

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona**

**SIMONE GASPARIN VERZA**

**PORTO ALEGRE, 2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona**

Dissertação apresentada por **Simone Gasparin Verza** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 12 de abril de 2006 pela Comissão/Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Osvaldo de Freitas  
Universidade São Paulo

Profa. Dr. Valquiria Linck Bassani  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

V574a Verza, Simone Gasparin

Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona / Simone Gasparin Verza – Porto Alegre : UFRGS, 2006. - xxviii, 134 p.: il., gráf., tab.

Dissertação(mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Taninos. 2. Métodos analíticos. 3. Complexação. 4. Caseína. 5. Pó-de-pele. 6. CLAE. 7. PVPP. I. González Ortega, George. II. Título.

CDU:615.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB10/480

*Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico, empregando também equipamentos da Central Analítica e do Laboratório de Química Farmacêutica, com suporte financeiro concedido pelo CNPq a quem expresso nossos agradecimentos.*



**“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso antes de mais nada, querer.”**

**Amyr Klink**





## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Professor Dr. George González Ortega, pela acolhida, pela confiança, orientação, incentivo e exemplo profissional.

Aos professores Dr. Pedro Ros Petrovick, Dra. Valquíria Linck Bassani e Dr. Paulo Mayorga, pelo apoio e contribuição para meu crescimento profissional e pela ética profissional.

Aos amigos de laboratório o meu muito obrigada, pelo aprendizado e pela amizade, em especial, Ana Paula, Angélica, Bárbara, Camila, Daniel, Elias, Francilene, Gizele, Greice, Gustavo Petrovick, Iguatinã, Janine, Juliana, Liége, Luana, Maria Kreinecker, Mariana Meurer, Maribete, Olívia, Paula, Rafael, Renata, Roberta, Samuel e Tiago Sausen. Em particular, ao Cabral, pelo aprendizado e ajuda técnica. Aos bolsistas de iniciação científica: Gustavo Borré, Lísias, Luana, Maria, Mariana Petry, Paula, Thiago e em particular Vinícius, pela ajuda no trabalho experimental. Contem sempre comigo!

À todos os colegas e professores deste programa de Pós-Graduação pela convivência e disponibilidade sempre que necessário.

À colega e amiga Maria Luisa que me auxiliou e incentivou para que eu ingressasse na Pós-Graduação e aos amigos que trago comigo pelo carinho, amizade e compreensão.

À minha família que me apoiou incondicionalmente e com amor me acompanhou, durante esse percurso, em especial, minha mãe, Lourdes, meu pai, Severino e minha irmã Daniela.

E finalmente, ao meu querido Daniel, pelo amor, carinho, apoio e companheirismo em todos os momentos difíceis, sem o quais essa trajetória não seria a mesma.



## Sumário

Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Figuras .....	xvii
Lista de Anexos .....	xxi
Lista de Abreviaturas.....	xx
Resumo .....	xxv
Abstract .....	xxvii
1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA .....	1
2. OBJETIVOS .....	5
2.1 Objetivo Geral.....	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	9
3.1 Taninos: estrutura e classificação .....	11
3.2 Atividades farmacológicas .....	13
3.3 Métodos de doseamento de taninos.....	14
3.3.1 Métodos de oxi-redução com formação de complexo .....	15
3.3.2 Métodos baseados na precipitação de proteínas .....	16
3.3.2.1 Complexação de polifenóis com pó-de-pele e caseína .....	22
3.3.3 Complexação com derivados da povidona .....	24
3.3.4 Aspectos analíticos por CLAE .....	27
3.4 Validação de métodos analíticos .....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31

4.1 Materiais .....	33
4.1.1 Matéria-prima vegetal .....	33
4.1.2 Reagentes, solventes e substâncias de referência. ....	33
4.1.3 Agentes precipitantes .....	33
4.1.4 Aparelhos equipamentos e materiais diversos .....	33
4.2 Métodos.....	34
4.2.1 Caracterização da matéria-prima vegetal .....	34
4.2.1.1 Identificação botânica .....	34
4.2.1.2 Secagem e moagem do material vegetal .....	34
4.2.1.3 Determinação da perda por dessecação .....	34
4.2.2 Preparo da solução extrativa para análise do teor de taninos .....	35
4.2.3 Caracterização da solução extrativa para análise do teor de taninos.....	35
4.2.3.1 Análise cromatográfica qualitativa de taninos condensados e hidrolisáveis.....	35
4.2.3.2 Determinação do pH.....	36
4.2.3.3 Determinação do resíduo seco .....	36
4.2.4 Preparação do produto seco liofilizado.....	36
4.2.5 Caracterização do produto seco liofilizado .....	37
4.2.5.1 Determinação da perda por dessecação .....	37
4.2.5.2 Análise cromatográfica qualitativa de taninos condensados e hidrolisáveis.....	37
4.2.6 Caracterização das substâncias de referência .....	37

4.2.6.1 Espectroscopia no ultravioleta .....	37
4.2.6.2 Espectroscopia no infravermelho .....	37
4.2.6.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	38
4.2.7 Caracterização dos agentes complexantes .....	38
4.2.7.1 Caseína grau técnico e caseína purificada .....	38
4.2.7.2 Derivados de PVPP .....	38
4.2.8 Avaliação das variáveis analíticas de métodos para determinação do teor de taninos totais utilizando agentes precipitantes protéicos .....	39
4.2.8.1 Preparo dos reagentes .....	39
4.2.8.2 Determinação dos polifenóis totais .....	40
4.2.8.2.1 Estabelecimento da região de comportamento linear .....	40
4.2.8.3 Quantificação da fração não-tanante .....	40
4.2.8.4 Seleção da substância de referência .....	41
4.2.8.5 Curva de calibração do pirogalol (substância de referência) .....	41
4.2.8.6 Curva de calibração para polifenóis totais e fração não-tanante da solução extrativa .....	41
4.2.8.7 Cálculo do teor de taninos .....	42
4.2.8.8 Reprodutibilidade para o método de doseamento do teor de taninos totais .....	42
4.2.8.9 Repetibilidade para o método de doseamento do teor de taninos totais .....	43
4.2.8.10 Comparação entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o reagente de Folin-Denis .....	43
4.2.8.11 Quantificação de taninos mediante uso de pó-de-pele .....	43

4.2.8.12 Avaliação da especificidade da formação de complexos entre derivados protéicos e taninos através de método espectrofotométrico e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	44
4.2.9 Caracterização físico-química dos complexos PVPP-substância de referência .....	45
4.2.9.1 Preparo das soluções de referência .....	45
4.2.9.2 Seleção do comprimento de onda para leitura .....	45
4.2.9.3 Preparo das dispersões de PVPP .....	45
4.2.9.4 Avaliação do perfil de complexação das diferentes PVPP .....	45
4.2.9.5 Avaliação da complexação entre substâncias de referência e PVPP-P6755 mediante calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	46
4.2.9.6 Efeito da purificação ácida da PVPP-P6755 sobre a capacidade complexante .....	46
4.2.9.7 Avaliação da influência do pH na estabilidade dos complexos PVPP-catequina.....	47
4.2.9.8 Avaliação da especificidade da formação de complexos entre PVPP-P6755 e substâncias de referência por método espectrofotométrico e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	48
4.2.10 Complexação de taninos de <i>Psidium guajava</i> com PVPP-P6755 .....	48
4.2.10.1 Seleção da substância de referência.....	48
4.2.10.2 Curva de calibração da catequina (substância de referência).....	48
4.2.10.3 Determinação dos polifenóis totais .....	49
4.2.10.4 Quantificação da fração não-tanante com PVPP-P6755 .....	49
4.2.10.5 Cálculo do teor de taninos .....	49

4.2.10.6 Avaliação da formação de complexos entre taninos da droga vegetal e PVPP-P6755 por CLAE.....	49
4.2.11 Análise comparativa dos teores de taninos totais, calculados mediante utilização de caseína, pó-de-pele e PVPP-6755.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1 Caracterização da matéria-prima vegetal.....	53
5.2 Preparo e caracterização da solução extrativa para análise do teor de taninos.....	53
5.2.1 Análise cromatográfica qualitativa de taninos condensados e hidrolisáveis....	54
5.3 Preparação e caracterização do produto seco liofilizado .....	55
5.4 Caracterização das substâncias de referência .....	56
5.4.1 Espectroscopia no ultravioleta.....	56
5.4.1 Espectroscopia no ultravioleta.....	56
5.4.2 Espectroscopia no infravermelho.....	57
5.4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	57
5.5 Caracterização dos agentes complexantes .....	58
5.6 Avaliação das variáveis analíticas de métodos para determinação do teor de taninos totais utilizando agentes complexantes protéicos .....	59
5.6.1 Comprimento de onda de leitura e tempo de leitura.....	59
5.6.2 Quantidade e tipo de reagente de oxi-redução.....	60
5.6.3 Seleção do tipo e da quantidade de caseína a ser utilizada.....	64
5.6.4 Estudos da especificidade da caseína e do pó-de-pele ao reagir com taninos .....	68

5.7	Caracterização físico-química dos complexos PVPP-substância de referência.....	76
5.7.1	Avaliação do perfil de complexação das diferentes PVPP .....	76
5.7.2	Avaliação da complexação entre substâncias de referência e PVPP-P6755 através de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	79
5.7.3	Efeito da purificação ácida da PVPP-P6755 sobre a capacidade complexante .....	86
5.7.4	Efeito do pH sobre a capacidade complexante .....	86
5.7.5	Avaliação da especificidade da formação de complexos entre diferentes PVPP e substâncias de referência .....	88
5.8	Complexação de taninos de <i>Psidium guajava</i> com PVPP-P6755 .....	92
5.8.1	Curva de calibração.....	92
5.8.2	Complexação de taninos de <i>Psidium guajava</i> com PVPP-P6755 .....	94
5.9	Análise comparativa dos teores de taninos totais, calculados mediante utilização de caseína, pó-de-pele e PVPP-P6755 .....	97
5.9.1	Efeito da substância de referência no cálculo do teor de taninos totais .....	97
5.9.2	Efeito do agente complexante .....	98
6.	CONCLUSÕES: .....	101
7.	REFERÊNCIAS .....	105
8.	ANEXOS.....	117



## Lista de Tabelas

Tabela 1.	Resumo dos métodos por CLAE de determinação de taninos e monômeros de taninos hidrolisáveis e condensados.....	28
Tabela 2.	Soluções e condições utilizadas para avaliação da influência do pH sobre a formação de complexos entre derivado da povidona cruzada e catequina .....	47
Tabela 3.	Valores de pH obtidos para os derivados da PVPP.....	59
Tabela 4.	Resultados da análise de regressão linear das curvas analíticas do pirogalol, com 2,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu.....	61
Tabela 5.	Resultado da análise de regressão linear da curva analítica obtida para o pirogalol, a partir da comparação das curvas .....	62
Tabela 6.	Resultados da análise de regressão linear da curva analítica do pirogalol, com 1,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu.....	62
Tabela 7.	Resultados obtidos com a utilização do reagente de Folin-Denis após 2 e 30 minutos da adição de solução de carbonato de sódio, para polifenóis totais e fração não-tanante .....	64
Tabela 8.	Resultados obtidos para os parâmetros de validação do método de determinação do teor de taninos totais de <i>Psidium guajava</i> .....	66
Tabela 9.	Resultados da análise de regressão linear das curvas analíticas obtidas para polifenóis totais e fração não-tanante com o reagente de Folin-Ciocalteu .....	67
Tabela 10.	Percentual de ácido gálico, catequina e flavonóides de <i>Psidium guajava</i> complexados com diferentes quantidades de caseína e pó-de-pele.....	75
Tabela 11.	Comparação entre os parâmetros térmicos observados para o ácido gálico e a PVPP-P6755 e da mistura na proporção ponderal 1:1, 1:5, 1:10.....	81

Tabela 12. Comparação entre os parâmetros térmicos observados para o pirogalol e PVPP-P6755 e suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5, 1:10 .....	82
Tabela 13. Comparação entre os parâmetros térmicos observados para a catequina e PVPP-P6755 e suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5, 1:10 .....	85
Tabela 14. Percentuais de ácido gálico + pirogalol, catequina e rutina complexados à diferentes quantidades de PVPP-P6755.....	92
Tabela 15. Resultados da análise de regressão linear das curvas analíticas da catequina .....	93
Tabela 16. Resultados da análise de regressão linear da curva analítica obtida para catequina, a partir da comparação das curvas .....	94
Tabela 17. Percentual de ácido gálico, catequina e flavonóides de <i>Psidium guajava</i> complexados com diferentes quantidades de PVPP-P6755. ...	96
Tabela 18. Teor de taninos obtido com a utilização de diferentes concentrações de caseína, pó-de-pele e PVPP-P6755 .....	98

## Lista de Figuras

Figura 1.	Estrutura dos taninos hidrolisáveis. ....	11
Figura 2.	Monômeros de taninos condensados .....	12
Figura 3.	Estrutura molecular do aminoácido prolina e da PVPP. ....	27
Figura 4.	Representação esquemática do cromatograma obtido mediante análise de taninos nas amostras de <i>Psidium guajava</i> . ....	55
Figura 5.	Espectros de absorção no UV das substâncias de referência, ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol. ....	56
Figura 6.	Espectros de absorção na região do visível para a solução extrativa de <i>Psidium guajava</i> e solução aquosa de pirogalol, após adição de 2,0 e 1,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. ....	63
Figura 7.	Valores de absorvância da fração residual da solução extrativa de <i>Psidium guajava</i> em função da quantidade de caseína purificada. ....	65
Figura 8.	Valores de absorvância da fração residual da solução extrativa de <i>Psidium guajava</i> em função da quantidade de caseína GT.....	65
Figura 9.	Cromatogramas obtidos para ácido gálico, pirogalol, catequina e rutina.....	69
Figura 10.	Espectros no UV do ácido gálico, pirogalol, catequina e rutina, obtidos a partir do cromatograma da figura 9. ....	69
Figura 11.	Cromatograma obtido para a solução extrativa de <i>Psidium guajava</i> L. Detecção em 280 nm.....	70
Figura 12.	Espectros no UV obtidos do cromatograma da figura 11.....	70
Figura 13.	Cromatograma obtido para a solução extrativa de <i>Psidium guajava</i> . Detecção em 352 nm.....	71
Figura 14.	Espectros no UV obtidos para os picos 1,2,3,4,5 e 6 da figura 13. ....	71

Figura 15. Cromatogramas da solução extrativa, obtidos após tratamento com 400,0 mg de caseína. ....	72
Figura 16. Cromatogramas da solução extrativa, obtidos após tratamento com 1600 mg de caseína.. ....	73
Figura 17. Cromatogramas da solução extrativa, obtidos após tratamento com 100,0 mg de pó-de-pele.....	74
Figura 18. Complexação de ácido gálico, ácido tânico, catequina, pirogalol e solução extrativa com as diferentes PVP.....	77
Figura 19. Termogramas obtidos por DSC para o ácido gálico e PVPP-P6755, assim como para suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5 e 1:10.....	80
Figura 20. Termogramas obtidos por DSC para o pirogalol e PVPP-P6755, assim como para suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5 e 1:10.....	82
Figura 21. Termogramas obtidos por DSC para a catequina e PVPP-P6755 assim como para suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5 e 1:10.....	84
Figura 22. Influência da purificação ácida da PVPP-P6755 sobre a fração de catequina ligada.....	86
Figura 23. Influência do pH sobre a fração de catequina ligada à PVPP-P6755 ....	87
Figura 24. Complexação de rutina com as diferentes PVPP. ....	89
Figura 25. Complexação de solução contendo catequina e rutina com PVPP-P6755. ....	89
Figura 26. Estrutura molecular da catequina e da rutina. ....	90
Figura 27. Complexação de solução contendo pirogalol e rutina com PVPP-P6755. ....	91

Figura 28. Perfil de complexação para a solução extrativa de <i>Psidium guajava</i> em função da concentração PVPP-P6755, expresso como taninos totais, com determinação em 760 nm.....	95
Figura 29. Cromatogramas da solução extrativa, obtidos sem tratamento e após tratamento com 150,0 mg de PVPP-P6755.....	96



## Lista de Anexos

Tabela 1A. Preparação da Amostra .....	118
Tabela 1B. Polifenóis Totais .....	119
Tabela 1C. Fração não-tanante – polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele .....	120
Tabela 1D. Solução de Referência.....	121
Tabela 1E. Cálculos .....	122
Tabela 1F. Soluções Reagentes .....	123
Figura 1A. Espectro na região do infravermelho do ácido gálico. ....	125
Figura 1B. Espectro na região do infravermelho do ácido tânico .....	125
Figura 1C. Espectro na região do infravermelho da catequina.....	126
Figura 1D. Espectro na região do infravermelho do pirogalol.....	126
Figura 1E. Espectro na região do infravermelho das PVPP .....	127
Tabela 2A. Valores médios da absorvância e CV % obtidos para a fração não-tanante com caseína purificada durante três dias de análise, em triplicata. ....	127
Tabela 3A. Valores médios da absorvância e CV % obtidos para a fração não-tanante com caseína grau técnico durante três dias de análise, em triplicata. ....	128
Tabela 4A. Absorvâncias obtidas para a solução extrativa e fração não-tanante de <i>Psidium guajava</i> antes e após a adição de rutina.....	128
Tabela 5A. Áreas dos picos de ácido gálico, catequina e flavonóides complexados com diferentes quantidades de caseína e pó-de-pele ....	129
Tabela 6A. Absorvâncias obtidas na complexação de diferentes PVPP com ácido gálico, ácido tânico, catequina, pirogalol e solução extrativa. ....	130

Tabela 7A. Valores de absorvância obtidos para a utilização de PVPP-P6755 purificada e não purificada quando complexada com catequina.. .....	131
Tabela 8A. Valores de absorvância obtidos para a complexação de catequina com suspensão de PVPP-P6755 em diferentes valores de pH.. .....	131
Tabela 9A. Valores de absorvância obtidos pela adição de dispersões de PVPP-P6755 à rutina em diferentes concentrações.....	131
Tabela 10A. Valores de absorvância obtidos para uma solução de catequina e rutina quando complexada com dispersões de diferentes concentrações de PVPP-P6755.....	132
Tabela 11A. Valores de absorvância obtidos para uma solução de pirogalol e rutina quando complexada com dispersões de diferentes concentrações de PVPP-P6755.....	132
Tabela 12A. Áreas dos picos de ácido gálico + pirogalol, catequina e rutina complexados com diferentes quantidades de PVPP-P6755.. .....	132
Tabela 13A. Valores de absorvância obtidos para a solução extrativa de <i>Psidium guajava</i> sem o tratamento com PVPP-P6755 e após o tratamento com diferentes quantidades de PVPP-P6755.....	133
Tabela 14A. Áreas dos picos de ácido gálico, catequina e flavonóides de <i>Psidium guajava</i> complexados com diferentes quantidades de PVPP-P6755. ....	134



## Lista de Abreviaturas

AG: ácido gálico

AT: ácido tânico

CAT: catequina

FCL: fração de catequina ligada

FNT: fração não-tanante

GT: grau técnico

Piro: pirogalol

PT: polifenóis totais

PVPP: polivinilpirrolidona

PVPP-P6755: polivinilpirrolidona Sigma

Rut: rutina

SE: solução extrativa

SP: solução dos padrões

T<sub>máx.</sub>: temperatura máxima

T<sub>onset</sub>: temperatura de *onset*

TT: taninos totais



## Resumo

O presente trabalho objetivou estudar as principais variáveis analíticas associadas aos métodos espectrofotométricos de quantificação do teor de taninos utilizando caseína e pó-de-pele, os reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, bem como a avaliação de diferentes tipos de PVPP (Divergan® F, Divergan® RS, Kollidon® CL e PVPP-P6755) na substituição dos substratos protéicos. Para tanto, dois métodos de análise, um espectrofotométrico e outro por CLAE foram desenvolvidos, utilizando os polifenóis catequina, ácido tânico, ácido gálico e pirogalol como substâncias de referência e rutina como flavonóide modelo. Para maiores inferências uma solução extrativa de folhas secas de *Psidium guajava* L também foi quantificada. A análise comparativa assinalou o uso vantajoso do reagente de Folin-Ciocalteu, em relação ao reagente de Folin-Denis. Em termos de reprodutibilidade, a caseína grau técnico (GT) mostrou-se superior à caseína purificada, embora essa última possua maior afinidade pelos polifenóis testados. Contudo, as análises por UV-VIS e por CLAE em comprimentos de onda de 280nm e 352 nm, demonstraram que tanto a caseína GT quanto o pó-de-pele não são seletivos para complexar taninos, de acordo com as normas do ICH. Tanto o pó-de-pele quanto a caseína GT foram capazes de complexar polifenóis e rutina de maneira inespecífica. Isso foi evidenciado quando misturas de um único polifenol e rutina ou a fração flavonoídica de *P. guajava* foram testadas. A capacidade de complexação de polifenóis e rutina por parte da PVPP foi avaliada por UV-VIS, DSC e CLAE. Os melhores resultados foram observados para PVPP-P6755, no entanto com restrições. De maneira similar a caseína GT e pó-de-pele a PVPP-P6755 foram capazes de complexar de maneira inespecífica rutina e outros flavonóides do extrato de *P. guajava*. Uma validação plena para o caso específico de folhas de *P. guajava* é questionável. No entanto, o método baseado na utilização de PVPP mostrou-se passível de padronização utilizando 500,0 mg de pó de droga, 2,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, tempo de leitura 30 min após adição desse reagente e quantificação em 760 nm. Sob essas condições, a análise comparativa demonstrou que 50,0 mg de PVPP foram, em termos analíticos, equivalentes a 100,0 mg de pó-de-pele ou a 750 mg de caseína GT.

Palavras-chave: taninos, métodos analíticos, complexação, caseína, pó-de-pele, PVPP, CLAE.



## Abstract

### **Evaluation of analytical variables of methods for total tannins determination based on complexation with proteins and polyvinylpyrrolidone**

This work aims the study of the main analytical variables related to spectrophotometric assay of the tannin content using casein and hide powder, Folin-Denis and Folin-Ciocalteu reagents, as well as the evaluation of different PVPP types (Divergan® F, Divergan® RS, Kollidon® CL and PVPP-P6755®) as substitutes of these protein substrates. For comparison purposes, a HPLC method and a spectrophotometric method were developed using the polyphenols catechin, tanic acid, galic acid and pyrogalllic acid as reference substances and rutin as a flavonoid model. In order to obtain more extensive inferences, a *Psidium guajava* L leaves aqueous extract was also assayed. The analytical comparisons showed that the Folin-Ciocalteu reagent was better than Folin-Denis ones. The use of technical grade casein (TG) led to more reproducible results in comparison to the purified casein, although the last one had more affinity for the tested polyphenols. The UV-VIS and HPLC analysis carried out at 280nm and 352nm did not fulfill the specificity criterium, according to the ICH validation guidelines. Both hide powder and casein-TG were able to bind polyphenols and rutin in an unspecific way, either when single polyphenol and rutin mixtures or the *P. guajava* flavonoid fraction were assayed. The PVPP binding capability for polyphenols and rutin was compared by means of UV-VIS, DSC and HPLC. The better result was assigned to the PVPP-P6755, but with some restrictions. Similarly to casein-TG and hide powder, PVPP-P6755 was also able to bind in an unspecific way rutin and other flavonoids from a *P. guajava* aqueous extract. Strictly speaking, the full validation of a method for the tannin content assay becomes questionable. However, the method standardization based on the use of PVPP-P6755 appears to be possible by using of 500,0 mg of drug powder, 2.0 mL of Folin-Ciocalteu reagent, an scan time of 30 min after addition of this reagent and detection at 760 nm. Under these experimental conditions, a comparative analysis showed that 50.0 mg PVPP-P6755 was analytically equivalent to 100.0 mg of hide powder or 750.0 mg of casein-TG.

