para a determinação de marcadores no estigma de *Zea mays* L. (POACEAE)**

**Guilherme Pereira de Souza<sup>1\*</sup>, Pabline da Silva Gasparoti<sup>2</sup>, Joelma Abadia Marciano de Paula<sup>3</sup>**

<sup>1\*</sup>Graduando do curso de Farmácia, bolsista na modalidade PIBITI/CNPq, CCET, Universidade Estadual de Goiás, e-mail: guilherme8619@gmail.com; <sup>2</sup>Pós-Graduanda do PPGCAPS, CCET, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis-GO; <sup>3</sup>Docente, CCET, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis-GO.

Resumo: Os estigmas do milho (*Zea mays* L. – Poaceae), tradicionalmente designados de “cabelo de milho” ou “barba de milho”, são partes do milho frequentemente descartadas e que apresentam grande potencial de aproveitamento. São ricos em compostos fenólicos, como flavonoides do tipo flavonas, que podem apresentar atividades diurética, antibiótica e antioxidante. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico espectrofotométrico para quantificar flavonoides totais expressos como apigenina no estigma de milho. Os estigmas de milho foram coletados em pamonharias do município de Anápolis, Goiás. Quatro métodos analíticos espectrofotométricos foram avaliados e aquele considerado mais rápido, econômico, simples e ambientalmente sustentável foi validado segundo critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O método 4 (líquido extrator: etanol a 50% (v/v), extração em ultrassom a temperatura de 65 °C, tempo de 60 minutos e detecção em 397nm) foi escolhido para ser validado, pois apresentou teor de flavonoides totais expressos como apigenina de 1,698% ( $\pm 0,01$ ) e cumpriu os demais parâmetros estabelecidos no estudo. Quanto aos parâmetros de validação, o método analítico demonstrou não sofrer interferência da matriz, além de ser linear, preciso, exato, seletivo, robusto.

Palavras-chave: Flavonoides. Flavonas. Extração Assistida por Ultrassom. Espectrofotometria.

### **Introdução**

Os estigmas de *Zea mays* L. (Poaceae), conhecidos como “cabelo de milho”, são muitas vezes descartados no processamento do milho. No entanto, eles possuem, entre outros compostos, flavonoides da classe flavonas, conhecidos por apresentarem propriedades farmacológicas no organismo humano. Foram investigadas várias atividades farmacológicas do estigma de milho, como: antioxidante, anti-inflamatória, nefroprotetora, antifadiga, diurética, hipoglicêmica (HASSANUDIM; HASHIM;





MUSTAFA, 2012). Estes achados apontam para o potencial fitoterápico desse material vegetal.

Os fitoterápicos, por apresentarem ampla complexidade na composição química, são grandes desafios para os farmacêuticos e químicos. São necessárias pesquisas e padronizações dos extratos que compõem os fitoterápicos, para então informar aos usuários quais são os principais princípios ativos e as concentrações ideais (YUNES *et al.*, 2001). Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método analítico simples, econômico, eficiente e rápido na quantificação de flavonoides totais, expressos como apigenina, nos estigmas do milho.

### Material e Métodos

**Material vegetal:** Os estigmas de milho verde foram adquiridos na Pamonharia Bougainville, na cidade de Anápolis, Goiás, Brasil. O material passou pelo processo de separação de material estranho. Em seguida, foi submetido ao processo de secagem em estufa (40 °C) e pulverizado em moinho de facas. O pó de *Stigma maydis* foi mantido em saco plástico vedado, ao abrigo da luz.

**Escolha do método analítico:** Foram realizadas pesquisas na literatura de métodos analíticos espectrofotométricos para a determinação de flavonoides totais, expressos a partir de núcleos flavônicos da classe flavonas. Dois métodos analíticos publicados na Farmacopeia Brasileira 6<sup>o</sup> ed. (BRASIL, 2019) foram selecionados e adaptados para investigação: *Passiflorae acetum folium* e *Persea folium*. Os ensaios foram realizados em triplicata e como critérios foram adotados princípios de sustentabilidade do método e os maiores teores de flavonoides totais, expressos como apigenina.

Os cálculos dos teores de flavonoides totais expressos como apigenina foram realizados pela equação:

$$TF = \frac{A \times FD}{365,3}$$

Em que: TF= teor de flavonoides totais expressos em apigenina (p/p); A= absorvância medida para a solução amostra; FD= fator de diluição da amostra; 365,3= coeficiente de absorção específica da apigenina





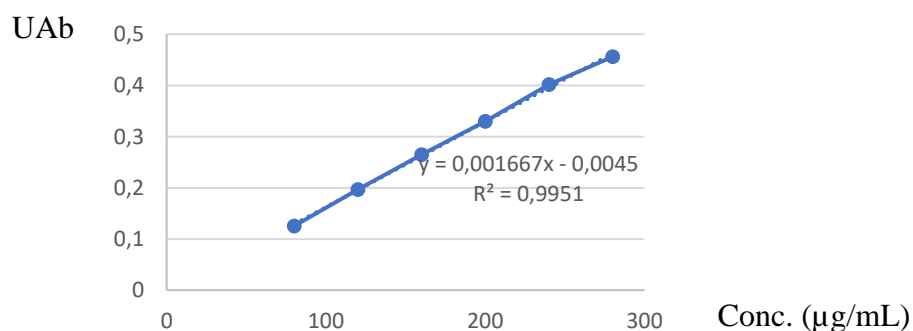
**Validação do método analítico:** A validação da metodologia analítica foi realizada conforme as orientações estabelecidas pela RDC nº 166, 24 de julho de 2017. Foram realizados os testes de linearidade, efeito matriz, exatidão, precisão, seletividade, robustez, limite de detecção e de quantificação (BRASIL, 2017).