Keywords: tannin, analytical methods, complexation, casein, hide powder, PVPP, HPLC.



## 1. INTRODUÇÃO

---

---





Como metabólitos secundários, os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. A sensação adstringente provocada por vinhos, sucos de frutas, chás e outras bebidas está relacionada, em grande parte, aos taninos. Ao precipitar as proteínas ricas em prolina presentes na saliva, ocorre a perda do poder lubrificante (BRUNETON, 2001; CHARLTON *et al.*, 2002; SANTOS; MELLO, 2003; SIMON *et al.*, 2003). A maior parte das propriedades biológicas dos taninos, dentre elas, cicatrizante de feridas e queimaduras, em casos de úlcera gástrica e a ação bactericida e fungicida, se deve ao poder que possuem de formar complexos com íons metálicos e macromoléculas, especialmente protéicas (MARTINS, 1998; BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005). Neste contexto, os taninos têm sido amplamente empregados como substâncias marcadoras para a avaliação da qualidade de diversas matérias-primas vegetais (SOARES, 2002; SANTOS; MELLO, 2003).

O fundamento original dos métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, preconizados para a determinação do teor de taninos é basicamente o mesmo. No entanto, a análise comparativa de diversos métodos oficiais (Ph. Eur., 2002; BP, 2001; DAB, 1998; F. Bras. 1988), realizada em fase prévia ao presente trabalho, revela que existem diferenças em termos de técnica, em parâmetros tais como, composição de reagentes, tempo ótimo de leitura e comprimento de onda (ANEXO-tabela 1A até 1F). A suscetibilidade do complexo tanino-proteína a fatores tais como: temperatura, pH, proporção tanino:agente complexante, massa molecular, solubilidade do complexo e a própria variabilidade do teor de taninos na amostra estão amplamente documentados na literatura.

Estas constatações respaldam a necessidade de uma abordagem analítica diferenciada, baseada na revisão sistemática das diferentes variáveis de interesse, e tendo como finalidade última a padronização e validação do método de quantificação de taninos. Uma segunda abordagem plausível é a de explorar as possibilidades analíticas de um método diferente, baseado na formação de complexos insolúveis, não-protéicos, com derivados insolúveis da PVPP. Sobre este tema há relativamente poucos trabalhos relatados.

SOARES (2002), ao avaliar a capacidade de complexação de derivados insolúveis da povidona (Kollidon® CL e Kollidon® CL-M), observou que esses são capazes de remover os taninos de forma eficaz, porém, sem chegar a conclusões

definitivas. No presente trabalho, realizou-se uma avaliação mais aprofundada das potencialidades analíticas relativas ao uso de novos derivados da PVPP como agentes complexantes de taninos. Fez-se ainda uma análise comparativa com o objetivo de avaliar a especificidade do pó-de-pele, caseína e PVPP frente a substâncias de referência comumente utilizadas para expressar o teor de taninos e frente a flavonóides. Além das substâncias de referência, a análise comparativa inclui uma solução extrativa de folhas de *Psidium guajava*, espécie rica em elagitaninos e taninos complexos (elagitaninos associados a uma unidade de tanino condensado) (LANS *et al.*, 2000; SANTOS; MELLO, 2003). *Psidium guajava* é amplamente distribuída e empregada na medicina popular (WHO, 1998; LOZOYA *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2005) sendo utilizada nesse trabalho como modelo de extrato vegetal.

## **2. OBJETIVOS**

---

---



## 2.1 Objetivo Geral

Analisar comparativamente o uso dos agentes complexantes caseína e pó-de-pele na determinação do teor de taninos, com ênfase nos estudos de especificidade frente às substâncias de referência e presença de flavonóides, assim como analisar as possibilidades de introdução da povidona reticulada (PVPP), com a mesma finalidade analítica.

## 2.2 Objetivos específicos

i) Analisar dois métodos espectrofotométricos oficiais de quantificação de taninos comparando os reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, selecionando um deles.

ii) Analisar comparativamente as caseínas purificada e grau técnico como agentes complexantes, estabelecendo parâmetros analíticos de padronização e de validação.

iii) Aplicar o método validado, baseado na utilização de caseína, na determinação do teor de taninos totais de um extrato padronizado de *Psidium guajava*, comparando-o com o método oficial descrito na Ph. Eur. (2002).

iv) Avaliar propriedades físico-químicas da reação de complexação de substâncias de referência com vários polímeros reticulados da povidona (PVPP) e estabelecer condições experimentais que permitam selecionar o derivado da PVPP com o melhor perfil na formação de complexos.

v) Desenvolver um método por cromatografia líquida de alta eficiência que permita separar os taninos dos demais compostos polifenólicos presentes no extrato vegetal de *Psidium guajava*.

vi) Avaliar por CLAE-PDA a especificidade do derivado de PVPP selecionado, bem como a dos agentes precipitantes protéicos, pó-de-pele e caseína.

vii) Propor as linhas gerais de um método de doseamento de taninos para a matéria-prima vegetal de *P. guajava* L., baseado na complexação com o derivado selecionando da PVPP, comparando os resultados com os obtidos a partir do método oficial descrito na Ph. Eur. (2002).

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

---

---





### 3.1 Taninos: estrutura e classificação

Taninos são substâncias polifenólicas complexas, e de acordo com suas estruturas químicas, são divididos em dois grupos nas plantas terrestres: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003). Existem ainda os florotaninos, presentes em algas pardas (SWANSON; DRUEHL, 2002; NAGAYAMA *et al.*, 2003; JORMALAINEN *et al.*, 2005).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de um açúcar (central) e de ácidos fenólicos, principalmente ácido gálico e elágico e seus derivados. Os galotaninos resultam da união entre unidades de ácido gálico e um poliol. Os elagitaninos possuem um ou dois resíduos de hexa-hidroxidifenoila-D-glicose (HHDP) unidos a um açúcar central (Figura 1). Pode ocorrer a oxidação de HHDP a desidrohexaidroxidifenoila (DHHDP) que é característico dos desidroelagitaninos (COSTA, 1994; BRUNETON, 2001; HARVEY, 2001; SANTOS; MELLO, 2003).

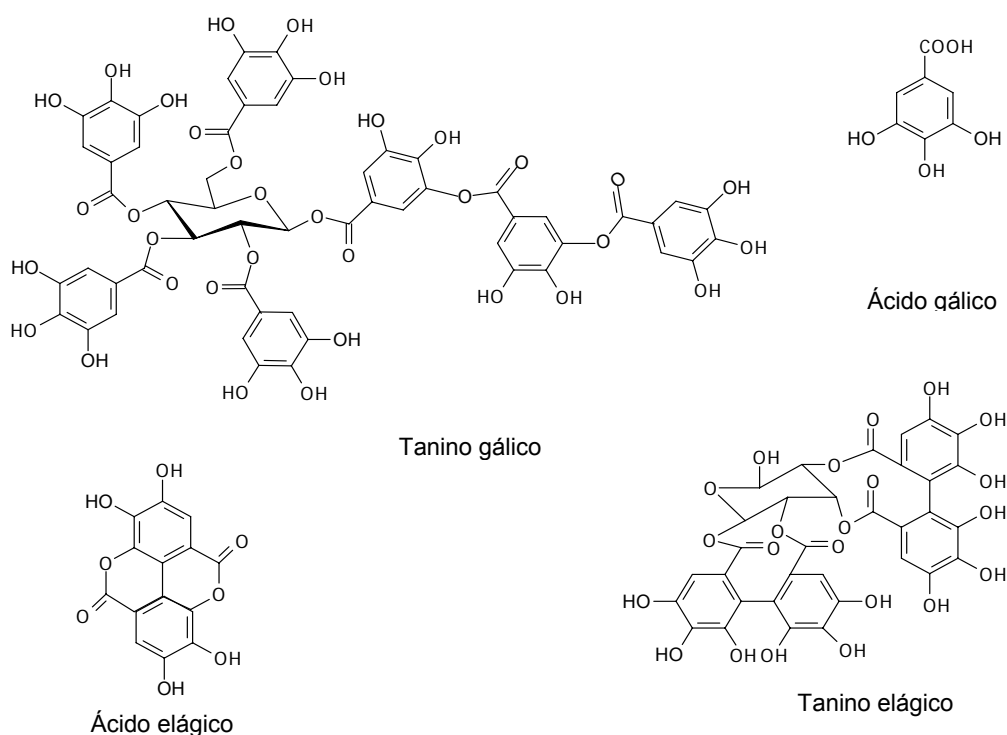


Figura 1. Estrutura dos taninos hidrolisáveis.

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol, tais como catequina ou epicatequina, respectivamente unidas por pares de ligações  $C_4 \rightarrow C_8$  ou  $C_4 \rightarrow C_6$ . (Figura 2). Essas unidades podem ser esterificadas com ácido gálico originando 3-O-galatos. Esses taninos também são denominados proantocianidinas, devido à propriedade de produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, após degradação à quente com ácido mineral diluído (MARTINS, 1998; BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003; SHOJI *et al.*, 2006).

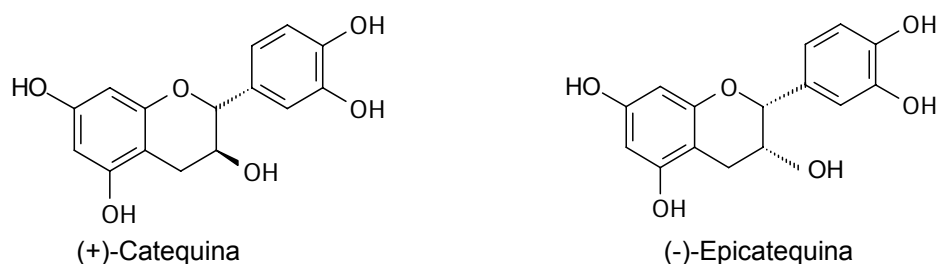


Figura 2. Monômeros de taninos condensados

Taninos hidrolisáveis e condensados se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Os condensados ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, enquanto que os hidrolisáveis estão quase restritos a angiospermas dicotiledôneas (SANTOS; MELLO, 2003). Podem ocorrer na casca, folhas, frutos e galhos. Algumas espécies produzem somente galotaninos ou elagitaninos, enquanto outras apresentam misturas complexas contendo galotaninos, elagitaninos e taninos condensados (HARVEY, 2001).

Os florotaninos são polímeros de floroglucinol e terpenos, presentes em algas pardas que apresentam função de evitar a herbivoria. Outras propriedades têm sido atribuídas aos florotaninos, tais como a proteção das algas frente à radiação UV, já que ocorrem em tecidos por indução da radiação (GRAHAM; WILCOX, 2000; SWANSON; DRUEHL, 2002). Também têm sido sugerido que os florotaninos participam da ligação e da acumulação de metais pesados (GRAHAM; WILCOX, 2000), no entanto essa classe de taninos não é objeto de estudo nesse trabalho.

### 3.2 Atividades farmacológicas

As aplicações de medicamentos com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes (MONTEIRO *et al.*, 2005). As propriedades antidiarréica e hemostática, por exemplo, foram atribuídas à capacidade de complexação com polissacarídeos, proteínas e íons metálicos (BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005). Por precipitar proteínas proporcionam também efeito antimicrobiano e antifúngico. Como precipitam alcalóides os taninos podem servir de antídoto em casos de intoxicações (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Outras atividades atribuídas aos taninos, como ação bactericida e fungicida, antiviral, moluscicida (BRUYNE, *et al.*, 1999; BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003), antitumoral, no tratamento da arteriosclerose e da artrite reumatóide têm sido atribuídas, em parte, à capacidade de complexação ou à captação de radicais livres por parte dos taninos. Dessa forma originam radicais estáveis, inibindo a peroxidação de lipídios e outras substâncias (OKUDA *et al.*, 1989; BRUYNE *et al.*, 1999; GAULEJAC *et al.*, 1999; RIGO *et al.*, 2000; BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003; GUENDEZ *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2005). A eficácia como cicatrizante de feridas, queimaduras e inflamações da pele, assim como a proteção da mucosa em casos de úlcera gástrica, parece estar relacionada à formação de um complexo tanino-proteína ou tanino-polissacarídeo (MARTINS, 1998; BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005).

De forma geral, os taninos são inibidores enzimáticos, devido à capacidade de se ligarem às proteínas. Os taninos inibem a 5-lipoxigenase, a enzima conversora de angiotensina, e as glicosiltransferases de microorganismos implicados na formação das cáries e inflamação da gengiva (BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003). Os taninos elágicos e os taninos condensados inibem a quinase C (WANG *et al.*, 1996; BRUNETON, 2001).

Taninos têm demonstrado ainda atividade contra HIV. Os galotaninos demonstraram atividade inibitória somente em concentrações tóxicas. Elagitaninos e taninos condensados inibiram fracamente a replicação viral e os taninos complexos mostraram potente atividade contra a replicação do HIV. Verificou-se que a atividade

anti-HIV exibida por taninos é devida à inibição da transcriptase reversa, dificultando assim a replicação viral (KILKUSKIE *et al.*, 1992).

Devido à capacidade de formar complexos com proteínas, outras macromoléculas e íons metálicos, os taninos também apresentam efeitos tóxicos. Estudos têm demonstrado efeitos nocivos em animais e humanos (LIAO *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005). Em herbívoros, os taninos promovem efeitos negativos no apetite e na utilização de nutrientes, devido à sua capacidade de precipitar proteínas, inibir enzimas digestivas e afetar a utilização de vitaminas e de sais minerais (SILANIKOVE *et al.*, 2001; LIAO *et al.*, 2003; MAKKAR, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005). Existem estudos indicando a maior toxicidade dos taninos hidrolisáveis, em relação aos taninos condensados. Isso porque os taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, podem ser facilmente degradados nos sistemas biológicos e os produtos da hidrólise podem chegar a órgãos como fígado e rins. Os taninos condensados não são hidrolisados nos sistemas biológicos e, portanto, não chegam à corrente sanguínea (LIAO *et al.*, 2003).

### **3.3 Métodos de doseamento de taninos**

Vários são os métodos de determinação do teor de taninos que têm sido empregados, tanto quantitativa quanto qualitativamente. Dentre os colorimétricos destacam-se os métodos de determinação de fenóis totais, que utilizam os reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, bem como o doseamento butanol/ácido empregado para taninos condensados e o método da vanilina, que é específico para *meta*-difenois (SCALBERT, 1992; SCHOFIELD *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005). Para a quantificação colorimétrica de taninos hidrolisáveis se destacam os métodos que empregam o iodato de potássio e rodanina (SCALBERT, 1992; HARVEY, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005).

Dentre os métodos gravimétricos de quantificação do teor de fenóis em extratos vegetais, destaca-se a utilização de Itérbio, para a precipitação de taninos condensados (MONTEIRO *et al.*, 2005), e de PVPP para a quantificação de ácido tânico (SCHOFIELD *et al.*, 2001).

Os métodos por CLAE podem ser empregados para taninos hidrolisáveis e para taninos condensados. Para taninos hidrolisáveis há relatos de uso na

determinação da massa molecular, bem como para a determinação de ácido gálico e ácido elágico após a hidrólise das estruturas poliméricas (HARVEY, 2001). No caso de taninos condensados podem ser utilizados na determinação de polímeros com até 7 ou 8 unidades (SCHOFIELD *et al.*, 2001).

Para a determinação da massa molecular tem sido utilizada a espectrometria de massas e para o estudo dos complexos solúveis entre proteínas e taninos tem-se empregado a ressonância magnética nuclear (CHIEN; HAGERMAN, 2004).

Existem ainda os métodos nefelométricos que medem a dispersão da luz resultante da formação gradual de precipitados dos agregados tanino-proteína. Esses métodos geralmente são utilizados pelas indústrias vinícolas, cervejarias e de sucos de frutas (CARVALHO *et al.*, 2004).

### 3.3.1 Métodos de oxi-redução com formação de complexo

Os métodos de doseamento de polifenóis baseados em reações de oxi-redução iniciaram-se com a utilização do reagente fosfotúngstico por FOLIN e MACALLUM (1912), como forma de quantificar o ácido úrico na urina. O reagente foi modificado posteriormente e denominado reagente de Folin-Denis (FOLIN; DENIS, 1912)

Uma outra variante do método de quantificação de fenóis implica no uso do reagente de Folin-Ciocalteu, inicialmente denominado de *reagente fenol modificado*, que difere do reagente de Folin-Denis pela presença de sulfato de lítio, adicionado para evitar a formação de precipitados (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SCALBERT, 1992).

Em todas as suas variantes, os métodos por oxi-redução mencionados envolvem o doseamento de polifenóis totais (quantificados por espectrofotometria), mediante a formação de um complexo de coloração azul, derivado da redução do reagente pelas hidroxilas fenólicas. A coloração azul ocorre em meio alcalino, porém é pouco estável em excesso de base fraca, fato que se acentua quando uma base forte é utilizada, observando-se uma perda rápida da coloração (FOLIN; DENIS, 1912; SCALBERT, 1992).

Cabe destacar que os métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu encontram aplicação na determinação, tanto de substâncias polifenólicas em geral quanto de taninos. O cálculo do teor de taninos é realizado indiretamente, subtraindo do teor de polifenóis totais o teor da fração não-tanante, isto é, o teor de polifenóis não reativos ao tratamento prévio com material protéico ou polimérico (SCALBERT, 1992; COSTA, 1994; BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003).

Algumas limitações têm sido atribuídas aos métodos de quantificação que se utilizam dos reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu. Entre elas, encontra-se o fato de os reagentes serem inapropriados para a comparação do conteúdo fenólico de amostras de diferentes extratos vegetais. Embora o reagente seja reduzido pelas hidroxilas aromáticas, características de todos os fenóis, a redução depende da estrutura fenólica, além do fato de o reagente poder ser reduzido por outros constituintes do extrato, como alcalóides e proteínas, por exemplo. Dessa forma, a composição e a quantidade de fenóis pode ser diferente, mesmo quando a absorvância é semelhante. Por essa razão, os reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu não fornecem uma idéia exata da quantidade de fenóis, mas sim da capacidade de redução da amostra analisada (APPEL *et al.*, 2001).

As limitações do método também se estendem à escolha de uma substância de referência para expressar o teor de fenóis. Se a capacidade de redução da substância selecionada como padrão não é precisamente a mesma do extrato analisado, a concentração calculada a partir da curva padrão não refletirá, obviamente, o teor de fenóis da amostra (APPEL *et al.*, 2001).

### 3.3.2 Métodos baseados na precipitação de proteínas

Os estudos sobre a complexação de polifenóis com proteínas datam de 200 anos atrás, sendo um dos primeiros relatos atribuído a Davy, em 1803 (HASLAM *et al.*, 1989). Os complexos formados entre taninos e proteínas podem ser reversíveis ou irreversíveis. Os reversíveis são estabelecidos via ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que os irreversíveis implicam em reações de oxidação, via formação de ligações covalentes (LUCK *et al.*, 1994; KAWAMOTO *et al.*, 1997a; SANTOS; MELLO, 2003).

Os processos de complexação e precipitação de taninos e proteínas são tidos como específicos e estão relacionados com a estrutura de ambos. Algumas características importantes das proteínas para sua complexação e precipitação com taninos são:

- *Estrutura molecular*: proteínas com estruturas mais abertas e flexíveis têm maior afinidade pelos taninos, como as proteínas salivares, ricas em prolina. Por outro lado, proteínas globulares, mais compactas, como a albumina sérica bovina, possuem menor afinidade aos compostos fenólicos (HAGERMAN; BUTLER, 1981; HASLAM *et al.*, 1989; LUCK *et al.*, 1994; FREITAS; MATEUS, 2001; CARVALHO *et al.*, 2004);
- *Ponto isoelétrico*: a afinidade das proteínas por taninos é maior no ponto isoelétrico da proteína (HAGERMAN; BUTLER, 1981; HASLAM *et al.*, 1989; KAWAMOTO; NAKATSUBO, 1997a);
- *Conteúdo de prolina*: proteínas ricas em prolina têm uma grande afinidade por polifenóis (HAGERMAN; BUTLER, 1981; HASLAM *et al.*, 1989; LUCK *et al.*, 1994, SIEBERT *et al.*, 1996a; HAGERMAN *et al.*, 1998). A ligação tanino-proteína é favorecida quando o nitrogênio da amida é substituído por um grupamento alquila. Os peptídeos que contêm prolina apresentam o nitrogênio adjacente à carbonila substituído, explicando essa maior afinidade (HAGERMAN; BUTLER, 1981).
- *Glicosilação da proteína*: proteínas não-glicosiladas apresentam menor afinidade por taninos do que as proteínas glicosiladas (FICKEL *et al.*, 1999).

Em contrapartida, a estrutura e propriedades dos taninos também são determinantes na formação de complexos entre taninos e proteínas e na precipitação desses. Nesse sentido, quatro características devem ser consideradas:

- *Tamanho da molécula*: é importante no estágio de complexação inicial. Moléculas maiores, porém não tão grandes que não possam se

intercalar entre os espaços interfibrilares das proteínas, são mais eficazes na formação de complexos (FREITAS; MATEUS, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005). Para taninos hidrolisáveis as estruturas que apresentam maior capacidade de precipitação obedecem a seqüência: penta-galoil-D-glicose > tetra-galoil-D-glicose > tri-galoil-D-glicose) (HAGERMAN; BUTLER, 1981; SPENCER *et al.*, 1988; HASLAM *et al.*, 1989; LUCK *et al.*, 1994; KAWAMOTO; NAKATSUBO, 1997b). A disposição dos grupos galoila também influencia na capacidade de precipitação. Polifenóis com grupamentos galoila distantes entre si são mais eficientes como agentes precipitantes. Essa característica está relacionada com o impedimento estérico exercido por grupamentos galoila próximos (KAWAMOTO *et al.*, 1996). Para taninos condensados também é importante a associação com moléculas de ácido gálico. Monômeros como a (-)-epicatequina, quando esterificados com ácido gálico, aumentam sua capacidade de formar complexos insolúveis com proteínas ricas em prolina. No entanto, para dímeros a associação a um grupamento galoila não é importante, já que ocorre diminuição da liberdade conformacional (FREITAS; MATEUS, 2001).

- *Flexibilidade conformacional:* quando existe um impedimento conformacional no polifenol, a capacidade de complexação é drasticamente reduzida (SPENCER *et al.*, 1988; HASLAM *et al.*, 1989; SIEBERT *et al.*, 1996a)
- *Solubilidade em água do polifenol:* existe uma relação inversa entre o grau de complexação e a solubilidade do polifenol em água. Normalmente, baixas solubilidades favorecem uma complexação mais forte (SPENCER *et al.*; 1988 HASLAM *et al.*, 1989; LUCK *et al.*, 1994). No entanto, HAGERMAN e colaboradores (1998), ao investigarem os mecanismos de precipitação dos taninos pentagaloilglicose (PGG) e epicatequina-(4→8)-catequina observaram o oposto: a epicatequina-(4→8)-catequina, que é muito solúvel, foi mais eficiente na precipitação da ASB do que PGG, que é virtualmente solúvel. Para a precipitação



dos taninos condensados são importantes as hidroxilas existentes nos anéis A e B (KAWAMOTO *et al.*, 1996).

- *Posição dos grupos periféricos:* (+)-catequina apresenta maior afinidade por proteínas ricas em prolina quando comparada a (-)-epicatequina. Este fato foi associado à estereoquímica do anel pirano (FREITAS; MATEUS, 2001).

A combinação dessas peculiaridades, referentes tanto às proteínas quanto aos taninos, explica a falta de especificidade no comportamento de taninos diferentes, ou de diferentes extratos vegetais, frente a um mesmo substrato protéico.

Atualmente três mecanismos têm sido propostos para elucidar a precipitação de proteínas por parte dos taninos. No primeiro, a precipitação de proteínas por polifenóis seria principalmente um fenômeno de superfície. A eficácia da ligação decorreria do fato de os polifenóis serem ligantes multidentados, capazes de se ligar mediante diferentes grupos fenólicos e de modo simultâneo a mais de um ponto na superfície da proteína (SPENCER *et al.*, 1988; HASLAM *et al.*, 1989; LUCK *et al.*, 1994).

Recentemente, alguns autores modificaram esse mecanismo por acreditar que, na realidade, a precipitação de proteínas por parte dos taninos ocorre em três estágios. Inicialmente várias moléculas de polifenol se ligam a um mesmo peptídeo. Esse processo continua até que ocorra a associação entre duas moléculas de peptídeo, formando um dímero, que começa a precipitar. Inicia-se então o terceiro estágio, onde a espontânea agregação desses leva à formação de grandes complexos precipitados (CHARLTON *et al.*, 2002; JÖBSTL *et al.*, 2004).

Uma terceira alternativa proposta para elucidar a precipitação tanino-proteína, ocorreria também em dois estágios: uma complexação inicial entre taninos e proteínas, e a subsequente precipitação dos complexos (KAWAMOTO *et al.*, 1996). Essa proposta difere do primeiro e segundo mecanismos por não considerar a associação entre diferentes moléculas de proteínas.

A natureza da ligação entre taninos e proteínas também tem sido objeto de discussões. SIEBERT e colaboradores (1996a) afirmam que os complexos formados

entre taninos e proteínas mantêm-se unidos através da combinação de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Alguns autores descreveram a complexação como um exemplo específico de reconhecimento molecular, onde a associação seria dirigida por efeitos hidrofóbicos (SPENCER *et al.*, 1988; HASLAM *et al.*, 1989; SIEBERT *et al.*, 1996a). No entanto, HAGERMAN e BUTLER (1981), ao descrever as interações entre proantocianidinas e proteínas em meio aquoso, observaram que essas eram governadas por ligações de hidrogênio.

Mais recentemente HAGERMAN e colaboradores (1998), propuseram que a polaridade do polifenol pode ser utilizada para prever se a precipitação vai ocorrer via ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Os resultados indicaram que, para heptagalactilglicose, que é mais polar do que a pentagalactilglicose, o fator determinante na complexação com albumina sérica bovina reside nas ligações de hidrogênio. Para polifenóis não-polares, como o galato de epicatequina, as interações hidrofóbicas seriam dominantes na reação.

SIMON e colaboradores (2003), em um estudo da estrutura tridimensional dos complexos formados entre os taninos do vinho e proteínas salivares, observaram que as moléculas dos taninos se associam somente a um lado da superfície do peptídeo. Esse lado foi identificado como a porção hidrofílica, o local onde ocorrem numerosas ligações de hidrogênio entre os grupamentos carbonila de alguns resíduos de prolina e os grupamentos OH dos anéis das proantocianidinas. Os autores atribuem a discordância de seus resultados com os anteriormente relatados ao fato de que, tanto SPENCER e colaboradores (1988) quanto HASLAM e colaboradores (1989), teriam conduzido seus experimentos na presença de DMSO, visando elevar a solubilidade das preparações. Segundo SIMON e colaboradores (2003), esse fato pode modificar as propriedades hidrofóbicas/hidrofílicas de taninos e proteínas no meio.

FREITAS e colaboradores (2003) estudando a influência da força iônica nas interações entre taninos e proteínas observaram que com o aumento da força iônica ocorria uma diminuição da precipitação. Esses resultados contradizem os relatados por LUCK e colaboradores (1994) e os observados por KAWAMOTO e NAKATSUBO (1997a) na análise da precipitação de proteínas por galotaninos. FREITAS e colaboradores (2003) atribuem as discordâncias de resultados às

diferentes condições e ao tipo de tanino em análise. LUCK e colaboradores (1994) e KAWAMOTO e NAKATSUBO (1997a) utilizaram taninos hidrolisáveis, para os quais as interações hidrofóbicas parecem dirigir o processo de precipitação. No entanto, FREITAS e colaboradores (2003) fizeram uso de proantocianidinas em suas análises e afirmam, que seus resultados são indícios de que para os taninos condensados as interações hidrofílicas são dominantes em relação às interações hidrofóbicas para a precipitação de proteínas. Dessa forma, a importância das interações de hidrogênio bem como das interações hidrofóbicas não está claramente definida.

Além das propriedades estruturais, a precipitação de proteínas por compostos polifenólicos depende também de fatores externos. HAGERMAN e BUTLER (1978) compararam a precipitação dos taninos presentes no sorgo com cinco diferentes proteínas, pepsina, ovoalbumina, albumina sérica bovina, tripsina e lisozima, em meios com pH diferentes. Os autores observaram que a máxima precipitação ocorreu em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico (P.I.) de cada proteína, especificamente, pH 3,0 para pepsina (P.I. 1,0); 3,5 para a albumina sérica bovina (P.I. 4,9) e ovoalbumina (P.I. 4,6), e valores de pH superiores a 8,0 para as proteínas tripsina (P.I. 10,1) e lisozima (P.I. 11,0).

KAWAMOTO e NAKATSUBO (1997a), estudando os fatores que afetam a precipitação tanino-proteína, observaram que a concentração de proteína interfere principalmente no estágio inicial da complexação (referente ao terceiro mecanismo relatado neste trabalho), enquanto, pH, temperatura e aumento da força iônica determinam a precipitação do complexo (segundo estágio).

Outros autores também têm levantado a importância de fatores como pH, força iônica do meio, temperatura, presença de sais e as concentrações iniciais de proteínas e taninos no processo de complexação (LUCK *et al.*, 1994; KAWAMOTO; NAKATSUBO, 1997a; FREITAS; MATEUS, 2001; SOARES, 2002; SANTOS; MELLO, 2003; CARVALHO *et al.*, 2004).

De modo global, a importância de tais fatores resulta em limitações, do ponto de vista analítico, para a quantificação de taninos. Tais limitações foram levantadas recentemente por SOARES (2002).

A presença de substratos como os polissacarídeos também influenciam no processo de precipitação de proteínas por taninos (HASLAM *et al.*, 1989; LUCK *et al.*, 1994; SIEBERT *et al.*, 1996b; RIOU *et al.*, 2002; FREITAS *et al.*, 2003; MATEUS *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado a capacidade de alguns polissacarídeos, como pectina, carragenina e gomas arábica e xantana, de inibir a precipitação de proteínas, enquanto que as gomas guar, tara e caroba não a inibem (LUCK *et al.*, 1994). Esse fenômeno pode ser explicado de diversas formas. O polissacarídeo pode formar um complexo ternário proteína/tanino/carboidrato, aumentando a solubilidade em meio aquoso; o polissacarídeo pode competir com as proteínas pela associação com o tanino; ou os polissacarídeos podem desenvolver uma estrutura secundária em solução, capaz de encapsular e se complexar com taninos (LUCK *et al.*, 1994; SIEBERT *et al.*, 1996b; FREITAS *et al.*, 2003; RIOU *et al.*, 2002).

A complexação entre taninos e carboidratos pode ser explicada devido às ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio do carboidrato e as hidroxilas fenólicas dos taninos, bem como por interações hidrofóbicas (FREITAS *et al.*, 2003).

FREITAS e colaboradores (2003), ao estudar a influência dos carboidratos na precipitação de proteínas por taninos, verificaram que carboidratos neutros como glicose e  $\beta$ -ciclodextrina possuem menor afinidade por taninos do que os aniônicos como pectina, goma xantana, ácido poligalacturônico e goma arábica. A baixa afinidade de carboidratos neutros por taninos foi também observada por LUCK e colaboradores (1994).

### 3.3.2.1 *Complexação de polifenóis com pó-de-pele e caseína*

Considerando os níveis estruturais, as proteínas podem ser classificadas em dois grandes grupos: as proteínas fibrosas, que se encontram dispostas em forma de fibra, com superfícies largas e planas, e as proteínas globulares que se apresentam na forma esférica. Os dois grupos são estruturalmente distintos, pois as proteínas fibrosas apresentam um único tipo de estrutura secundária, já às globulares possuem vários tipos de estruturas secundárias (NELSON; COX, 2000).

O colágeno é uma proteína fibrosa e o principal constituinte da pele e dos ossos (BERG *et al.*, 2004). Apresenta-se na forma helicoidal com uma estrutura secundária que se repete: glicina-AA-prolina ou glicina-AA-hidroxiprolina, onde AA

pode ser qualquer resíduo de aminoácido. O colágeno é constituído por 35% de glicina, 11% de alanina e 21% de prolina e hidroxiprolina. Somente os resíduos de glicina podem ser acomodados nas junções entre as cadeias  $\alpha$  individuais. Os resíduos de prolina permitem o entrelaçamento da hélice do colágeno. As cadeias  $\alpha$  das moléculas de colágeno e as moléculas de colágeno das fibras são ligadas por ligações covalentes, envolvendo lisina, hidroxilisina ou resíduos de histidina.

Sob o termo caseína entende-se um grupo de proteínas denominadas  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseínas, secretadas na forma de complexos micelares, esféricos, estáveis, que contêm fosfato de cálcio. Todas as  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseínas são moléculas anfipáticas, relativamente pequenas, contendo grande número de resíduos de prolina distribuídos de maneira uniforme nas seqüências de aminoácidos. Essa característica estrutural confere à caseína bruta (*in natura*) conformações moleculares relativamente abertas. Todas as caseínas possuem uma carga negativa próxima da neutralidade e a neutralização da carga facilita a complexação e a precipitação com taninos (LUCK *et al.*, 1994).

Acredita-se que cada micela é composta por unidades submicelares porosas, de 10 a 15 nm de diâmetro aproximadamente, as quais são mantidas unidas por pontes de íons cálcio, ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e forças hidrofóbicas. Esta proposta, porém, não é completamente aceita por vários pesquisadores (LUCK *et al.*, 1994; WALSTRA, 1999). Considerando a proposta de que as micelas de caseína seriam constituídas por submicelas, acredita-se que as primeiras apresentariam superfície rugosa e esférica. As submicelas apresentariam composição variável, algumas constituídas de  $\alpha_s$  e  $\beta_s$ -caseínas enquanto outras por  $\alpha_s$  e  $\kappa$ -caseínas. As submicelas seriam unidas por fosfato de cálcio. Nesse sentido, as mesmas se agregariam até a formação das micelas onde as que apresentassem  $\kappa$ -caseínas permaneceriam na parte externa com a cadeia C-terminal formando a superfície da micela. Dessa forma, a cadeia C-terminal impediria, por repulsão eletrostática, a agregação de outras submicelas, também garantindo estabilidade contra floculação (WALSTRA, 1999).

Observações têm sido feitas de que as micelas de caseína não são estruturas fixas. Mudanças de temperatura, pH e força iônica ocasionam mudanças na

distribuição do tamanho e na proporção de submicelas livres (KRUIF, 1999; WALSTRA, 1999).

No que tange à complexação de polifenóis em solução, esses são removidos pela caseína mediante a participação das estruturas micelares, poros hidrofóbicos, regiões submicelares hidrofóbicas e, possivelmente, também devido a um deslocamento favorável da  $\beta$ -caseína nas estruturas micelares (LUCK *et al.*, 1994).

### 3.3.3 Complexação com derivados da povidona

Face às limitações observadas para o uso de agentes complexantes protéicos, a avaliação de novos agentes, de natureza não-protéica, representa uma alternativa analítica já anteriormente relatada na literatura, com destaque para a polivinilpirrolidona (PVPP) e à sua elevada capacidade de complexação com polifenóis (HORN; DITTER, 1982; MAKKAR, *et al.*, 1995; SOARES, 2002).

Atualmente, polivinilpirrolidonas solúveis (PVP) são utilizadas como adjuvantes farmacêuticos devido às suas propriedades adesivas, de formação de filme, sua excelente solubilidade em água e outros solventes de uso farmacêutico além da afinidade por superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas. A capacidade de formar complexos (solúveis) com um grande número de substâncias pode ser utilizada para incrementar a solubilidade de fármacos, em meio líquido, ou aumentar a biodisponibilidade, de formas sólidas. Outra aplicação para a propriedade de complexação é a estabilização de proteínas e enzimas em diagnósticos (KOLLIDON, 2001).

Os derivados insolúveis da povidona reticulada (ou *cruzada*), incorretamente denominados de *polivinilpolipirrolidona* pela indústria alimentícia e abreviados como PVPP pela indústria de bebidas, encontram aplicação na indústria farmacêutica como desintegrantes, adsorventes e formadores de complexos (KOLLIDON, 2001). Nesse trabalho, será utilizada a abreviatura PVPP para designar os derivados insolúveis da polivinilpirrolidona.

Os polímeros da PVPP apresentam ainda outros empregos na indústria e em pesquisas. Exemplo disso são as investigações que têm sido feitas utilizando esses polímeros para extração e purificação de DNA de microorganismos, entre eles, *Escherichia coli* (TROCHIMCHUNK *et al.*, 2003) e *Ralstonia solanacearum*

(POUSSIER *et al.*, 2002). Também tem sido investigada a aplicação na extração de enzimas (ASEGA; CARVALHO, 2004), bem como nos processos de remoção de resíduos de fungicidas em vinhos tintos. Neste caso, a complexação ocorre através de ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila da poliamida e as hidroxilas fenólicas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

Outra aplicação dos polímeros insolúveis da PVPP, como Divergan® RS e Divergan® F, é na clarificação de cervejas e vinhos. Depois de um curto período de tempo os polifenóis presentes no vinho podem se oxidar, alterando assim a coloração e as qualidades sensoriais da bebida. No caso de cervejas os compostos polifenólicos formam complexos causadores de turbidez. A fim de evitar esses problemas, a indústria de bebidas tem se utilizado de polímeros como Divergan® RS (regenerável) e Divergan® F (não-regenerável), que apresentam capacidade de complexar os polifenóis (BASF, 2003).

Nesse sentido, derivados de PVPP também têm sido utilizados em membranas de ultrafiltração, para evitar a formação de precipitados de polifenóis e proteínas em sucos de frutas. A PVPP associada às membranas promove a complexação das substâncias polifenólicas maiores, permitindo a passagem de pigmentos e pequenas substâncias fenólicas através dos poros (BORNEMAN *et al.*, 2001).

Derivados da PVPP, assim como bentonita e misturas de pectinase e amilase, também têm sido avaliados para utilização no tratamento prévio de sucos de frutas, em processo anterior a ultrafiltração. A bentonita em concentração de 0,5% foi superior quanto à redução da turbidez, no entanto, a PVPP foi mais efetiva para a remoção de taninos (YOUN *et al.*, 2004).

Em contrapartida, alguns autores afirmam que o processo de clarificação afeta a qualidade do vinho, já que agentes clarificantes como a bentonita, a PVPP e a gelatina reduzem os níveis de compostos fenólicos, alteram a cor e as características sensoriais da bebida. Segundo os autores, a gelatina apresenta pouca influência sobre vinhos tintos jovens já que afeta somente compostos coloidais, enquanto a PVPP removeria também compostos fenólicos de baixa massa molecular (GÓMEZ-PLAZA *et al.*, 2000).

De modo geral, os polifenóis apresentam uma maior afinidade por PVPP do que pelas proteínas, o que justifica sua inserção em vários campos da pesquisa (GARRIDO *et al.*, 1991; MAKKAR, 2003).

A PVPP contém grupos hidrofílicos (anel pirrolidina) e grupos hidrofóbicos (cadeia vinílica). Devido a isso, dois tipos de ligação parecem ser importantes para a complexação de moléculas com o polímero: a formação de ligações de hidrogênio através das funções carbonila (ANDERSEN; SOWERS, 1968; DONNER *et al.*, 1993; MAKKAR *et al.*, 1995) e as interações hidrofóbicas (PLAIZIER-VERCAMEN; DE NÈVE, 1982).

FRÖMMING e colaboradores (1981), ao investigar as possíveis interações entre diversos fármacos e a polivinilpirrolidona, observaram diferentes afinidades dos fármacos pelo polímero, onde o aumento da força de interação se dá devido a uma elevação no número de grupos funcionais polares e a um aumento na extensão da porção hidrofóbica, justificativas estas aplicadas para explicar as elevadas constantes de associação observadas para o ácido tânico, por exemplo.

Respalhando a importância das ligações de hidrogênio no processo de complexação PLAIZIER-VERCAMEN e De NÈVE (1982) observaram que um aumento no número de grupamentos hidroxila substituídos no anel benzênico promove aumento na constante de associação PVPP/polifenóis.

HORN e DITTER (1982) verificaram a existência de uma correspondência entre a força de interação com o número e a posição dos grupos doadores de hidrogênio. Observaram ainda que em todos os compostos bifuncionais os complexos mais fracos eram formados por isômeros *orto*. Uma maior tendência de interação observada para bifenóis com isômeros *meta* e *para* indicam a influência da posição dos grupos hidroxila na molécula e, possivelmente, de um efeito estérico.

MAKKAR e colaboradores (1995) observaram que taninos se ligam à PVPP em diferentes graus. Isso pode ser devido à diferença no número de grupos fenólicos e suas posições no núcleo ou às conformações desses taninos. Propuseram ainda que a ligação de taninos com PVPP seja análoga à ligação de taninos com proteínas, ou seja, a associação é maior para taninos que apresentam uma conformação aberta.



SIEBERT (1999), compara a PVPP aos resíduos do aminoácido prolina. Ambos apresentam anéis de cinco membros saturados, contém nitrogênio no anel, ligações amida e não possuem outros grupamentos funcionais. Dessa forma, o autor sugere que os polifenóis se complexam com a PVPP de maneira similar ao que acontece às proteínas ricas em prolina.

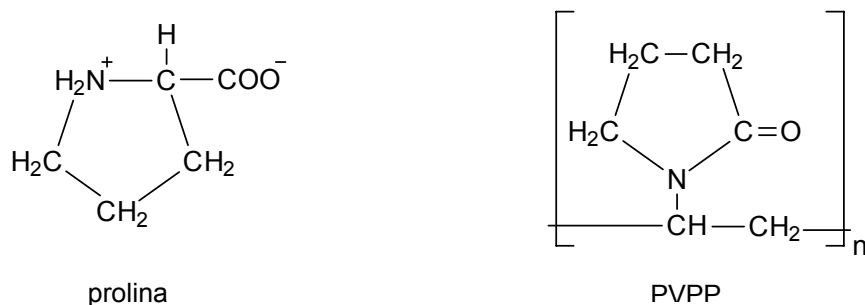


Figura 3. Estrutura molecular do aminoácido prolina e da PVPP.

SIEBERT e LYNN (1997) estudando os mecanismos de adsorção na estabilização de bebidas verificaram que a eficiência da utilização de PVPP como agente clarificante varia de acordo com o tipo de bebida. Em cervejas, a PVPP mostrou-se menos efetiva na remoção de polifenóis quando comparada ao suco de maçã. De acordo com os autores esse fato está relacionado com a menor quantidade de polifenóis presente na cerveja. Nessa condição, os polifenóis parecem se associar preferentemente às proteínas ficando indisponíveis para a PVPP. Em contrapartida, em bebidas com elevada concentração de polifenóis a maior parte dos sítios ligantes das proteínas se encontraria “ocupada” por polifenóis, que por sua vez apresentariam sítios disponíveis para a complexação com a PVPP, originando complexos proteína-polifenol-PVPP.

Os processos de quantificação de taninos que envolvem pó-de-pele, caseína e PVPP como agentes complexantes, que já se encontram na forma insolúvel, não envolvem a precipitação protéica. Dessa forma, nesses processos, são importantes somente os fatores que influenciam na complexação entre polifenóis e proteínas.

### 3.3.4 Aspectos analíticos por CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência trouxe avanços significativos na análise de produtos naturais. A utilização de colunas com superfície apolar (fase

reversa) permitiu a identificação e quantificação de substâncias polares, pouco voláteis e termolábeis (SADEK, 2000).

As técnicas analíticas por CLAE encontram emprego na identificação e quantificação de estruturas monoméricas dos taninos, como ácido gálico, ácido elágico, catequina e pirogalol; ou estruturas com até 7-8 unidades flavônicas dos taninos condensados (HARVEY, 2001).

Nesse sentido diversos trabalhos têm sido realizados e condições cromatográficas distintas têm sido utilizadas. A tabela 1 descreve de forma resumida, as principais condições cromatográficas relatadas para análise de taninos e estruturas monoméricas.

Tabela 1. Resumo dos métodos por CLAE de determinação de taninos e monômeros de taninos hidrolisáveis e condensados.

Coluna	Fase móvel	Eluição	Fluxo (mL/min)	$\lambda$ (nm)	Referência
Cosmosil C <sub>18</sub>	TFA 0,1%, 0,1% TFA em MeOH (4:1)	I	1,0	220	Kawamoto <i>et al.</i> , 1995
Nucleosil C <sub>18</sub>	A – H <sub>2</sub> O: MeOH : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (975,5:19,5:1) B – MeOH: H <sub>2</sub> O (70:30)	G	1,2	280	FAO, 2000.
TSK-gel ODS	A – 0,025% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (água) B - 0,025% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	G	1,0	Detector eletroquímico	Nakai <i>et al.</i> , 2000
Exsil C <sub>18</sub>	A – H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,2% B – 82% ACN:0,04	G	1,0	280	Peng <i>et al.</i> , 2001
Alltech C <sub>18</sub>	A – H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH (97:3) B - MeOH	G	1,0	280 e 360	Zuo <i>et al.</i> , 2002
LiChrospher RP-18	A - H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,5) B – MeCN: H <sub>2</sub> O (4:6)	G	1,0	280	Makris <i>et al.</i> , 2003
Shim-Pack VP-ODS	A – H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% B - MeOH	G	0,6	280	Shui; Leong, 2004.
-	A – HClO <sub>4</sub> 0,6% B - MeOH	G	1,0	280	Guendez <i>et al.</i> , 2005
ODS Spherisorb RP	A – ACN: H <sub>2</sub> O (1:9) B – ACN: H <sub>2</sub> O (1:1)	G	0,7	280	Ramma <i>et al.</i> , 2005
Alltima C <sub>18</sub>	ACN: CH <sub>3</sub> COOH (90:20)	I	1,0	Fluorescência : $\lambda_{EX}$ 280; $\lambda_{EM}$ 315.	Savova <i>et al.</i> , 2005
Hypersil C <sub>18</sub>	A – CH <sub>3</sub> COOH 0,6% B - MeOH	G	0,7	280	Pinelo <i>et al.</i> , 2006
Hypersil C <sub>18</sub>	A – CH <sub>3</sub> COOH 2% B - CH <sub>3</sub> COOH: ACN	G	1,0	280	Stampar <i>et al.</i> , 2006
Spherisorb ODS 2	A - CH <sub>3</sub> COOH 6% B – ACN:H <sub>2</sub> O (65:30)	G	0,5	280	Proestos <i>et al.</i> , 2006
Waters C <sub>18</sub>	0,1% de CH <sub>3</sub> COOH em H <sub>2</sub> O: ACN: CH <sub>3</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> (87:10:3)	I	1,0	280	Row; Jin, 2006

Como se pode observar na tabela 1, existem diversos métodos aplicados na quantificação de taninos por CLAE. No entanto, a maior parte desses utiliza fase móvel com presença de ácido, coluna C<sub>18</sub> eluição em gradiente e comprimento de onda em 280 nm.

### **3.4 Validação de métodos analíticos**

Validação de um método analítico é o processo de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002; BRASIL, 2003). Também pode ser entendida como um processo de obtenção, documentação e análise de dados, permitindo descrever o método de forma detalhada e permitindo a identificação e o controle dos fatores de variação. A validação é, portanto, um processo sistemático, o que permite que as operações de trabalho (sistema de execução do processo analítico) sigam critérios estabelecidos e aceitos, e sejam reproduzíveis em diferentes laboratórios, com precisão e exatidão, através do estabelecimento de limites de confiança (MARTINS, 1998).