## Resultados e Discussão

**Escolha do método analítico:** O método analítico que melhor atendeu aos critérios de sustentabilidade e teor de flavonoides totais, expressos em apigenina consistiu em: preparo da amostra (0,4g) em 50 mL de etanol 41% (v/v) por extração assistida por ultrassom (63 °C, por 80 min). Após filtração, 0,8mL do extrato foram transferidos para balão volumétrico de 10mL. Adicionou-se 0,8mL de cloreto de alumínio a 2% (p/v) em álcool etílico a 50% (v/v), completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. Para o preparo da solução branco, foram transferidos 0,8mL do extrato para balão volumétrico de 10mL, completou-se o volume com álcool etílico a 50% (v/v) e homogeneizou-se. A absorvância da amostra foi medida em espectrofotômetro UV-VIS da marca Biospectro SP22, 30 minutos após seu preparo, em comprimento de onda de 397nm, em cubeta de 1cm, utilizando o branco para o ajuste do zero. Esse método foi validado e os resultados são apresentados a seguir.

**Validação do método analítico:** Para a linearidade o método desenvolvido apresentou a seguinte equação representativa:  $y = 0,001667x - 0,0045$  e coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) = 0,9951, demonstrando que a resposta analítica é proporcional à concentração do analito (Figura 1).

Figura 1: Curva de calibração média do padrão apigenina no intervalo de concentração de 80 a 280 µg/mL para o comprimento de onda de 397 nm.

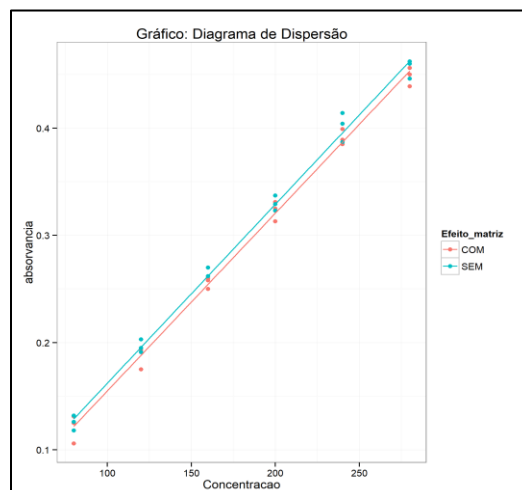




A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intradia) e pela precisão intermediária (interdia), por dois analistas diferentes em dias distintos. No primeiro dia pelo analista 1, obteve-se um Desvio Padrão Relativo (DPR) de 3,76% para as absorvâncias nas 6 amostras preparadas a 100%. Para as 6 amostras preparadas no segundo dia pelo analista 2, obteve-se um DPR de 3,18% e o DPR entre os dias foi de 3,44%, todos em conformidade com Brasil (2014).

O efeito matriz foi realizado com a finalidade de verificar se os componentes da matriz interferem na resposta analítica (BRASIL, 2017). A Figura 2 mostra o gráfico de dispersão de 2 curvas de calibração, padrão apigenina e amostra fortificada com o padrão, demonstrando o paralelismo entre as retas.

Figura 2 – Gráfico de dispersão gerando 2 curvas de calibração paralelas.



A exatidão foi avaliada por meio do método de recuperação, com resultados de 118,08% e DPR% de 5,70%.

O método mostrou ser seletivo, pois a média dos resultados da recuperação, baseados nos teores de flavonoides totais, expressos como apigenina, de 6 amostras comparadas ao padrão apigenina (preparadas a 100% da substância química de referência) foi de 101,57%.

Para confirmar a robustez do método foi calculado o DPR utilizando o tempo de extração no ultrassom de 75 minutos que foi de 3,48%, no tempo de 80 minutos de 1,19% e utilizando 85 minutos o DPR foi de 4,33%, e o DPR entre eles foi de 3,96%. Utilizando marcas diferentes de etanol foi encontrado DPR para a marca Neon de 1,06%





e para a marca Sinthy de 1,19%, com DPR entre as marcas de 3,24%. O DPR para os dados obtidos em leitura a 396nm em espectrofotômetro foi de 1,89%, para as leituras a 397nm foi de 1,19% e para o comprimento de onda a 398nm foi de 1,07%, e o DPR relativo entre os três comprimentos de onda foi de 3,12%, todos em conformidade com Brasil (2014).

Os limites de detecção e de quantificação, estimados com base no desvio padrão do intercepto com o eixo y, foram de 16,05 µg/mL e 48,644 µg/mL, respectivamente.

### Considerações Finais

O método analítico escolhido demonstrou ser simples, econômico, eficiente, rápido e sustentável para a determinação de flavonoides totais, expressos como apigenina, em extratos de estigma de milho. Além disso, demonstrou ser linear, exato, preciso, seletivo, robusto e os componentes da matriz não interferiram na resposta analítica. Portanto, está apto a ser empregado na rotina do controle de qualidade e padronização dos extratos do estigma de *Zea mays* L.

### Agradecimentos

À Universidade Estadual de Goiás – UEG, pela oportunidade de realizar a Iniciação Científica; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa PIBITI.

### Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019.

HASSANUDIM, K.; HASHIM, P.; MUSTAFA, S. Corn Silk (*Stigma Maydis*) in Healthcare: A Phytochemical and Pharmacological Review. **Molecules**, v. 17, n.8, p. 9697-715, 2012.

YUNES. R. A.; VALDIR, F. C.; Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica: obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. *In*: YUNES, R, A; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Moderna**, Chapecó: Ed. Argos, 2001. p. 47-75.