Os testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos são considerados validados, desde que sejam avaliados parâmetros como, exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), especificidade, linearidade, intervalo e robustez (EMEA, 1998; BRASIL, 2003).



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---



## **4.1 Materiais**

### **4.1.1 Matéria-prima vegetal**

Constituída por folhas secas de *Psidium guajava*, coletadas no Município de Porto Alegre, em março de 2004.

### **4.1.2 Reagentes, solventes e substâncias de referência.**

Acetato de etila, acetonitrila grau CLAE (Merck); ácido clorídrico, ácido fórmico, ácido fosfórico a 85% (Merck); ácido fosfomolibdico (Sigma), ácido gálico (Merck), ácido tânico (Merck), catequina (Sigma), molibdato de sódio (Sigma), pirogallol (Merck), rutina (Sigma), solução metanólica de cloreto férrico a 5%, solução saturada de bromo, sulfato de lítio monohidratado (Merck), tungstato de sódio (Sigma).

### **4.1.3 Agentes precipitantes**

Caseína grau técnico (GT) (Sigma, C7870, lote: 35H0822); Caseína purificada (Sigma, C5890; lote: 042K0112); Divergan® F (BASF, lote: 98566236WO); Divergan® RS (BASF, lote: 333050); Kollidon® CL (BASF, lote: 26897); pó-de-pele (Freiberg-Forschungsinstitut); PVPP-P6755 (Sigma);

### **4.1.4 Aparelhos equipamentos e materiais diversos**

Agitador magnético (IKA, RO15), balança analítica (Mettler, AB204), balança de infravermelho (Bel Mark, Top Ray), banho-de-água (BUCHI, B-480), banho de ultra-som (Elma Transonic 460), calorímetro diferencial exploratório (Shimadzu, DSC 60): controlador de fluxo para gás de purga (N<sub>2</sub>) (Shimadzu, FC-60A), integrador (Shimadzu, TA-60WS) e software de controle e avaliação (Shimadzu, TA-60 versão 2.0), centrífuga (FANEM, 206 BL), cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, LC-10A): bomba (LC10AD), sistema de válvulas para eluição gradiente (Shimadzu, FVC-10AL), detector UV/VIS (Shimadzu, SPD10A), injetor automático (Shimadzu, SIL-10A), desgaseificador DGU-2A, programa para aquisição de dados (Shimadzu, CLASS-LC10), coluna cromatográfica Gemini C18, 5µm, 110A, 250 x 4,60 mm (Phenomenex), pré-coluna Bondapack C<sub>18</sub>, 10mm x 4 mm, com 125 µm (Shimadzu), espectrofotômetro (Hewlett Packard, HP8452A), espectrômetro de

infravermelho (Shimadzu, DR-8001), estufa de ar circulante (Memmert, TV 60 UL), estufa (Biomatic, 1305), liofilizador (Edwards, Modulyo, 4K), membrana hidrofóbica: 0,45 µm de poro, 7 mm de diâmetro (HVLPO4700, Millipore), membrana hidrofílica: 0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro (HVLPO1300, Millipore), moinho de facas (SK1, Retsch); placas de sílica gel GF<sub>254</sub>, porta-amostras de alumínio (Shimadzu, ref. C 201-52943), seladora para porta-amostras (Shimadzu, SSC-30).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Caracterização da matéria-prima vegetal

#### 4.2.1.1 *Identificação botânica*

A droga vegetal foi identificada por Daniel Martins Ayub, botânico da Universidade Luterana do Brasil. Uma exsicata das partes aéreas foi depositada no Herbário da UFRGS e identificada pelo número de depósito ICN 135288.

#### 4.2.1.2 *Secagem e moagem do material vegetal*

O material vegetal foi dessecado em estufa de ar circulante a 40 °C, durante cinco dias. As folhas foram selecionadas manualmente e submetidas à moagem em um moinho de facas, provido de malha de 180 µm. O produto foi acondicionado em frascos de vidro e armazenado em local fresco, protegido da umidade e da luz.

#### 4.2.1.3 *Determinação da perda por dessecação*

##### i) *Método de secagem em estufa*

Três amostras de 2,0 g de droga moída, exatamente pesadas, foram colocadas em pesa-filtros previamente tarados e mantidas em estufa a 105 °C, por 2 horas. Após resfriamento por 30 minutos em dessecador provido de sílica, os pesa-filtros foram pesados e novamente colocados na estufa por mais 1 hora, repetindo-se o procedimento até obter uma diferença igual ou inferior a 5 mg entre duas pesagens sucessivas. Os resultados foram expressos como perda de massa percentual, relativos à média de três determinações (DEUTSCHES, 1986).



ii) *Método de secagem em balança de infravermelho*

Três amostras de 1,0 g da droga seca moída, exatamente pesadas, foram analisadas em balança de infravermelho, conforme descrito por MARTINS (1998). A temperatura de aquecimento foi programada para 105 °C, com ciclos de resfriamento de 15 segundos.

**4.2.2 Preparo da solução extrativa para análise do teor de taninos**

Para obtenção da solução extrativa, 0,5 g de matéria-prima vegetal seca e moída foram submetidas à decocção a 100 °C com 150,0 mL de água, durante 30 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, a solução extrativa foi transferida para balão de 250,0 mL e o volume completado com água. Em seguida, a solução extrativa foi filtrada, sendo desprezados os primeiros 50,0 mL (Ph. Eur., 2002).

**4.2.3 Caracterização da solução extrativa para análise do teor de taninos**

4.2.3.1 *Análise cromatográfica qualitativa de taninos condensados e hidrolisáveis*

*i) Preparação das amostras:*

A uma amostra de 5,0 g de droga vegetal moída foram adicionados 50 mL de água destilada. A mistura resultante foi extraída por digestão sobre banho-maria a 95 °C, por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, a solução extrativa foi filtrada e o seu volume ajustado para 50,0 mL com água destilada. Desta, um volume de 3 µL foi aplicado sobre placa de gel de sílica (F. Bras. IV, 1988).

*ii) Preparo das soluções de referência para análise por CCD*

Quatro soluções de substâncias de referência foram preparadas por dissolução utilizando as seguintes quantidades e volumes:

- a) Solução 1: 5 mg de ácido gálico em 5,0 mL de álcool a 60 % (V/V).
- b) Solução 2: 30 mg de ácido tânico em 5,0 mL de álcool a 60% (V/V).
- c) Solução 3: 5,0 mg de (+)-catequina em 5,0 mL de álcool a 60% (V/V).

d) Solução 4: 5,0 mg de pirogalol em 5,0 mL de álcool a 60 % (V/V).

*iii) Procedimento analítico*

O sistema cromatográfico foi preparado a partir de uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: água (80:1:1), utilizando placas de gel de sílica, não ativadas, com indicador de fluorescência. O processo foi desenvolvido a temperatura ambiente, observando um percurso de 10,0 cm em cuba cromatográfica saturada. A revelação foi realizada utilizando-se solução metanólica de cloreto férrico a 5%.

*4.2.3.2 Determinação do pH*

O pH da solução extrativa foi determinado a 25 °C em potenciômetro calibrado com soluções de tampão fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0 respectivamente. O resultado foi expresso pela média de três determinações (F. Bras. IV, 1988).

*4.2.3.3 Determinação do resíduo seco*

Um volume equivalente a 20,0 g da solução extrativa foi pesado, de forma exata em pesa-filtro previamente tarado, e evaporado sobre banho-de-água fervente até à secura, com agitação ocasional. O resíduo foi colocado em estufa a 105 °C por duas horas, resfriado em dessecador provido de sílica e pesado. A amostra foi recolocada em estufa por 30 minutos, repetindo-se o procedimento até peso constante. O resultado, expresso em relação a 100,0 g da solução extrativa, corresponde à média de três determinações.

**4.2.4 Preparação do produto seco liofilizado**

A solução extrativa aquosa foi dividida em frascos para liofilização cobertos com papel filtro. Após congelamento desses, procedeu-se à liofilização nas seguintes condições: pressão de  $10^{-1}$  mbar e temperatura de -60 °C. Os frascos de liofilização ficaram ao abrigo da luz durante todo o processo de secagem. O produto seco liofilizado foi acondicionado em frascos âmbar, hermeticamente fechado e armazenado em dessecador até o momento do seu uso.

## **4.2.5 Caracterização do produto seco liofilizado**

### *4.2.5.1 Determinação da perda por dessecação*

Exatamente, cerca de 100,0 mg do produto seco liofilizado foram pesados em pesa-filtro previamente tarado, colocados em estufa a 105 °C por duas horas e, a seguir, resfriados a temperatura ambiente sobre sílica e pesados. Este procedimento foi repetido em intervalos de 30 minutos até peso constante. Os resultados foram expressos em percentual ponderal pela média de três determinações (DEUTSCHES, 1986).

### *4.2.5.2 Análise cromatográfica qualitativa de taninos condensados e hidrolisáveis*

A amostra foi ensaiada e comparada conforme descrito no item 4.2.3.1.

## **4.2.6 Caracterização das substâncias de referência**

### *4.2.6.1 Espectroscopia no ultravioleta*

Os espectros de absorção foram obtidos por varredura no intervalo de comprimento de onda de 200 a 500 nm, utilizando soluções aquosas nas concentrações de 0,4, 0,4, 1,4 e 3,0 mg mL<sup>-1</sup> de ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol, respectivamente. Os critérios de comparação foram a coincidência dos máximos de absorção e sobreposição geral dos espectros.

### *4.2.6.2 Espectroscopia no infravermelho*

Amostras de 1,5 mg de ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol foram exatamente pesadas e misturadas com 150,0 mg de brometo de potássio previamente dessecado por uma hora, a 105 °C. As pastilhas foram obtidas por compressão em prensa hidráulica, com uma pressão aplicada de 8 Ncm<sup>-2</sup>, aproximadamente. Os espectros foram obtidos no modo transmitância, utilizando os seguintes parâmetros: resolução de 4 cm<sup>-1</sup>; acumulações de 40 e faixa de leitura de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>. Para fins de identificação, os espectros obtidos foram comparados com análogos relatados na literatura.

#### 4.2.6.3 *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

Amostras de aproximadamente 1 a 2 mg de ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol foram pesadas em porta-amostra de alumínio, o qual foi posteriormente fechado. O equipamento foi previamente calibrado com índio (99,999%) e zinco (99,999%), em termos de temperatura e valores de entalpia. Os parâmetros utilizados para os experimentos foram: velocidade de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>; faixa de temperatura de 25 a 300 °C, utilizando nitrogênio (pureza de 99,999%), com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>, como gás de purga.

As temperaturas de fusão obtidas foram comparadas com as relatadas na literatura para as referidas substâncias.

#### 4.2.7 **Caracterização dos agentes complexantes**

##### 4.2.7.1 *Caseína grau técnico e caseína purificada*

As diferentes amostras de caseína foram caracterizadas pela perda por dessecação. Para tanto, amostras de 2,0 g, exatamente pesadas, foram colocadas em pesa-filtros previamente tarados e mantidas em estufa a 105 °C, por 2 horas. Após resfriamento por 30 minutos em dessecador provido de sílica, os pesa-filtros foram pesados e novamente colocados na estufa por mais 1 hora, repetindo-se o procedimento até obter uma diferença igual ou inferior a 5 mg entre duas pesagens sucessivas. Os resultados foram expressos como perda de massa percentual, relativos à média de três determinações (DEUTSCHES, 1986).

##### 4.2.7.2 *Derivados de PVPP*

###### i) *Espectroscopia no infravermelho*

A análise foi realizada para o Divergan® F; Divergan® RS; Kollidon® CL; PVPP-P6755. Para a realização das análises empregou-se a mesma metodologia descrita no item 4.2.6.2.

###### ii) *Determinação do pH*

Foram utilizadas suspensões aquosas a 1% (m/m) dos diferentes tipos de PVPP. As leituras foram realizadas a 25 °C, em potenciômetro calibrado com

soluções de tampão fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0 respectivamente. O resultado expresso corresponde à média de três determinações (USP 29, 2006).

#### **4.2.8 Avaliação das variáveis analíticas de métodos para determinação do teor de taninos totais utilizando agentes precipitantes protéicos**

##### *4.2.8.1 Preparo dos reagentes*

###### *i) Folin-Ciocalteu*

Pesou-se 100,0 g de tungstato de sódio R e 25,0 g de molibdato de sódio R, que foram dissolvidos em 700 mL de água. À solução resultante foram adicionados 100,0 mL de ácido clorídrico R e 50,0 mL de ácido fosfórico R. A mistura foi aquecida durante 12 horas sob refluxo em aparelho de vidro. Após resfriamento, foram adicionados 150,0 g de sulfato de lítio monoidratado, 50,0 mL de água e algumas gotas de bromo R. A solução foi aquecida, sem refluxo, por 15 minutos, a fim de promover a evaporação do bromo residual. Após resfriamento, a mistura foi transferida para balão volumétrico de 1000,0 mL e o volume completado com água. O reagente foi filtrado e armazenado em geladeira (4 °C), em frasco de vidro âmbar (Ph. Eur., 2002). Quando necessário, o procedimento de adição e aquecimento com bromo R foi repetido, a fim de assegurar a atividade plena do reagente.

###### *ii) Folin-Denis*

Foram pesados 10,0 g de tungstato de sódio e 2,0 g de ácido fosfomolibdico, que foram dissolvidos em 75,0 mL de água. À solução foram adicionados 5,0 mL de ácido fosfórico R e essa submetida a aquecimento sob refluxo durante 2 horas. Após resfriamento, a solução foi transferida para balão de 100,0 mL e o volume completado com água (F. Bras. IV, 1988).

###### *iii) Solução de carbonato de sódio a 20%*

Para preparação do reagente, 20,0 g de carbonato de sódio anidro foram dissolvidos com aproximadamente 80,0 mL de água. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com água.

#### 4.2.8.2 Determinação dos polifenóis totais

Foi realizada, com modificações, conforme descrito no *Método Geral para a quantificação de taninos* da Ph. Eur. (2002). Para a determinação dos polifenóis totais, 5,0 mL da solução extrativa, preparada conforme descrito no item 4.2.2, foram diluídos a 25,0 mL com água (concentração de  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Em balão de 25,0 mL, volumes de 1,0 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, conforme o caso, foram adicionados de 10,0 mL de água e 2,0 mL da solução extrativa diluída e o volume foi completado com solução de carbonato de sódio a 20%. A leitura da absorvância foi realizada em 760 nm, 30 min após adição do reagente de oxi-redução à solução extrativa diluída, de modo a obter leituras de absorvância entre 0,4 e 0,8 U.A. O tempo de leitura foi estabelecido mediante acompanhamento da cinética de reação nos tempos de 0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 15; 20; 30 e 60 min após adição do reagente de oxi-redução à solução extrativa diluída, com leitura em 760 nm.

##### 4.2.8.2.1 Estabelecimento da região de comportamento linear

A quantidade ótima de agente de oxi-redução, capaz de assegurar a linearidade na faixa de trabalho pretendida, foi determinada mediante análise de regressão das curvas de calibração obtidas para pirogalol (0,8, 1,6, 2,4, 3,2 e  $4,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Soluções de compensação foram obtidas substituindo o volume de amostra por água, mantendo mesmas quantidades de reagente de Folin-Ciocalteu e solução saturada de carbonato de sódio.

##### 4.2.8.3 Quantificação da fração não-tanante

Foi realizada segundo descrito no *Método Geral para a quantificação de taninos* da Ph. Eur. (2002), porém, utilizando caseína purificada e caseína grau técnico como agentes complexantes. Para estabelecer o tipo e a quantidade de caseína a serem utilizados, alíquotas de 10,0 mL da solução extrativa filtrada (preparada conforme item 4.2.2) foram misturadas, separadamente, com quantidades de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 mg de caseína, submetidas a agitação magnética durante uma hora e, finalmente, filtradas. Dos filtrados, alíquotas de 5,0 mL de cada foram diluídas a 25,0 mL com água. Em balão de 25,0 mL, 2,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 10,0 mL de água foram adicionados a 2,0 mL da solução extrativa diluída e o volume completado com solução de

carbonato de sódio a 20%. As condições experimentais, tempo de leitura, quantidade de reagente e comprimento de onda foram as mesmas estabelecidas a partir do item 4.2.8.2.

#### 4.2.8.4 Seleção da substância de referência

A seleção foi baseada na comparação entre os espectros de absorção das substâncias de referência e da solução extrativa ( $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), na região 400 a 800 nm. As condições experimentais, tempo de leitura e quantidade de reagente para a preparação das soluções de leitura foram as mesmas estabelecidas em 4.2.8.2.

#### 4.2.8.5 Curva de calibração do pirogalol (substância de referência)

As curvas de calibração utilizando 1,0 e 2,0 mL de reagente foram obtidas para as concentrações de pirogalol de 0,8, 1,6; 2,4, 3,2, 4,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A absorção específica ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) do pirogalol foi calculada a partir dos dados gerados. As demais condições experimentais foram as estabelecidas a partir do item 4.2.8.2. A absorção específica do pirogalol foi calculada a partir da equação:

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{A \cdot 10}{C}$$

Onde:  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  = absorção específica do produto reacional reagente-pirogalol; A = absorvância do produto reacional (U.A.); C = concentração de pirogalol ( $\text{g L}^{-1}$ ).

#### 4.2.8.6 Curva de calibração para polifenóis totais e fração não-tanante da solução extrativa

A linearidade na faixa de concentração estudada e a proporcionalidade entre os resultados para polifenóis totais e a fração não-tanante foram avaliadas mediante análise de duas curvas de calibração, uma para polifenóis totais e a outra para a fração não-tanante, obtidas segundo a metodologia abaixo descrita.

A solução extrativa foi diluída de modo a obter uma concentração de  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para a quantificação dos polifenóis totais alíquotas dessa solução foram tomadas, obtendo-se soluções com concentrações de 0,24, 0,32, 0,40, 0,48, 0,56 e

0,64 mg mL<sup>-1</sup>. Em balão de 25,0 mL, o reagente de Folin-Ciocalteu e 10,0 mL de água foram adicionados a 2,0 mL de cada uma das soluções previamente diluídas e o volume completado com solução de carbonato de sódio a 20%. As condições experimentais tempo de leitura, quantidade de reagente e comprimento de onda foram as mesmas estabelecidas no item 4.2.8.2.

Para a quantificação da fração não-tanante foram utilizadas 400,0 mg de caseína GT e as demais condições experimentais definidas em 4.2.8.3.

#### 4.2.8.7 Cálculo do teor de taninos

Para o cálculo do teor de taninos totais foi utilizado o conjunto de equações:

$$PT = \frac{A_1 \cdot FD}{(m - p) \cdot A_{1cm}^{1\%}}$$

$$FNT = \frac{A_2 \cdot FD}{(m - p) \cdot A_{1cm}^{1\%}}$$

$$TT = PT - FNT$$

Onde, **m** = massa da amostra (g); **p** = perda por dessecação (g); **A<sub>1</sub>**, **A<sub>2</sub>** = absorções das soluções (U.A.); **FD** = fator de diluição; **PT** = teor de polifenóis totais (g%); **FNT** = teor de substâncias não-tanantes (g%); **TT** = teor de taninos totais (g%); **A<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>** = absorção específica do pirogalol (2099 UA).

#### 4.2.8.8 Reprodutibilidade para o método de doseamento do teor de taninos totais

Foi realizado utilizando três soluções extrativas, preparadas segundo item 4.2.2, em dias diferentes e em triplicata. A determinação dos polifenóis totais foi realizada com as condições experimentais tempo de leitura, quantidade de reagente e comprimento de onda estabelecidas no item 4.2.8.2. O teste de reprodutibilidade para a fração não-tanante foi realizado segundo o descrito no item 4.2.8.3 com 400,0 mg de caseína GT.



#### 4.2.8.9 *Repetibilidade para o método de doseamento do teor de taninos totais*

Foi realizado utilizando uma mesma solução extrativa, preparada segundo item 4.2.2, a qual foi diluída de modo a obter uma concentração de  $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para avaliar a repetibilidade dos polifenóis totais, nove alíquotas da solução extrativa foram tratadas com 2,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, 10,0 mL de água e o volume completado a 25,0 mL com solução de carbonato de sódio a 20%.

Para a fração não-tanante, especificamente, uma mesma solução extrativa com concentração de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foi tratada com 400,0 mg de caseína GT, mantendo-se as demais condições experimentais definidas no item 4.2.8.3. Posteriormente, a amostra foi filtrada e 5,0 mL do filtrado foram diluídos a 25,0 mL com água, rendendo uma concentração de  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ . A seguir, nove alíquotas de 2,0 mL dessa solução foram submetidas ao mesmo tratamento adotado no teste de repetibilidade para os polifenóis totais descrito nesse mesmo item.

#### 4.2.8.10 *Comparação entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o reagente de Folin-Denis*

Para a determinação dos polifenóis totais, 5,0 mL da solução extrativa filtrada foram diluídos a 25,0 mL com água. Em balão de 25,0 mL, 2,0 mL do reagente de Folin-Denis foram adicionados a 2,0 mL de solução extrativa e 10,0 mL de água e o volume completado com solução de carbonato de sódio a 20%. O comprimento de onda e a concentração de reagente foram aqueles definidos no item 4.2.8.2.

Para a determinação da fração não-tanante utilizou-se 400,0 mg de caseína GT e foram adotadas as demais condições experimentais definidas no item 4.2.8.3.

#### 4.2.8.11 *Quantificação de taninos mediante uso de pó-de-pele*

A quantificação dos polifenóis totais foi realizada segundo o descrito no item 4.2.8.2. Para a determinação da fração não-tanante utilizou-se 100,0 mg de pó-de-pele e as demais condições experimentais definidas no item 4.2.8.3. O teor de taninos foi calculado utilizando o mesmo conjunto de equações descrito no item 4.2.8.7.

#### 4.2.8.12 Avaliação da especificidade da formação de complexos entre derivados protéicos e taninos através de método espectrofotométrico e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

##### A) Avaliação a especificidade utilizando método espectrofotométrico

Adicionou-se 20,0 mg de rutina em 100,0 mL de solução extrativa preparada segundo item 4.2.2 e procedeu-se a quantificação dos polifenóis totais, de acordo com o especificado no item 4.2.8.2. Para a determinação da fração não-tanante foram utilizados 400 e 600 mg de caseína GT e as demais condições experimentais estabelecidas no item 4.2.8.3. Os resultados obtidos foram comparados com os encontrados através de realização do ensaio sem a adição de rutina.

##### B) Avaliação da especificidade utilizando CLAE

###### i) Preparação de amostras

Soluções das substâncias de referência: foram preparadas utilizando como solvente uma mistura de acetonitrila:água 1:3 e uma quantidade apropriada de cada uma das substâncias de referência, de modo a obter soluções individuais com concentração de 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido gálico, catequina, pirogalol e rutina. Posteriormente foi preparada uma solução contendo essas quatro substâncias, mantendo-se a mesma concentração.

Solução extrativa: 100,0 mg do produto liofilizado foram diluídos em 50,0 mL de água. A solução resultante foi filtrada e injetada no aparelho. Para avaliar a complexação com caseína, alíquotas de 10,0 mL da solução reconstituída foram tratadas com 100, 200, 400, 600, 800 e 1600 mg de caseína. Realizou-se o mesmo procedimento para avaliar a complexação com pó-de-pele utilizando 50,0 e 100,0 mg do mesmo. As demais condições experimentais como tempo de complexação e filtração foram as mesmas descritas no item 4.2.8.3.

###### ii) Sistema cromatográfico

Foi adotada uma separação em gradiente de nove fases, utilizando misturas de ácido fosfórico a 5% (solução **A**) e acetonitrila:ácido fosfórico a 5% (60:40 m/m) (solução **B**), em diferentes proporções. **Fase 1:** de 13% a 25% de B, em 25 min;

**fase 2:** isocrática, com 25% de B, por 5 min; **fase 3:** de 25% a 33% de B, em 7 min; **fase 4:** isocrática, 33% de B por 3 min; **fase 5:** de 33% a 40% de B, em 7 min; **fase 6:** isocrática, mantendo 40% de B, por 3 min; **fase 7:** de 40 a 43% de B, em 3 min; **fase 8:** isocrática, mantendo 43% de B, por 2 min; **fase 9** (recondicionamento da coluna): de 43% a 13% de B, em 15 min. Em todas as fases o fluxo foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e a pressão mantida constante. Detecção em 280 e 352 nm, com sensibilidade de 0,5 U.A.

#### **4.2.9 Caracterização físico-química dos complexos PVPP-substância de referência**

##### *4.2.9.1 Preparo das soluções de referência*

As soluções aquosas de ácido gálico e ácido tânico foram preparadas na concentração de 0,4 mg mL<sup>-1</sup>; a catequina e o pirogalol nas concentrações de 1,4 e 3,0 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente. Foi utilizado banho de ultra-som para assegurar a total dissolução. Quando não utilizadas de imediato, as soluções foram armazenadas ao abrigo da luz.

##### *4.2.9.2 Seleção do comprimento de onda para leitura*

Foram preparadas soluções aquosas de 0,40 µg mL<sup>-1</sup> de cada uma das substâncias de referência e a absorvância registrada por varredura da região de 200 a 500 nm. Água foi utilizada como líquido de compensação.

##### *4.2.9.3 Preparo das dispersões de PVPP*

As dispersões aquosas de Kollidon® CL, Divergan® RS, Divergan® F e P 6755 – Sigma, nas concentrações de 0,5, 2,5, 7,5 e 15 mg mL<sup>-1</sup>, foram mantidas sob agitação constante durante 24 h, e utilizadas imediatamente após esse período de hidratação.

##### *4.2.9.4 Avaliação do perfil de complexação das diferentes PVPP*

Por separado, alíquotas de 5,0 mL de cada substância de referência e de rutina (0,4 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionadas a balões volumétricos de 25,0 mL contendo cada uma das dispersões obtidas no item 4.2.9.3. Após 30 minutos, as preparações

foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 30 minutos. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 5,0 mL e essa diluída com água destilada em balão de 25,0 mL. As concentrações de ácido gálico, ácido tânico, catequina, pirogalol e rutina foram determinadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda definidos no item 4.2.9.1, utilizando água como líquido de compensação.

Para avaliação da formação de complexos entre a solução extrativa e os diferentes tipos de PVPP, 10,0 mL da solução extrativa (preparada conforme item 4.2.2) foram tratados com as diferentes dispersões de PVPP. O procedimento a seguir foi o mesmo, acima descrito, para as substâncias de referência.

#### 4.2.9.5 Avaliação da complexação entre substâncias de referência e PVPP-P6755 mediante calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Misturas das substâncias de referência e PVPP-P6755 nas proporções 1:1, 1:5 e 1:10, foram submetidas à análise por calorimetria exploratória diferencial. Uma massa entre 1,0 e 2,0 mg foi pesada em porta-amostra de alumínio, posteriormente tampado e selado com selador apropriado. Os parâmetros utilizados para os experimentos foram os mesmos relatados no item 4.2.6.3.

#### 4.2.9.6 Efeito da purificação ácida da PVPP-P6755 sobre a capacidade complexante

Uma amostra exatamente pesada de 50 g de PVPP foi submetida à agitação com 250 mL de HCl 0,1 M por 30 minutos. O material foi filtrado por funil de vidro sinterizado G3, sob pressão reduzida. O resíduo de filtração foi lavado com um litro da mesma solução ácida e, em seguida, repetidas vezes com água destilada, até obtenção de um filtrado totalmente límpido. O resíduo foi seco em estufa a 40 °C, durante 72 horas, e mantido em recipiente hermeticamente fechado até o momento de uso (DONNER *et al.*, 1993; SOARES, 2002).

Dispersões de PVPP-P6755 purificada e não purificada nas concentrações 0,25, 0,5, 1,25, 2,5, 5,0, 7,5 e 15 mg mL<sup>-1</sup> foram submetidas à complexação com 5,0 mL de solução de catequina na concentração de 1,4 µg mL<sup>-1</sup> em balões de 25,0 mL. O procedimento a seguir foi o mesmo descrito no item 4.2.9.4.

#### 4.2.9.7 Avaliação da influência do pH na estabilidade dos complexos PVPP-catequina

Uma solução de catequina a  $700 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi tratada com dispersão de PVPP-P 6755 a  $15 \text{ mg mL}^{-1}$ . O pH foi ajustado utilizando soluções HCl 0,1 M e soluções-tampão de fosfatos e boratos (tabela 2). O procedimento a seguir foi o mesmo descrito no item 4.2.9.4. A absorvância foi determinada nos comprimentos de onda especificados na Tabela 2, utilizando água como líquido de compensação. Os resultados foram expressos como fração ponderal de catequina ligada (FCL) em função do pH.

Tabela 2. Soluções e condições utilizadas para avaliação da influência do pH sobre a formação de complexos entre derivados da povidona cruzada e catequina.

Solução	Volume adicionado	pH obtido	$\lambda_{\text{nm}}$
HCl 0,1N	1,0 mL	2,94	280
HCl 0,1N	0,5 mL	3,36	280
Água destilada	-	6,0	280
Tampão fosfato	15,0 mL	6,99	280
Tampão fosfato	15,0 mL	7,98	280
Tampão borato	15,0 mL	8,43	290*
Tampão borato	15,0 mL	8,99	290*
Tampão borato	15,0 mL	9,39	290*

\* Devido ao deslocamento batocrômico sofrido em pH alcalino, as leituras foram realizadas em 290 nm.

4.2.9.8 Avaliação da especificidade da formação de complexos entre PVPP-P6755 e substâncias de referência por método espectrofotométrico e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A) *Avaliação do perfil de complexação de substâncias de referência adicionadas de rotina com PVPP-P6755*

Foram preparados 100,0 mL de soluções das substâncias de referência catequina e pirogalol. A essas soluções se adicionou 20,0 mg de rutina. As soluções contaminadas foram complexadas com as diferentes dispersões de PVPP-P6755 conforme descrito no item 4.2.9.4.

B) *Avaliação da formação de complexos entre substâncias de referência e PVP-P6755 por CLAE*

i) *Preparação de amostras para análise por CLAE*

Substâncias de referência: uma solução contendo 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido gálico, catequina, pirogalol e rutina foi preparada mediante dissolução em uma mistura de acetonitrila:água 1:3 (V/V). Dessa solução, 10,0 mL foram tratados com 10,0; 50,0; 150,0 e 300,0 mg de PVPP-P6755 durante 30 minutos, centrifugadas a 3000 rpm, por 30 minutos, e finalmente, filtradas e injetadas no cromatógrafo.

#### **4.2.10 Complexação de taninos de *Psidium guajava* com PVPP-P6755**

4.2.10.1 *Seleção da substância de referência*

Catequina foi selecionada como substância de referência considerando os resultados obtidos previamente neste trabalho, além dos observados por SOARES (2002).

4.2.10.2 *Curva de calibração da catequina (substância de referência)*

As curvas de calibração utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu foram obtidas com concentrações de 1,28, 2,56; 3,84, 5,12, 6,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As demais condições experimentais, entre outras, tempo de leitura, comprimento de onda e concentração de reagente foram aquelas definidas em 4.2.8.2. A absorção específica da catequina foi calculada a partir da equação descrita no item 4.2.8.5.

#### 4.2.10.3 *Determinação dos polifenóis totais*

Foi realizada conforme descrito no item 4.2.8.2.

#### 4.2.10.4 *Quantificação da fração não-tanante com PVPP-P6755*

Foi realizado segundo descrito no *Método Geral para a quantificação de taninos* da Ph. Eur. (2002), utilizando a PVPP-P6755 como agente complexante. Diferentes concentrações desse agente complexante foram testadas: 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 300 mg. Para tanto, 10,0 mL da solução extrativa filtrada (ver item 4.2.2) foram tratados, durante 30 minutos, com as concentrações de PVPP-P6755 acima pré-estabelecidas. Após a complexação, as amostras foram filtradas e 5,0 mL do filtrado, diluídos a 25,0 mL com água. Em balão de 25,0 mL, 2,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 10,0 mL de água foram adicionados a 2,0 mL da solução extrativa diluída e o volume foi completado com solução de carbonato de sódio a 20%. As condições experimentais tempo de leitura, quantidade de reagente e comprimento de onda foram às mesmas estabelecidas no item 4.2.8.2.

#### 4.2.10.5 *Cálculo do teor de taninos*

Para o cálculo do teor de taninos totais foi utilizado o conjunto de equações descrito no item 4.2.8.7. Para fins de cálculo adotou-se o  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  da catequina (1359,65).

#### 4.2.10.6 *Avaliação da formação de complexos entre taninos da droga vegetal e PVPP-P6755 por CLAE*

##### i) *Preparação de amostras para análise por CLAE*

Solução extrativa: 100 mg do produto liofilizado foram diluídos em 50,0 mL de água, filtrados e injetados no cromatógrafo. Dessa solução, alíquotas de 10,0 mL foram adicionadas de PVPP-P6755 nas concentrações de 10,0; 50,0; 150,0 e 300,0 mg. A seguir as amostras foram agitadas durante 30 minutos e centrifugadas a 3000 rpm, por 30 minutos. Após, as mesmas foram filtradas e injetadas no cromatógrafo.

#### **4.2.11 Análise comparativa dos teores de taninos totais, calculados mediante utilização de caseína, pó-de-pele e PVPP-6755**

Foi realizada uma análise comparativa dos resultados obtidos para os teores de taninos totais com os diferentes agentes complexantes utilizados, bem como das diferenças no perfil de complexação por CLAE da solução extrativa de *Psidium guajava* com os agentes complexantes avaliados. Também foi realizada uma avaliação da influência das substâncias de referência selecionadas para a quantificação de taninos utilizando o método espectrofotométrico que emprega o reagente de Folin-Ciocalteu.



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---



## 5.1 Caracterização da matéria-prima vegetal

O elevado teor de água que caracteriza órgãos vegetais verdes, favorece a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação dos constituintes ativos além de possibilitar o desenvolvimento de microorganismos (FARIAS, 2003). Para taninos, em geral, é inconveniente a análise de tecidos frescos, tornando-se indispensável a operação de secagem. No entanto, a secagem através de métodos que empregam calor (sol, ou em estufas acima de 70 ° C) diminui consideravelmente a concentração de taninos (SANTOS; MELLO, 2003).

Por esse motivo, para folhas de *Psidium guajava*, se adotou neste trabalho a secagem em estufa a 40 °C, por um período de tempo de cinco dias. O teor de umidade, determinado pelos métodos em estufa e balança de infravermelho para a droga vegetal seca, foi de  $8,82 \pm 0,12$  (CV% = 1,32, n = 3) para o primeiro e de  $9,49 \pm 0,37$  (CV% = 3,88, n=3) para o segundo método. Uma vez que o teor de umidade estabelecido em diferentes farmacopéias varia entre 8 e 14%, com algumas exceções especificadas nas monografias (FARIAS, 2003), os valores obtidos por ambos os métodos foram tidos como satisfatórios. Não obstante a maior dispersão dos resultados no método por balança de infravermelho, carece de um real significado tecnológico, além de já ter sido constatada por outros pesquisadores deste PPGCF, que precederam o presente trabalho.

## 5.2 Preparo e caracterização da solução extrativa para análise do teor de taninos

A relação de solventes e misturas desses relatada na literatura para a extração de taninos é relativamente ampla (HARVEY, 2001). Vários autores recomendam por exemplo metanol:água ou acetona:água. O uso de água parece consensual, uma vez que essa ou sua mistura com alguns solventes orgânicos têm demonstrado rendimentos favoráveis na extração. Contudo, há algumas constatações interessantes, dependendo do tipo de solvente orgânico utilizado. A acetona bloqueia a associação tanino-proteína, o que não ocorre com o metanol (SANTOS e MELLO, 2003). No entanto, o metanol é capaz de romper ligações em galotaninos dando origem a monômeros de ácido gálico ocorrendo o mesmo com água, quando essa é utilizada como líquido extrator a temperaturas acima de 60 °C.

Em temperaturas próximas a 100 °C, a água também pode romper as ligações éter de elagitaninos, o que resulta na liberação de ácido elágico (HARVEY, 2001).

Por entender que a acetona não poderia ser utilizada no processo de extração (devido ao método de doseamento proposto) e que misturas de água:metanol podem provocar a despolimerização dos taninos, optou-se pelo método de extração por decocção com água, como preconizado pela Farmacopéia Brasileira e outros Códigos Oficiais (F. Bras. 1988; DAB, 1998; BP, 2001; Ph. Eur., 2002).

Para a caracterização da solução extrativa foram realizados ensaios de determinação do perfil cromatográfico por CCD, pH e resíduo seco. O valor médio de pH foi de  $6,04 \pm 0,13$  (CV% 2,23; n =3), o que é condizente com a presença de compostos polifenólicos no extrato. O teor médio de resíduo seco foi de  $0,0515 \pm 0,0017$  (CV% 3,36), o que equivale a 8,5% em relação à massa seca de droga vegetal seca (0,5 g), extraída com 250,0 mL de água.

#### 5.2.1 Análise cromatográfica qualitativa de taninos condensados e hidrolisáveis

A partir do cromatograma obtido para taninos da solução extrativa de *Psidium guajava* (figura 4) não se pode concluir pela presença de catequina e ácido gálico, já que ambas as substâncias apresentam bandas de coloração e R<sub>f</sub> semelhantes. A presença de pirogalol e ácido tânico não foi confirmada a partir do cromatograma obtido. O ácido tânico apresentou uma banda semelhante à do ácido gálico, indicando a presença deste no padrão de ácido tânico, que é constituído por uma mistura de taninos hidrolisáveis. O mesmo foi observado por DE SOUZA (2004), que utilizou ácido tânico e ácido gálico para avaliação do perfil cromatográfico de *Phyllanthus niruri*.

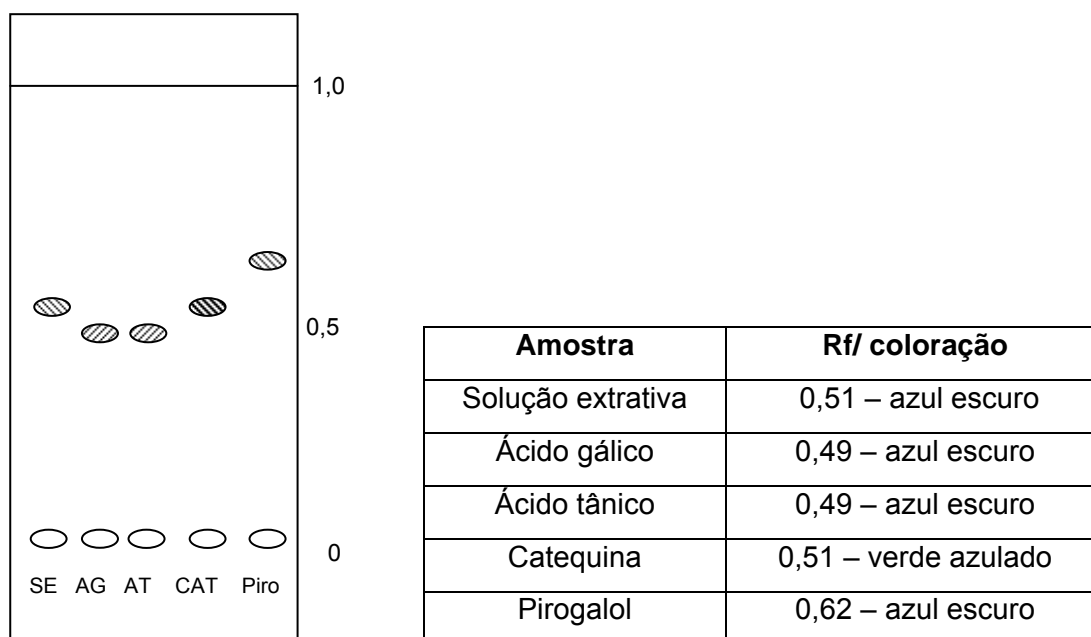


Figura 4. Representação esquemática do cromatograma obtido mediante análise de taninos nas amostras de *Psidium guajava*. SE: solução extrativa, AG: ácido gálico, AT: ácido tânico, CAT: catequina, Piro: pirogalol. Sistema cromatográfico: acetato de etila: ácido fórmico: água (80:1:1), gel de sílica GF<sub>254</sub>, revelação: cloreto férrico.

Sistemas cromatográficos semelhantes ao aqui aplicado, diferindo apenas na proporção da fase móvel, foram utilizados para a detecção de taninos em *Maytenus ilicifolia* (MARTINS, 1998) e *Phyllanthus niruri* (DE SOUZA, 2004), no entanto ambos mostraram-se inconclusivos enquanto à presença de ácido gálico e de catequina. O sistema aqui adotado representa uma tentativa de obter melhor resolução para as bandas dessas substâncias alterando-se a fase móvel. Com isso, valores de Rf diferentes foram obtidos para ácido gálico e catequina. No entanto, as alterações não foram suficientes para garantir a identificação dessas substâncias em *Psidium guajava*.

### 5.3 Preparação e caracterização do produto seco liofilizado

Para a caracterização do produto seco liofilizado foram realizados os testes de perda por dessecação e perfil cromatográfico por CCD. O teor de umidade resultante foi de  $4,85 \pm 0,11$  (CV% 2,4).

O cromatograma obtido para o produto seco liofilizado foi semelhante ao observado para a solução extrativa (figura 4).

Posteriormente a comparação do perfil cromatográfico da solução extrativa e produto seco liofilizado foi também avaliada através de método por CLAE. Os cromatogramas obtidos para a solução extrativa e produto seco liofilizado foram idênticos, indicando que o processo de liofilização não alterou a constituição fenólica do extrato de *Psidium guajava* (figura 11).

## 5.4 Caracterização das substâncias de referência

### 5.4.1 Espectroscopia no ultravioleta

O ácido gálico apresentou pico de absorção máximo em torno de 271 nm, o pirogalol por sua vez teve seu máximo de absorção detectado em 267 nm, já a catequina apresentou pico máximo próximo a 280 nm e o ácido tânico com pico de absorção em torno de 270 (figura 5). De modo geral, esses valores coincidem com aqueles relatados na literatura (JURD, 1962; FRÖMMING *et al.*, 1981; RAMOS-TEJADA *et al.*, 2002).

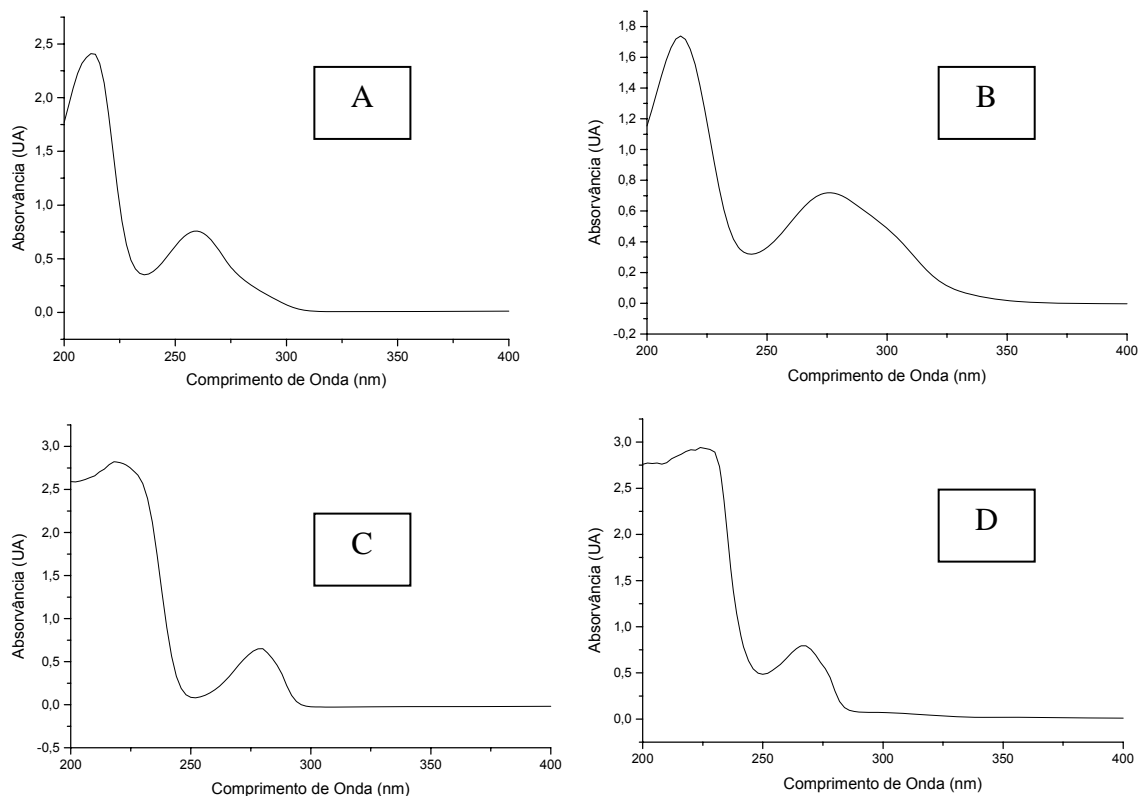


Figura 5. Espectros de absorção no UV das substâncias de referência, ácido gálico (A), ácido tânico (B), catequina (C) e pirogalol (D).

#### 5.4.2 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros obtidos para o ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol mostraram-se sobreponíveis àqueles relatados na literatura (POUCHERT, 1991). As substâncias de referência apresentaram as seguintes bandas características (NAKANISHI; SOLOMON, 1977; SILVERSTEIN *et al.*, 1998; PAVIA *et al.*, 2001).

*Ácido gálico*:  $\nu_{\text{máx}}$ (KBr/cm<sup>-1</sup>): 3200: deformação axial O-H, por formação de ligações de hidrogênio intramoleculares; 3100: deformação axial C-H aromático; 1700: deformação axial C=O; 1600 e 1500: deformação axial C=C de núcleo aromático; 1350: deformação angular no plano de O-H; 1250: deformação axial C-O; 650: deformação axial de C-H de núcleo aromático (ANEXO-figura 1A).

*Ácido tânico* (polímero constituído por moléculas de ácido gálico e ácido elágico):  $\nu_{\text{máx}}$ (KBr/cm<sup>-1</sup>): 3150; deformação axial O-H; 1720: deformação axial C=O; 1610 e 1540: deformação axial C=C de anel aromático; 1200: deformação angular de O-H e deformação axial de C-O; 750: deformação angular fora do plano de C-H aromático; 650: deformação angular fora do plano de O-H (ANEXO-figura 1B).

*Catequina*:  $\nu_{\text{máx}}$ (KBr/cm<sup>-1</sup>): 3370 e 3200: deformação axial O-H; 1600 e 1510: deformação axial C=C do anel aromático; 1250: deformação axial assimétrica de C-O-C; 1240 e 1100: deformação angular de O-H e deformação axial de C-O; 900 e 650: deformação angular fora do plano de C-H aromático (ANEXO-figura 1C).

*Pirogalol*:  $\nu_{\text{máx}}$ (KBr/cm<sup>-1</sup>): 3400: deformação axial O-H; 1900 e 1700: bandas harmônicas de anel aromático trissubstituído; 1620 e 1520: deformação axial C=C do anel aromático; 1390-1180: deformação angular de O-H e deformação axial de C-O; 815: banda forte do C-H fora do plano relativa à substituição do anel aromático (ANEXO-figura 1D).

#### 5.4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para o ácido gálico, a catequina e o pirogalol os valores teóricos das temperaturas de fusão relatados na literatura são, respectivamente, 265 °C, 175-177°C e 131-133 °C (BUDAVARI, 1996). Os valores determinados experimentalmente foram bastante semelhantes (264 °C, 171 °C, 132 °C). Cabe

salientar que pequenas diferenças entre as temperaturas medidas pelo aparelho de Köffler, e aquelas determinadas através de DSC, podem existir. Isso ocorre porque a sensibilidade do segundo é superior, além de haver diferenças de parâmetros tais como atmosfera em que os experimentos são realizados, bem como as velocidades de aquecimento utilizadas (FORD; TIMMINS, 1989; HAINES, 1995; HATAKEYAMA; QUINN, 1999; COSTA, 2005).

A temperatura de fusão de 251 °C determinada para o ácido tânico (mistura polimérica) diferiu da faixa de fusão de 210-215 °C relatada na literatura. Esse fato pode encontrar resposta nas observações feitas por MAKKAR; BECKER (1993), no sentido que, amostras de diferentes marcas comerciais (Merck, Sigma, Fluka, dentre outras) tiveram diferentes capacidades de precipitação protéica e de composições em termos de ácido tânico. Foi realizada para o ácido tânico também a determinação através de Köffler e verificou-se que a partir de 200 °C inicia-se o processo de carbonização da amostra. Ao atingir temperatura de 220 °C a amostra encontra-se totalmente carbonizada. Dessa forma, é possível afirmar que a fusão é acompanhada de carbonização, sendo esses resultados, obtidos no aparelho de Köffler, semelhantes aos relatados na literatura (BUDAVARI, 1996).

### **5.5 Caracterização dos agentes complexantes**

O teor médio de umidade obtido para a caseína purificada foi de  $8,74 \pm 0,06$  com CV % 0,67. O teor de umidade obtido para a caseína grau técnico foi de  $9,25 \pm 0,10$  com CV% 1,09.

Os derivados da PVPP foram caracterizados mediante a determinação do pH e a obtenção dos espectros no infravermelho. Os resultados da determinação do pH estão representados na tabela 3.



Tabela 3. Valores de pH obtidos para os derivados da PVPP.

Substância	pH $\pm$ S	CV (%)
PVPP (P 6755 – Sigma)	7,32 $\pm$ 0,04	0,56
Divergan® F	5,58 $\pm$ 0,06	1,07
Divergan® RS	5,02 $\pm$ 0,04	0,87
Kollidon-CL®	4,47 $\pm$ 0,03	0,74

Nota: S: desvio padrão; n = 4.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que os derivados da PVPP apresentam um pH ácido, com exceção da PVPP-P6755, que apresentou pH próximo da neutralidade. Através da comparação dos resultados com as especificações estabelecidas pelos fornecedores e também pela USP 29 (2006), verificou-se que os valores de pH estão dentro da faixa estabelecida que compreende os limites 3,0 e 7,0.

Os diferentes derivados da PVPP apresentaram espectros no infravermelho idêntidos entre si e completamente sobreponíveis aos relatados na literatura (POUCHERT, 1991; KOLLIDON, 2001). Os espectros apresentaram as seguintes bandas características:  $\nu_{\text{máx}}(\text{KBr}/\text{cm}^{-1})$ :  $\sim 2900$ : deformação axial da ligação C-N; 1670: deformação axial C=O, característica de lactamas de 5 membros; 1450: deformação angular de C-H (NAKANISHI e SOLOMON, 1977; SILVERSTEIN *et al.*, 1998; PAVIA *et al.*, 2001) (ANEXO-figura 1E).

## 5.6 Avaliação das variáveis analíticas de métodos para determinação do teor de taninos totais utilizando agentes complexantes protéicos

### 5.6.1 Comprimento de onda de leitura e tempo de leitura

A revisão comparativa dos métodos gerais de determinação do teor de taninos totais, especificamente daqueles baseados na complexação com proteínas e seguidos de uma reação de oxi-redução, revelou uma certa diversidade nas especificações analíticas entre algumas das principais Farmacopéias e Códigos Oficiais (ANEXO-tabela 1A até 1F). Assim, os comprimentos de onda de leitura variaram entre 730 e 760 nm, dependendo do material vegetal analisado e do

reagente de oxi-redução empregado. De modo similar, os tempos de leitura variaram de dois para 25 e 30 min.

No caso particular da solução extrativa de folhas de *Psidium guajava*, essa apresentou absorção máxima em 760 nm, quando tratada segundo o método de Folin-Ciocalteu. Por sua vez, pirogalol também apresentou um máximo de absorção muito próximo (765 nm), quando tratado nas mesmas condições experimentais. Isso se deve ao fato dos produtos de reação entre o reagente de Folin-Ciocalteu e diversas substâncias polifenólicas terem comprimentos de onda máximos quase sempre próximos a 760 nm, sendo essa uma desvantagem do método (SCALBERT, 1992).

As cinéticas de reação do reagente de Folin-Ciocalteu com pirogalol e com a solução extrativa mostraram comportamentos semelhantes. Em ambos os casos, logo após uma pequena fase de estabilidade, se observou uma segunda de aumento acentuado, quase exponencial, que atingiu valores máximos de absorvância 30 min após adição do reagente. Este resultado coincide com o preconizado por alguns Códigos Oficiais (F. Bras. 1988; DAB, 1998; BP, 2001; Ph. Eur., 2002). Este fato e o precedente uso de pirogalol como substância de referência (DAB, 1998; MARTINS, 1998), levou a selecioná-lo com esta finalidade no presente trabalho.

#### 5.6.2 Quantidade e tipo de reagente de oxi-redução

A possibilidade de esgotamento do reagente de oxi-redução em análises de taninos fora anteriormente assinalada por MARTINS (1998), que constatou a perda da linearidade nas curvas de calibração do pirogalol e de uma solução extrativa de *Maytenus ilicifolia*. Este fato foi notório para a solução extrativa de folhas de *Psidium guajava*, quando utilizado 1,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, sobretudo nas faixas de maior concentração. A adição de 2,0 mL restabeleceu contudo a linearidade, que se mantém quando a quantidade de reagente foi aumentada para 3,0 mL. O mesmo fato foi observado neste trabalho para o pirogalol, nas faixas de concentração referentes às respectivas curvas de calibração. Isso fica evidente na comparação estatística das equações de regressão e dos respectivos limites de

confiança (LC) calculados para as curvas de calibração do pirogalol com 2,0 mL e 1,0 mL de reagente.

Inicialmente realizou-se uma comparação entre as três curvas de calibração obtidas para o pirogalol utilizando 2,0 mL de reagente, a fim de verificar a igualdade estatística entre elas e determinar uma única curva para fins de cálculo. Para tanto, as três curvas de calibração foram submetidas à análise de regressão linear (tabela 4) e os parâmetros foram comparados a fim de verificar diferenças entre as inclinações e elevações obtidas nas retas.

Tabela 4. Resultados da análise de regressão linear das curvas analíticas do pirogalol em 760 nm, com 2,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu

Curva 1	Coeficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	-0,02027	0,00666	-0,03465	-0,00588	0,00940
Inclinação (b)	0,21655	0,00251	0,21113	0,22197	2,54 x 10 <sup>-19</sup>
$R^2 = 0,9982$ ; $F_{\text{tabelado}} = 4,67$ ; $F_{\text{calculado}} = 7446,76$ ; Equação 1: $y = 0,21655x - 0,02027$					
Curva 2	Coeficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	-0,01633	0,00822	-0,03410	0,00144	0,06862
Inclinação (b)	0,21206	0,00310	0,20536	0,21876	5,18 x 10 <sup>-18</sup>
$R^2 = 0,9972$ ; $F_{\text{tabelado}} = 4,67$ ; $F_{\text{calculado}} = 4678,38$ ; Equação 2: $y = 0,21206x - 0,01633$					
Curva 3	Coeficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	-0,02190	0,01100	-0,04568	0,00188	0,06810
Inclinação (b)	0,22148	0,00415	0,21251	0,23044	1,28 x 10 <sup>-16</sup>
$R^2 = 0,9954$ ; $F_{\text{tabelado}} = 4,67$ ; $F_{\text{calculado}} = 2849,51$ ; Equação 3: $y = 0,22148x - 0,02190$					

Através de teste  $F$ , constatou-se que as curvas apresentam inclinações idênticas ( $F_{\text{calculado}} = 2,01$ ;  $F_{0,05(2),39} = 3,24$ ), no entanto observou-se diferença entre as elevações das curvas 2 e 3 ( $F_{\text{calculado}} = 4,95$ ;  $F_{0,05(2),41} = 3,22$ ). A diferença encontrada não é altamente significativa já que  $F_{0,01(2),41} = 5,16$ , no entanto, para fins de cálculo foram levadas em consideração as curvas de 2,0 mL idênticas, originando uma única equação (tabela 5).

Tabela 5. Resultado da análise de regressão linear da curva analítica obtida para o pirogalol, em 760 nm, a partir da comparação das curvas.

Parâmetros	Coefficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	-0,02108	0,00671	-0,03483	-0,00734	0,00395
Inclinação (b)	0,21902	0,00253	0,21383	0,2242	1,47 x 10 <sup>-35</sup>

$R^2 = 0,9963$  ;  $F_{\text{tabelado}} = 4,19$ ;  $F_{\text{calculado}} = 7494,88$  ; Equação 1:  $y = 0,21902x - 0,02108$

A equação representada na tabela 5 foi então comparada com a equação obtida quando da utilização de 1,0 mL de reagente (tabela 6).

Tabela 6. Resultados da análise de regressão linear da curva analítica do pirogalol em 760 nm, com 1,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu

Parâmetros	Coefficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	-0,009911	0,003673	-0,017847	-0,001975	0,018261
Inclinação (b)	0,17915	0,001384	0,176162	0,18214	1,32 x 10 <sup>-21</sup>

$R^2 = 0,9992$  ;  $F_{\text{tabelado}} = 4,67$  ;  $F_{\text{calculado}} = 16745,13$  ; Equação 1:  $y = 0,17915x - 0,00991$

A comparação das curvas obtidas com 2,0 e 1,0 mL, tabelas 5 e 6 respectivamente, evidenciou que a quantidade de reagente influencia significativamente no valor de absorvância obtido. Testando a igualdade dos coeficientes (inclinações) das curvas obteve-se um valor de  $t_{\text{calculado}} = 2,98$  maior do que  $t_{0,05(2), 41} = 2,02$  e maior também do que  $t_{0,01(2), 41} = 2,70$  permitindo afirmar que a diferença entre as inclinações é altamente significativa. Da mesma forma, a análise revelou diferença altamente significativa entre as elevações (plano ocupado em relação ao eixo dos Y) das curvas obtidas: valor de  $t_{\text{calculado}} = 10,76$  e  $t_{0,05(2); 45} = 2,01$  e  $t_{0,01(2); 45} = 2,69$ .

A análise dos resíduos de regressão, realizada pelo teste de Durbin-Watson não detectou auto-correlação, ou seja há independência de cada ponto em relação à resposta, tanto para as equações obtidas com 1,0 e 2,0 mL de reagente:  $dw_{\text{calculado}} = 2,3047$  e  $2,5975$  respectivamente  $> dw_{\text{inferior}} 1,08$  e  $dw_{\text{superior}} 1,36$  ( $n = 15$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

A adição de 2,0 mL de reagente provocou ainda um efeito hiperacrômico (figura 6) e um pequeno deslocamento batocrômico do  $\lambda_{\text{máx}}$  obtidos com 1,0 mL

desse reagente, os quais se mantiveram constantes quando o volume de reagente foi aumentado para 3,0 mL. Dessa forma, o conjunto de resultados justifica a escolha do volume de 2,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Cabe aqui salientar que o volume de 1,0 mL é preconizado no *Método Geral de determinação de taninos* Ph. Eur., 2002) e em monografias específicas de Farmacopéias (DAB, 1998; BP, 2001).

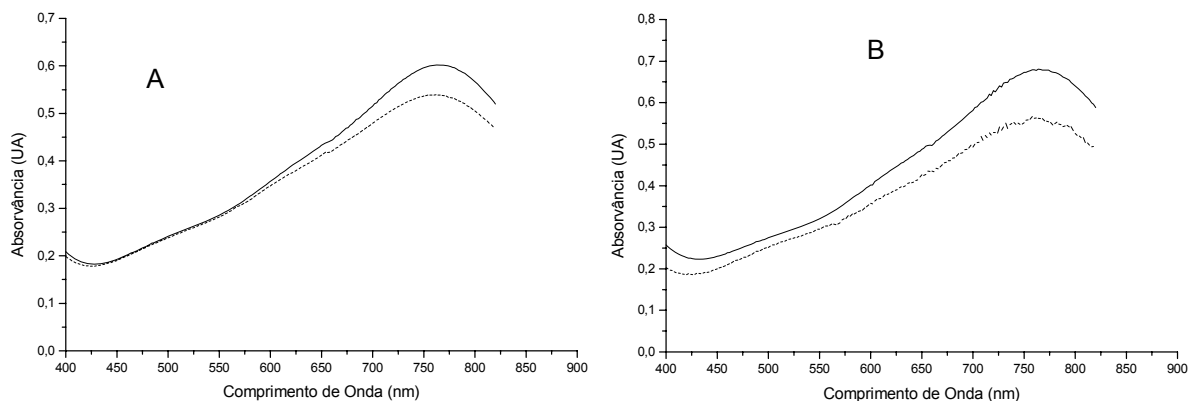


Figura 6. Espectros de absorção na região do visível para a solução extrativa de *Psidium guajava* (A) e solução aquosa de pirogalol a  $3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (B), após adição de 2,0 (—) e 1,0 mL (.....) de reagente de Folin-Ciocalteu.

Dessa forma, o coeficiente de absorção específica ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) do pirogalol, calculado a partir da curva de calibração utilizando 2,0 mL de reagente, foi de 2098,8.

Com o intuito de comparar dois reagentes bastante utilizados na quantificação de polifenóis totais, realizaram-se medidas utilizando também o reagente de Folin-Denis. Para tanto, foram efetuadas leituras em 2 minutos, tempo preconizado em DAB (1986) quando se utiliza o reagente de Folin-Denis, e 30 minutos, tempo preconizado quando da utilização do reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados mostraram que para o Folin-Denis, após um breve período de estabilidade, até o segundo minuto, ocorre um aumento da absorvância. Nesse, a coloração azul translúcida passa paulatinamente para uma azul-opaco, acompanhada de turvação, revelando que o produto de reação formado é instável, o que compromete a veracidade da leitura após o período de 2 minutos (tabela 7).

Tabela 7. Resultados obtidos com a utilização do reagente de Folin-Denis após 2 e 30 minutos da adição de solução de carbonato de sódio (20%), para polifenóis totais (PT) e fração não-tanante (FNT)

	2 min. $\pm$ S	CV %	30 min. $\pm$ S	CV %
PT (UA)	0,4552 $\pm$ 0,0071	1,68	0,5450 $\pm$ 0,029	5,38
FNT (UA)	0,2936 $\pm$ 0,0010	0,36	0,3738 $\pm$ 0,0044	1,18

Nos métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu existem dois fatores que limitam a proporcionalidade da reação. A reação entre fenóis e reagentes não é absolutamente completa. Por esse motivo, costuma-se utilizar um excesso de reagente o que implica na segunda limitação, uma certa absorvância na região espectral do azul acompanhada de turbidez. A origem dos precipitados é atribuída à formação de sais insolúveis de sódio, sobretudo no caso do reagente de Folin-Denis. Devido a isso, a inclusão de sais de lítio no reagente de Folin-Ciocalteu tem a finalidade de deslocar o sódio, minimizando assim essa turbidez (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SCALBERT, 1992). Se aceita geralmente que o reagente de Folin-Ciocalteu possui uma maior sensibilidade, quando comparado ao reagente de Folin-Denis (SCALBERT, 1992).

### 5.6.3 Seleção do tipo e da quantidade de caseína a ser utilizada

Para a determinação do tipo e da quantidade de agente complexante o tempo de complexação foi determinado em 60 minutos, tempo preconizado por Códigos Oficiais como sendo ideal (F. Bras. 1988; DAB, 1998; BP, 2001; Ph. Eur., 2002).

Os resultados de testes preliminares com diferentes tipos de caseína demonstraram a existência de diferenças significativas na capacidade de complexação dessas. De modo geral, pode-se afirmar que a variabilidade experimental está associada ao tipo e quantidade de caseína utilizada, principalmente para a caseína purificada. Para essa caseína, a falta de precisão intermediária foi observada em quantidades próximas a 100,0 mg, inviabilizando a utilização dessa, no prosseguimento do trabalho (figura 7; ANEXO-tabela 2A).

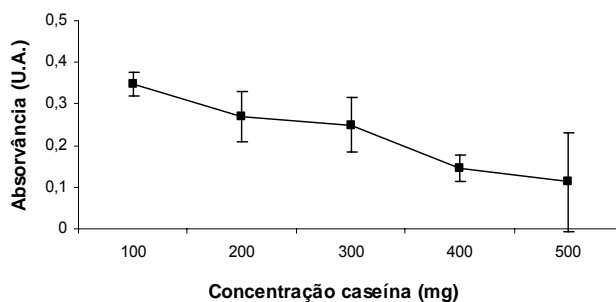


Figura 7. Valores de absorvância da fração residual da solução extrativa de *Psidium guajava* em função da quantidade de caseína purificada.

Em termos de precisão intermediária, os melhores resultados foram obtidos para uma quantidade de, no máximo, 600,0 mg de caseína grau técnico (GT). Para quantidades acima desse valor, foram observados desvios grandes e um decaimento linear da absorvância (figura 8; ANEXO-tabela 3A).

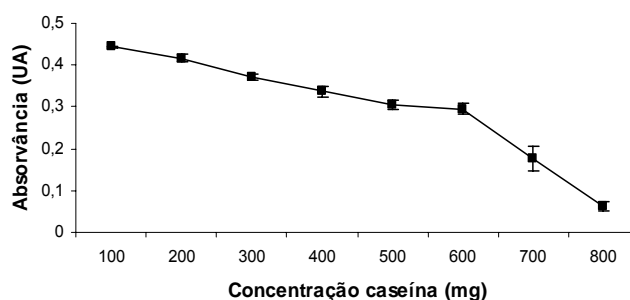


Figura 8. Valores de absorvância da fração residual da solução extrativa de *Psidium guajava* em função da quantidade de caseína GT.

No que concerne à maior capacidade de complexação e aos resultados erráticos decorrentes da dispersão da caseína purificada, alguns trabalhos anteriores permitem explicar tanto um quanto o outro. A defosforilação da caseína, implícita no processo de purificação dessa, afeta negativamente a coesão estrutural e a capacidade de formação de estruturas micelares, originalmente observadas na caseína bruta. Como consequência disso, tanto a superfície reacional quanto a capacidade de complexar taninos aumentam, porém, à custa de um aumento da hidrofobia da superfície (LUCK *et al.*, 1994; JÖBSTL *et al.*, 2004). Em caseínas brutas, as propriedades de superfície são influenciadas pelas  $\kappa$  e  $\alpha_S$ -caseínas presentes na superfície das micelas (LUCK *et al.*, 1994; WALSTRA, 1999). Esta

característica se perde na caseína purificada e, conseqüentemente, ocorre um aumento na hidrofobia superficial que compromete a obtenção de dispersões homogêneas ativas. Face à essas constatações, foi dada a preferência ao uso da caseína GT para a realização dos ensaios posteriores descritos neste trabalho.

Tomando como ponto de partida uma quantidade de 400,0 mg de caseína GT (SOARES, 2002), uma tomada de amostra de 0,5 g de material vegetal, 2,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e leitura em 760 nm, 30 min após adição do reagente, o teor de taninos calculado corresponde a 3,620 g por 100 g de droga vegetal seca (CV = 4,4 %), expressos como pirogalol.

Os experimentos a seguir tiveram como objetivo a validação desse resultado. Os resultados para os testes de repetibilidade e precisão intermediária estão contidos na tabela 8 e encontram-se dentro do limite de 5%, preconizado para matrizes complexas, como drogas vegetais (HEFENDEHL, 1985).

Tabela 8. Resultados obtidos para os parâmetros de validação do método de determinação do teor de taninos totais de *Psidium guajava*

<b>REPRODUTIBILIDADE</b>			
	<b>PT (UA)</b>	<b>FNT (UA)</b>	<b>TT (g %)</b>
Primeiro dia	0,583	0,351	3,481
Segundo dia	0,574	0,334	3,585
Terceiro dia	0,580	0,326	3,793
Média	0,579	0,337	3,620
Desvio padrão	0,005	0,012	0,15901
CV (%)	0,82	3,71	4,39
<b>REPETIBILIDADE</b>			
Média	0,617	0,359	3,84
Desvio padrão	0,004	0,005	0,096
CV (%)	0,65	1,40	2,51

Nota: PT: Polifenóis totais; FNT: Fração não-tanante; TT: Taninos totais; CV %: coeficiente de variação percentual (n=9).

A linearidade na faixa de concentração estudada e a proporcionalidade entre os resultados para polifenóis totais e a fração não-tanante foram avaliadas mediante análise de duas curvas de calibração, uma para polifenóis totais e a outra para a fração não-tanante. Os resultados obtidos através de análise de regressão linear são mostrados na tabela 9.



Tabela 9. Resultados da análise de regressão linear das curvas analíticas obtidas para polifenóis totais (PT) e fração não-tanante (FNT) com o reagente de Folin-Ciocalteu

<b>Polifenóis totais (PT)</b>					
Parâmetros	Coeficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	0,02072	0,00972	0,00658	0,04781	0,01291
Inclinação (b)	0,01552	0,00026	0,01496	0,01607	3,96 X 10 <sup>-20</sup>
$R^2 = 0,9954$ ; $F_{\text{tabelado}} = 4,49$ ; $F_{\text{calculado}} = 3460,78$ ; Equação 1: $y = 0,01552x + 0,02072$					
<b>Fração não-tanante (FNT)</b>					
Parâmetros	Coeficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	-0,14030	0,01339	-0,16869	-0,11191	1,43 x 10 <sup>-8</sup>
Inclinação (b)	0,01294	0,00036	0,01217	0,01371	1,14 x 10 <sup>-16</sup>
$R^2 = 0,9875$ ; $F_{\text{tabelado}} = 4,49$ ; $F_{\text{calculado}} = 1268,70$ ; Equação 2: $y = 0,01294x - 0,14030$					

A curva de calibração obtida para PT apresentou pequeno desvio de linearidade ( $R^2 = 0,9954$ ) enquanto para FNT, obteve-se um desvio maior:  $R^2 = 0,9875$ . Avaliou-se ainda a correlação existente entre as absorvâncias obtidas na curva dos polifenóis totais em relação às da fração não-tanante. Obteve-se um  $r = 0,9862$ , indicando correlação entre os valores de absorvância dos PT e FNT. Valores satisfatórios de correlação entre PT e FNT, e o desvio da linearidade foram observados também por MARTINS (1998) para *Maytenus ilicifolia*. Nesse caso, o esgotamento prematuro do reagente de Folin-Ciocalteu para as concentrações mais elevadas da solução extrativa pode estar relacionado com o comprometimento da linearidade.

Cabe aqui destacar que o teor de taninos, calculado utilizando 400,0 mg de caseína, diferiu sensivelmente do teor de 7,641 g/100 g (CV % 1,18), calculado quando a mesma amostra foi analisada conforme a metodologia da Farmacopéia Européia (Ph. Eur., 2002), que preconiza o uso de 100,0 mg de pó-de-pele. Mais ainda, foi possível demonstrar que a utilização de 100,0 mg de pó-de-pele levou a um esgotamento quase total dos polifenóis do meio reacional, resultando em uma fração não-tanante próxima de zero ( $0,094 \pm 0,003$  U.A.). Isso sugere fortemente

que existe uma falta de especificidade no método oficial, pelo menos no caso específico de *Psidium guajava*.

Uma vez que o método baseado na complexação com caseína parte de princípios químicos e físico-químicos semelhantes aos encontrados na complexação com pó-de-pele, nesta segunda parte do trabalho se deu ênfase ao estudo da especificidade de ambos os métodos.

#### 5.6.4 Estudos da especificidade da caseína e do pó-de-pele ao reagir com taninos

A análise por UV da fração não-tanante mostrou que o grau de retirada dos polifenóis do meio com 100,0 mg de pó-de-pele foi comparável àquele obtido com 800,0 mg de caseína GT ou 500,0 mg caseína purificada (figuras 7 e 8).

Para a caseína GT, observou-se também uma zona de relativa estabilização da absorvância na faixa de 400,0 a 600,0 mg de caseína (figura 8). Acima desses valores, a absorvância começa a diminuir e a variabilidade experimental a aumentar. Inicialmente, esse comportamento foi interpretado como sendo o resultado de reações diferentes, sendo a primeira etapa de abaixamento da absorvância atribuída a uma reação (complexação) preferencial dos taninos, frente à presença de outros polifenóis. Seguindo esse mesmo pressuposto, o abaixamento posterior da absorvância, observado com quantidades maiores de caseína GT (700,0 e 800,0 mg) seria resultado da complexação de outros polifenóis presentes na solução extrativa.

Para comprovação dessa hipótese adicionou-se rutina à solução extrativa e procederam-se análises com 400,0 e 600,0 mg de caseína. Cabe aqui acrescentar que a rutina foi selecionada como flavonóide modelo por ser de ampla distribuição no reino vegetal. Por si só, a adição de rutina resultou num aumento de 0,139 U.A. na absorvância. Esse aumento foi reduzido para 0,100 U.A., quando utilizados 400,0 mg de caseína GT. Com 600,0 mg de caseína esse aumento na absorvância desapareceu completamente, permitindo inferir que, com a utilização de 600,0 mg de caseína GT, já teria ocorrido uma retirada do meio reacional da rutina (ANEXO-tabela 4A).

Uma segunda forma de verificar a complexação concomitante dos flavonóides por parte da caseína foi utilizar a técnica de CLAE-PDA. Como ponto referencial foram obtidos os cromatogramas do ácido gálico, pirogálico, catequina e rutina e os respectivos espectros no ultravioleta por PDA (figuras 9 e 10).

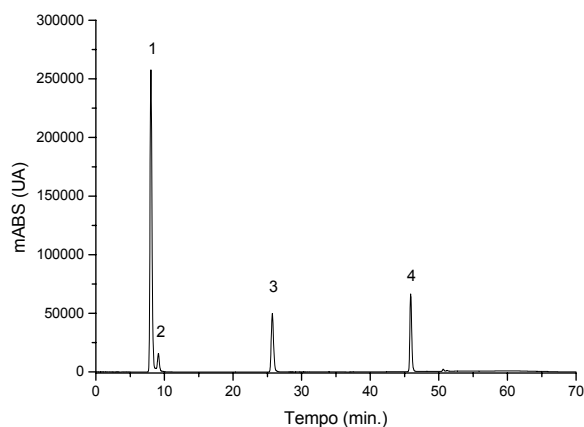


Figura 9. Cromatogramas obtidos para (1) ácido gálico, (2) pirogálico, (3) catequina e (4) rutina. Detecção em 280 nm.

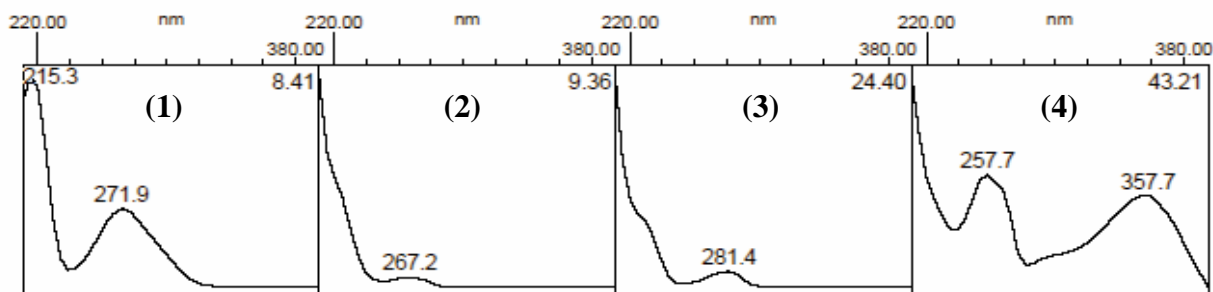


Figura 10. Espectros no UV do (1) ácido gálico, (2) pirogálico, (3) catequina e (4) rutina, obtidos a partir do cromatograma da figura 9.

A presença dessas substâncias no cromatograma por CLAE da solução extrativa foi analisada e os espectros no UV, relativos a picos de igual tempo de retenção, são mostrados nas figuras 11 e 12.

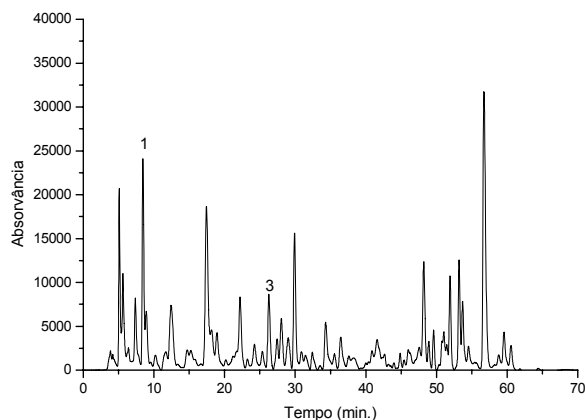


Figura 11. Cromatograma obtido para a solução extrativa de *Psidium guajava*. Detecção em 280 nm. 1 - ácido gálico; 3 - catequina.

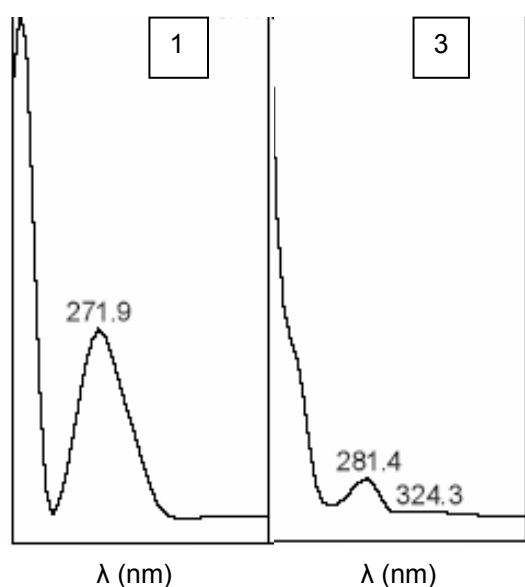


Figura 12. Espectros no UV obtidos do cromatograma da figura 11: 1 - ácido gálico; 3 - catequina. Detecção em 280 nm.

A comparação dos cromatogramas e espectros no UV, contidos nas figuras 9 a 12, permite concluir que o ácido gálico e catequina estão presentes na solução extrativa de *Psidium guajava*. A presença de pirogalol (substância 2 – figura 9) e rutina (substância 4 – figura 9) não pôde ser confirmada de forma unívoca.

A presença de ácido gálico e catequina em *Psidium guajava* é relatada na literatura (WHO, 1998; KONDO *et al.*, 2005), além de epicatequina (KONDO *et al.*, 2005), ácido elágico (WHO, 1998; LANS *et al.*, 2000) e outros taninos (WHO, 1998; GONÇALVES *et al.*, 2005; OH *et al.*, 2005).

Alterando o comprimento de onda de detecção para 352 nm foi possível uma melhor detecção da fração flavonoídica presente na solução extrativa (Figuras 13 e 14).

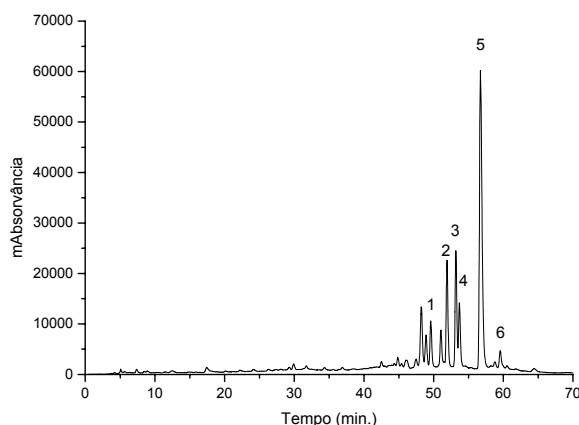


Figura 13. Cromatograma obtido para a solução extrativa de *Psidium guajava*.  
Detecção em 352 nm.

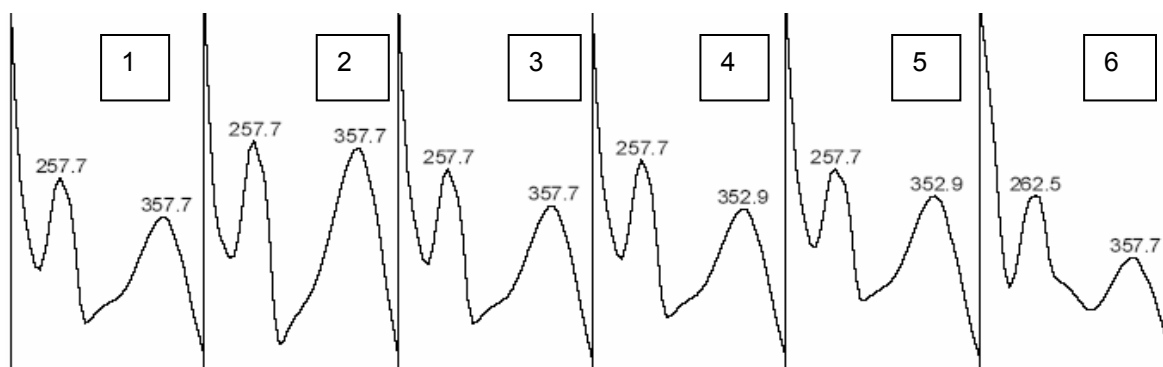


Figura 14. Espectros no UV obtidos para os picos 1,2,3,4,5 e 6 da figura 13.

A julgar pelos tempos de retenção e pelas duas bandas de absorção máximas em torno de 257 e 357 nm, com um submáximo próximo de 300 nm nos picos 1 a 5 (figuras 13 e 14), os espectros de UV identificam estruturas com dois cromóforos aromáticos conjugados típicos de flavonóis e sobreponíveis aos observados para derivados da quercetina, como a rutina (figura 10 sub-item 4). Diferentemente, o pico 6 apresenta máximos e submáximos de absorção diferentes (262,5, 357,7 nm e aprox. 295 nm), contudo, mantendo um perfil de absorção próprio de flavonóide (HARBORNE *et al.*, 1975).

A presença de flavonóides como a quercetina e seus derivados glicosilados como 3-L-4-arabinofuranosídeo (avicularina) e 3-L-4-piranosídeo têm sido amplamente relatada na literatura para *Psidium guajava* (JAIARJ *et al.*, 1999; LANS *et al.*, 2000; LOZOYA *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2005; KONDO *et al.*, 2005; LAPCÍK *et al.*, 2005; OH *et al.*, 2005). Alguns autores mencionam a predominância do derivado da quercetina 3-O-beta glicosídeo (LOZOYA *et al.*, 2002). No entanto, existem relatos da predominância de miricetina e apigenina em *Psidium guajava* (MANOSROI *et al.*, 2005)<sup>1</sup>. Também é mencionada a presença de ácido clorogênico (KONDO *et al.*, 2005).

Isoflavonas também têm sido detectadas em *Psidium guajava* por CLAE e espectrometria de massa, tais como daidzeína, glicitina, genisteína, prunetina e formononetina (LAPCIK *et al.*, 2005).

A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE-PDA mostra claramente que há alterações na composição da solução extrativa, quando da utilização de 400,0 mg de caseína, independente se a detecção é feita em 280 ou 352 nm (Figura 15, A e B). Contudo, cabe aqui observar que, por uma necessidade analítica, as concentrações das amostras analisadas por CLAE foram quatro vezes maiores do que as analisadas por UV.

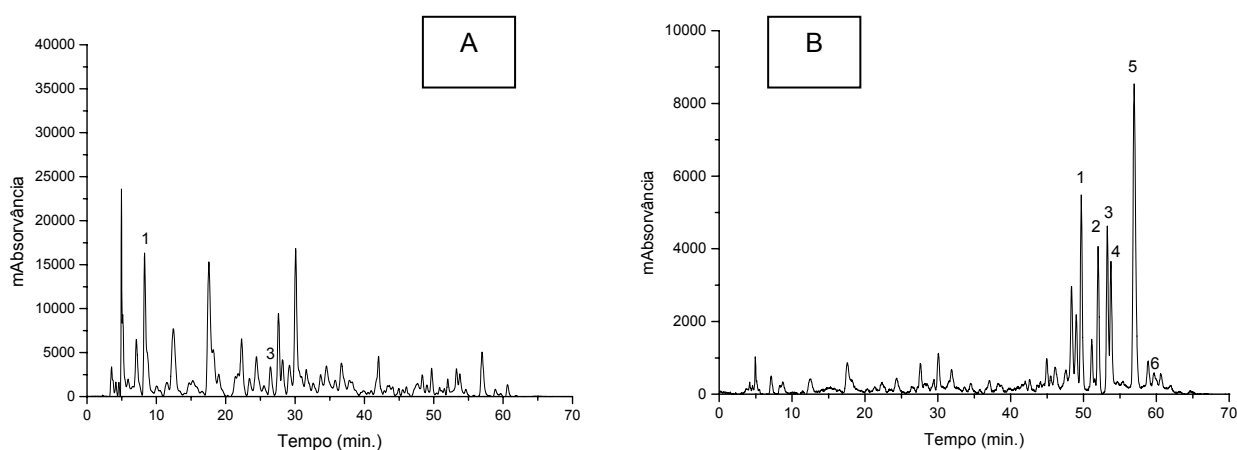


Figura 15. Cromatogramas da solução extrativa, obtidos após tratamento com 400,0 mg de caseína. A: detecção em 280 nm; B: detecção em 352 nm.

<sup>1</sup> MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letters**, *in press*, 2005.

Para restabelecer a mesma proporção droga vegetal: caseína utilizada no método espectrofotométrico, a quantidade de caseína foi aumentada em quatro vezes, para 1600,0 mg (Figura 16, A e B).

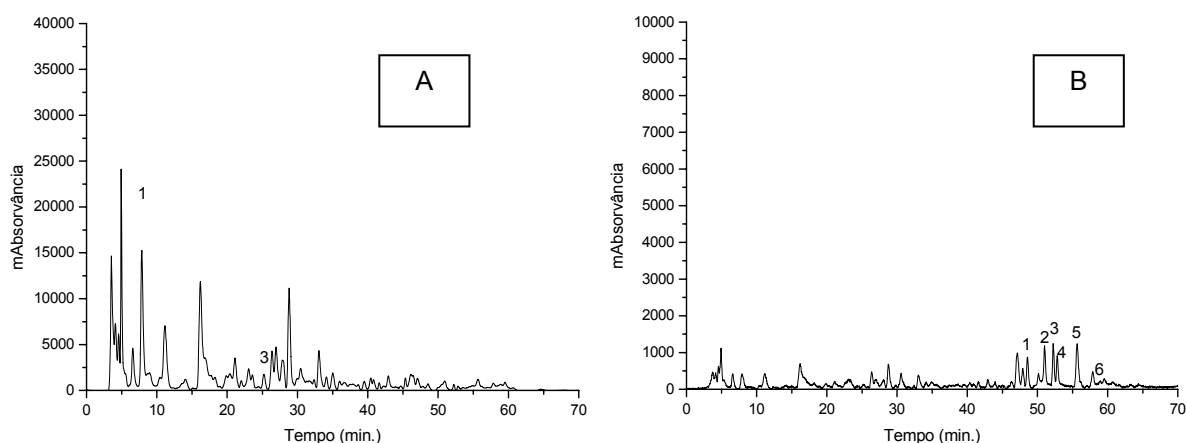


Figura 16. Cromatogramas da solução extrativa, obtidos após tratamento com 1600 mg de caseína. A: detecção em 280 nm; B: detecção em 352 nm.

Face a essa consideração, após a adição de 1600,0 mg de caseína ficaram claramente evidentes as alterações ocorridas na composição da solução extrativa, quando essa foi analisada em 280 nm, comprimento de onda em que catequina e ácido gálico são detectáveis. Mais ainda, a composição da solução extrativa mostrou-se nitidamente alterada em 352 nm, um comprimento de onda no qual rutina e flavonóides afins absorvem, mas não ácido gálico e catequina.

Para fins de comparação, foi realizada uma análise semelhante com 100,0 mg de pó-de-pele, nas mesmas condições experimentais que a caseína (Figura 17 A e B).

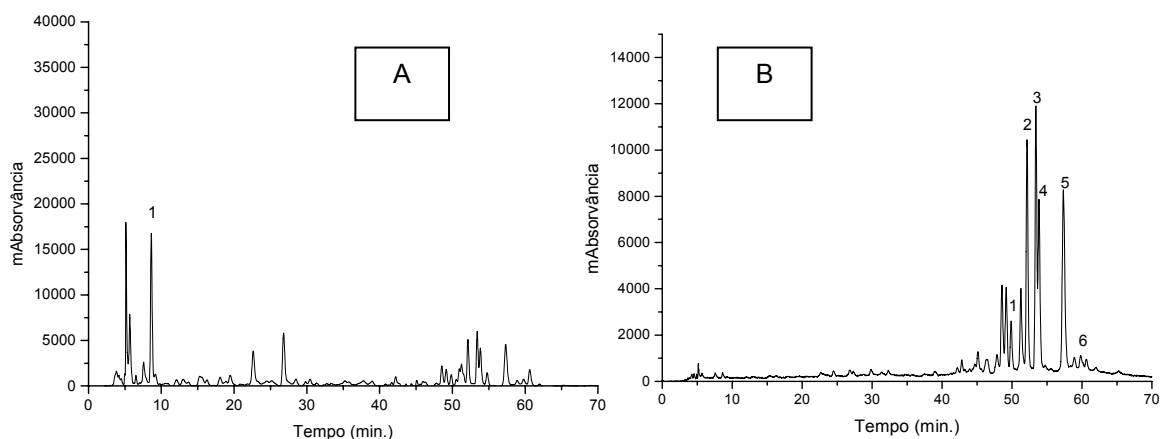


Figura 17. Cromatogramas da solução extrativa, obtidos após tratamento com 100,0 mg de pó-de-pele. A: detecção em 280 nm; B: detecção em 352 nm.

Pode-se verificar que as análises por CLAE-PDA confirmam os resultados obtidos por ultravioleta para a solução extrativa de *Psidium guajava*, ou seja, tanto o pó-de-pele quanto a caseína são capazes de complexar os flavonóides do meio, fato que compromete a especificidade de ambos os métodos (Tabela 10; ANEXO-tabela 5A). Contudo, merece especial atenção o fato da eficiência de retirada dos flavonóides ser mais acentuada com caseína do que com 100,0 mg de pó-de-pele, o que não condiz plenamente com o observado no método espectrofotométrico.

Aparentemente esses resultados contradizem o observado por LIAO e colaboradores (2003) que afirmam que as fibras de colágeno (pó-de-pele) são seletivas para a remoção de taninos. Os autores realizaram experimentos utilizando as isoflavonas daidzeína, genisteína e o flavonóide baicaleína e demonstraram que a afinidade do pó-de-pele por essas substâncias é muito menor do que a observada para o ácido tânico. Considerando que a complexação de polifenóis utilizando pó-de-pele e PVPP é semelhante (MAKKAR *et al.*, 1995; SIEBERT, 1999) a baixa afinidade da PVPP por isoflavonas foi relatada anteriormente por DONNER e colaboradores (1993), que demonstraram que a afinidade está relacionada com a estrutura dos flavonóides.

Os resultados por CLAE-PDA permitem também estabelecer diferenças quanto à afinidade para complexação. Especificamente, o ácido gálico não foi complexado na mesma intensidade pela caseína e pelo pó-de-pele, se comparado com as outras substâncias de referência estudadas neste trabalho. A análise dos dados indicou que tanto caseína, quanto pó-de-pele, têm uma afinidade maior por



catequina e flavonóides do que por ácido gálico (Figuras 11-17). Isso, de certa forma, levanta questionamentos sobre o uso do ácido gálico como substância de referência na quantificação de taninos.

Tabela 10. Percentual de ácido gálico, catequina e flavonóides de *Psidium guajava* complexados com diferentes quantidades de caseína e pó-de-pele. Detecção em 280 nm (ácido gálico e catequina) e 352 nm (flavonóides).

Detecção	280 nm		352 nm					
	AG CV %	CAT CV%	Pico 1 CV%	Pico 2 CV%	Pico 3 CV%	Pico 4 CV%	Pico 5 CV%	Pico 6 CV%
SE + 100 mg de caseína	16,08 6,29	32,75 7,49	31,13 0,86	58,62 1,26	57,73 0,34	51,79 0,90	55,02 0,32	67,06 0,46
SE + 400 mg de caseína	30,66 0,47	63,16 1,69	54,87 1,56	85,66 3,86	84,65 0,55	79,54 1,34	88,69 0,38	95,80 5,10
SE + 800 mg de caseína	34,55 2,07	82,47 9,16	94,84 5,36	93,05 6,23	93,17 2,63	91,41 2,16	96,06 3,18	90,45 2,64
SE + 1600 mg de caseína	48,38 3,84	75,66 2,63	92,62 4,30	96,92 4,48	96,31 3,70	95,61 4,67	98,56 6,26	100
SE + 50 mg de pó-de-pele	50,60 2,09	61,11 1,04	72,41 1,74	58,97 1,16	55,16 0,61	50,64 2,71	81,01 0,95	79,67 1,70
SE + 100 mg de pó-de-pele	60,41 3,26	60,01 5,05	81,64 1,40	63,96 1,85	60,98 0,42	55,66 2,50	89,25 0,81	89,37 5,64

Nota: AG: ácido gálico; CAT: catequina; SE: solução extrativa; CV %: coeficiente de variação percentual (n = 3).

O tema certamente merece ainda estudos complementares, uma vez que os resultados relatados por SOARES (2002) contradizem em parte aqueles observados para a rutina e outros flavonóides presentes na solução extrativa de folhas de *Psidium guajava*. Segundo esse autor, a presença expressiva de caseína parece não afetar algum tipo de flavonóide, o que obriga certamente a restringir qualquer conclusão de caráter geral sobre a capacidade irrestrita da caseína e do pó-de-pele de complexarem, de forma inespecífica, qualquer flavonóide na presença de taninos.

## 5.7 Caracterização físico-química dos complexos PVPP-substância de referência

### 5.7.1 Avaliação do perfil de complexação das diferentes PVPP

Os derivados de PVPP, avaliados como agentes complexantes nesse trabalho, são amplamente utilizados pela indústria. O Kollidon® CL é utilizado para favorecer o processo de dissolução de fármacos, influenciando assim a biodisponibilidade destes (KOLLIDON, 2001). Derivados como Divergan® F e Divergan® RS encontram aplicação na indústria de bebidas, para a retirada de polifenóis no processo de clarificação (BASF, 2001). A PVPP-P6755 (Sigma) por sua vez é preconizada pela FAO (2000) como agente complexante para a remoção de taninos de extratos vegetais. Com o intuito de identificar o polímero com as melhores características de complexação frente ao extrato de *Psidium guajava* e frente à substâncias de referência amplamente utilizadas na quantificação de taninos, foram realizadas as análises subseqüentes.

A capacidade de formação de complexos das diferentes PVPP foi avaliada mediante o tratamento das substâncias ácido gálico, ácido tânico, pirogalol e catequina com os polímeros: Divergan® F; Divergan® RS; Kollidon® CL; PVPP-P 6755 – Sigma. Os resultados obtidos estão representados na figura 18 e ANEXO-tabela 6A.

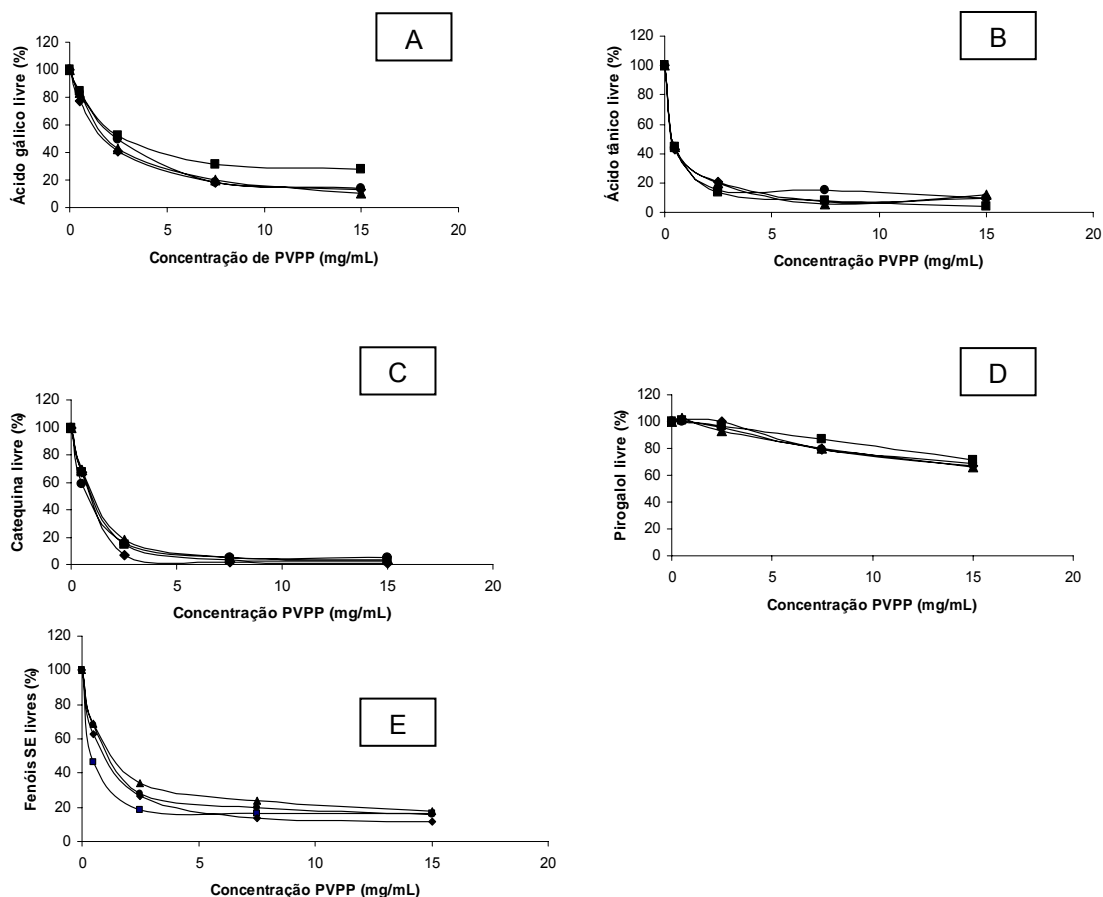


Figura 18. Complexação de ácido gálico (A), ácido tânico (B), catequina (C), pirogalol (D) e solução extrativa (E) com as diferentes PVPP. PVPP-P6755 Sigma (■); Kollidon® CL (▲); Divergan® F (◆); Divergan®RS (●).

A julgar pelas curvas de complexação, fica evidente a maior afinidade do ácido tânico e da catequina pelas PVPP testadas. Essas substâncias se complexaram com os diferentes PVPP com maior intensidade, quando comparados ao ácido gálico e pirogalol (figura 18).

Este fato parece estar relacionado com algumas peculiaridades nas estruturas químicas das substâncias de referência. A complexação de polifenóis, em geral, com derivados da PVPP, por exemplo, estaria relacionada com o aumento no número de grupamentos hidroxila, uma vez que isso favorece a formação mais intensa de associação por ligações de hidrogênio (DONNER *et al.*, 1993). Isso explica a maior afinidade dos polímeros pelo ácido tânico, uma estrutura polimérica constituída por

unidades de ácido gálico, com numerosos grupamentos hidroxila disponíveis para a formação de ligações de hidrogênio (FRÖMMING *et al.*, 1981; HORN; DITTER, 1982). Por sua vez, ácido gálico apresentou uma menor afinidade por derivados da PVPP quando comparado ao ácido tânico. Porém apresentou afinidade maior, se comparada à do pirogalol. O elemento diferencial neste caso parece ser a presença do grupamento carboxílico. HORN e DITTER (1982), ao estudar as interações entre PVPP e vários fármacos, verificaram que os grupos carboxila foram mais efetivos do que os hidroxila na complexação com PVPP. A catequina apresenta maior número de grupamentos hidroxila (nas posições, 3,5,7,3' e 4') quando comparada ao ácido gálico e pirogalol (cada molécula apresenta três grupamentos hidroxila) proporcionando maior capacidade de complexação. No entanto, a maior capacidade de complexação da catequina com PVPP, em relação ao ácido gálico e pirogalol, não pode ser atribuída somente ao maior número de grupamentos hidroxila, certamente a massa molecular da catequina, bem como sua conformação estrutural proporcionam uma maior afinidade por PVPP.

SIEBERT e colaboradores (1996a) investigando a afinidade da gelatina por ácido tânico e catequina evidenciaram uma maior formação de precipitados com o ácido tânico e atribuíram o fato à diferenças como o tamanho do polifenol e a densidade dos grupamentos hidroxila do ácido tânico, quando comparado com a catequina.

FICKEL e colaboradores (1999) estudando a complexação de ácido tânico, ácido gálico e catequina à tripsina (proteína rica em prolina) observaram que somente o ácido tânico foi capaz de precipitar a proteína, reforçando a importância das diferenças estruturais dos polifenóis para a complexação e precipitação.

Analisando o comportamento dos diferentes derivados de PVPP, verificou-se uma semelhança de comportamento dos mesmos frente ao ácido tânico, catequina e pirogalol. Em contrapartida, o ácido gálico, apresentou uma menor afinidade por PVPP-P6755 (Sigma), quando comparada às demais PVPP. Por outro lado, ao analisar o comportamento da solução extrativa de *Psidium guajava* frente ao tratamento com as diferentes PVPP, evidenciou-se uma retirada maior de fenóis por parte da PVPP-P6755 (Sigma). Esse fato e o precedente uso desse polímero pela FAO (2000), levaram a selecioná-lo como agente complexante para as análises

subseqüentes. Sempre que referindo-se a esse polímero em especial será utilizada a denominação PVPP-P6755.

### 5.7.2 Avaliação da complexação entre substâncias de referência e PVPP-P6755 através de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As complexações do ácido gálico, ácido tânico, pirogalol e catequina com a PVPP-P6755 selecionada também foram investigadas na forma de misturas físicas em proporções 1:1, 1:5 e 1:10, respectivamente. A proporção 1:1 é geralmente utilizada, a fim de maximizar as interações (WELLS, 1988; ANDO; RADEBAUGH, 2000), já a proporção 1:5 correspondeu àquela utilizada nos ensaios de complexação com as substâncias de referência. A partir dos resultados obtidos optou-se também pela realização de análises em proporção 1:10 (substância de referência: PVPP-P6755). Não foram realizados outros ensaios com proporções além do limite 1:10, dado o total desaparecimento dos picos característicos das substâncias de referência.

Para possibilitar um melhor entendimento dos dados obtidos por DSC, cabe a explicação de que a temperatura de *onset* ( $T_{onset}$ ) corresponde à temperatura na qual a transição começa a acontecer, quando ocorre a primeira variação da linha de base. A temperatura máxima ( $T_{máx.}$ ) é a que corresponde a temperatura medida no ápice do evento endotérmico ou exotérmico e o valor de  $\Delta H$  corresponde à entalpia envolvida no evento térmico, sendo proporcional à área do pico obtido (COSTA, 2005).

Para a análise dos termogramas, inicialmente foram considerados os comportamentos isolados. Para o ácido gálico, foram observados dois picos endotérmicos: em 68,13 e 263,99 °C. O primeiro está relacionado com a perda da água de cristalização; o segundo com a fusão do ácido gálico, cuja temperatura de *onset* (tabela 11) coincide com o valor citado na literatura (BUDAVARI, 1996), antes já comentando no item 5.4.3. Em relação à PVPP-P6755, observam-se dois fenômenos, a perda da água de adsorção e o fenômeno de transição vítrea, característico de algumas substâncias poliméricas (tabela 11). Os resultados estão de acordo com os valores relatados na literatura para a PVPP, que admitem como

faixa de transição vítrea temperaturas entre 90 e 185 °C, variando de acordo com a massa molecular (KOLLIDON, 2001).

Analisando-se os termogramas realizados para as misturas de ácido gálico e PVPP-P6755 (figura 19), notam-se alterações importantes em relação aos termogramas das substâncias isoladas, indicando algum tipo de interação ou complexação. Na mistura 1:1 de ambas substâncias, verifica-se uma leve inflexão, originada pela água de adsorção do polímero, e um pico endotérmico característico da água de cristalização do ácido gálico, indicando que esta é mantida. Observa-se ainda que o pico endotérmico da fusão do ácido gálico, encontra-se deslocado e não apresenta mais o formato característico (figura 19). Os termogramas das misturas 1:5 e 1:10 de ácido gálico e PVPP-P6755 foram semelhantes e observou-se o completo desaparecimento da endoterma de fusão do ácido gálico. No entanto, os fenômenos referentes à água de cristalização (do ácido gálico) e água de adsorção (da PVPP-P6755) ainda se fizeram presentes. Os parâmetros térmicos estão listados na tabela 5.

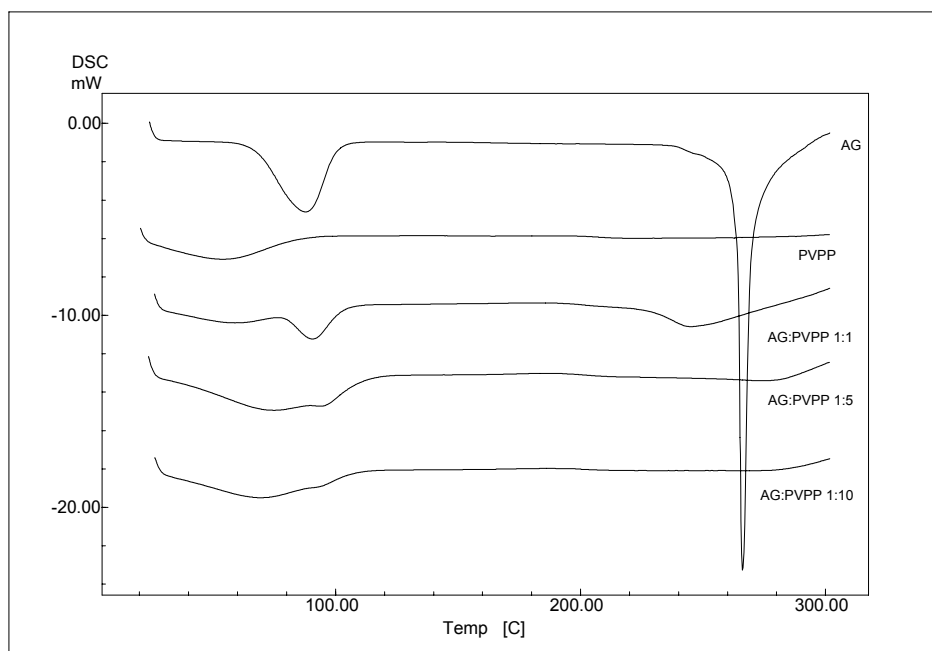


Figura 19. Termogramas obtidos por DSC para o ácido gálico (AG) e PVPP-P6755, assim como para suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5 e 1:10.

Tabela 11. Comparação entre os parâmetros térmicos observados para o ácido gálico (AG) e a PVPP-P6755 e da mistura na proporção ponderal 1:1, 1:5, 1:10.

Amostra (massa; mg)	Eventos											
	Endotérmico			Endotérmico			Endotérmico			Transição vítrea		
	$T_{onset}$ (°C)	$T_{máx.}$ (°C)	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )	$T_{onset}$ (°C)	$T_{máx.}$ (°C)	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )	$T_{onset}$ (°C)	$T_{máx.}$ (°C)	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )	$T_{onset}$ (°C)	$T_{med.}$ (°C)	Trans. (J g <sup>-1</sup> )
AG (1,3)	68,13	87,68	310,95	263,99	266,06	557,96						
PVPP (1,3)							22,31	53,61	215,12	198,79	206,56	0,08
1:1 (1,6)	80,19	90,54	57,88	230,56	244,91	111,99	28,50	58,83	41,98			
1:5 (1,7)							26,04	74,94	382,99	197,70	202,67	0,06
1:10 (1,1)							29,17	69,15	374,54	196,78	204,36	0,09

O termograma obtido para o pirogalol apresentou dois eventos endotérmicos, o primeiro com um baixo valor de  $\Delta H$ , em 75,20 °C, e o segundo referente à fusão do pirogalol, que ocorre em 131,82 °C. Para verificação do fenômeno representado pelo primeiro pico endotérmico foram realizados dois aquecimentos. Primeiramente, realizou-se aquecimento até temperatura de 90 °C, resfriou-se para atingir temperatura ambiente e novamente procedeu-se aquecimento até temperatura de 200 °C. Observou-se que o pico referente ao primeiro efeito endotérmico não se fez presente no segundo aquecimento, indicando que pode estar relacionado à presença de algum tipo de impureza, que se volatiliza ou decompõe durante o primeiro aquecimento. No segundo efeito endotérmico relativo à fusão do pirogalol, a temperatura de *onset* encontra-se de acordo com o relatado na literatura (BUDAVARI, 1996). A comparação das curvas de aquecimento do pirogalol e da PVPP-P6755 em diferentes proporções, está demonstrada na figura 20 e seus parâmetros térmicos contidos na tabela 12.

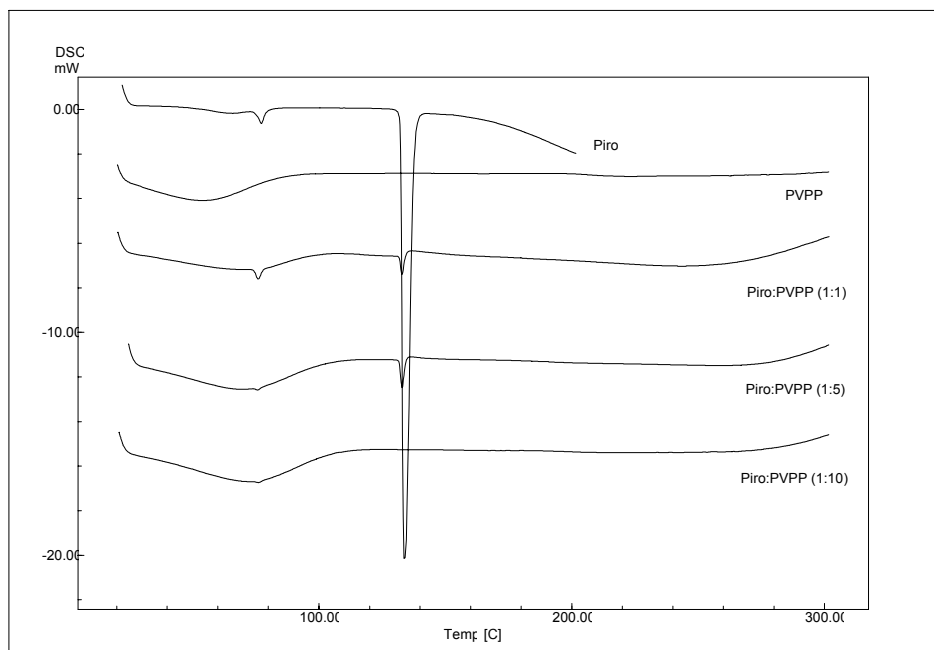


Figura 20. Termogramas obtidos por DSC para o pirogalol (Piro) e PVPP-P6755 (PVPP), assim como para suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5 e 1:10.

Tabela 12. Comparação entre os parâmetros térmicos observados para o pirogalol (Piro) e PVPP-P6755 (PVPP) e suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5, 1:10

Amostra (massa; mg)	Eventos											
	Endotérmico			Endotérmico			Endotérmico			Transição vítrea		
	$T_{onset}$ (°C)	$T_{máx.}$ (°C)	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )	$T_{onset}$ (°C)	$T_{máx.}$ (°C)	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )	$T_{onset}$ (°C)	$T_{máx.}$ (°C)	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )	$T_{onset}$ (°C)	$T_{med.}$ (°C)	Trans. (J g <sup>-1</sup> )
Piro (1,3)	75,20	77,26	7,98	132,28	133,72	273,78						
PVPP (1,3)							22,31	53,61	215,12	198,79	206,56	0,08
1:1 (1,2)	74,37	76,06	5,55	131,82	132,86	9,64				206,81	236,29	0,13
1:5 (1,5)	27,64	75,77	225,66*	131,80	132,91	9,73				190,67	212,26	0,11
1:10 (1,4)	63,74	75,98	256,86*			-				195,44	196,34	0,06

Nota: \* representam o primeiro fenômeno endotérmico do pirogalol e a perda de água da PVPP-P6755.



A análise dos termogramas evidencia uma diminuição do pico de fusão do pirogalol e uma leve redução na temperatura de *onset* na mistura 1:1, o que sugere a ocorrência de interação ou complexação entre esse e a PVPP-P6755. Também foi observada uma leve inflexão associada à perda de água de adsorção do polímero. O termograma para a mistura de pirogalol e PVPP-P6755 na proporção 1:5 foi bastante semelhante ao observado para a proporção 1:1 desses. Porém, deve-se levar em consideração a diminuição do sinal endotérmico relativo à água de cristalização do pirogalol que é observada na análise da mistura com proporção 1:5, podendo indicar uma maior interação nessa proporção.

A julgar pelos termogramas obtidos para as proporções de pirogalol:PVPP 1:1 e 1:5, poder-se-ia, equivocadamente, considerar uma maior interação na proporção 1:1 devido à maior redução na intensidade do pico. No entanto, deve-se levar em consideração a massa de amostra utilizada nas análises. Na mistura com proporção 1:5 utilizou-se 1,5 mg, massa maior, quando comparada à utilizada na proporção 1:1 (1,3 mg). Os valores semelhantes de  $\Delta H$  (em  $J g^{-1}$ ) obtidos para a fusão do pirogalol nas proporções citadas confirmam o fato de a interação entre pirogalol e PVPP-P6755 ser semelhante nas proporções 1:1 e 1:5 (tabela 12). Analisando a mistura de pirogalol: PVPP-P6755 na proporção 1:10 verifica-se o total desaparecimento do pico relativo à fusão do pirogalol e o quase desaparecimento do pico relativo à água de cristalização.

Comparando os resultados obtidos para as misturas em diferentes proporções de ácido gálico e pirogalol com PVPP-P6755 verifica-se a existência de uma interação mais forte entre ácido gálico e PVPP-P6755 quando comparada à que se observa para o pirogalol e o polímero. Isso fica evidente quando se comparam as curvas obtidas para as misturas nas proporções 1:1 e 1:5. Na mistura de proporção 1:1 (ácido gálico: PVPP-P6755), o pico de fusão característico do ácido gálico já sofreu modificações de forma e alteração na temperatura de *onset*. Quando se analisa o pirogalol, verifica-se a presença do pico de fusão dessa substância mesmo para mistura em proporção 1:5, indicando interação menos acentuada. Esses resultados assemelham-se aos obtidos por ultravioleta (figura 18) quando se realizaram as complexações de pirogalol e ácido gálico com PVPP-P6755 em meio líquido.

Para a catequina foram observados três efeitos endotérmicos (figura 21). O primeiro associado à perda de água de cristalização, fato esse comprovado pela realização de dois aquecimentos subseqüentes. No mesmo termograma, imediatamente antes do segundo efeito endotérmico, observou-se uma alteração na linha de base, que pode estar relacionada a uma transição sólido-sólido da catequina. O terceiro pico endotérmico, está relacionado com a fusão da catequina, onde a temperatura de *onset* corresponde à faixa de 175 a 177 °C relatada na literatura (BUDAVARI, 1996). Os termogramas por DSC para as misturas de catequina e PVPP-P6755, assim como os obtidos para as substâncias isoladas, encontram-se na figura 21. Os parâmetros térmicos encontram-se na tabela 13.

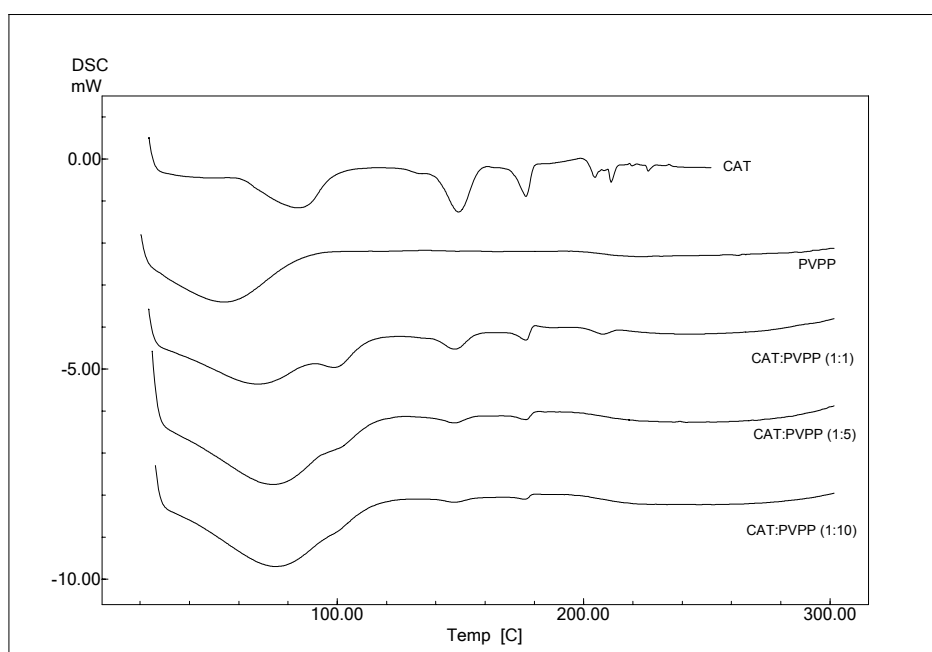


Figura 21. Termogramas obtidos por DSC para a catequina (CAT) e PVPP-P6755 (PVPP) assim como para suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5 e 1:10.

Analisando-se os termogramas obtidos para as misturas em diferentes proporções, verificou-se que os eventos característicos da catequina e da PVPP-P6755 foram mantidos ainda na proporção 1:1, indicando a existência de interação, ainda que em pequena intensidade. Assim, pode-se constatar que o processo endotérmico referente à perda da água de cristalização, por exemplo, foi deslocado para temperaturas um pouco mais elevadas. Para as proporções 1:5 e 1:10 os sinais

referentes a todos os eventos endotérmicos ainda permanecem reconhecíveis, no entanto, em intensidades menores quando comparados à mistura em proporção 1:1.

De modo abrangente, ao comparar os resultados obtidos para a catequina, pirogalol e ácido gálico, a interação da PVPP-P6755 com ácido gálico foi a maior de todas, o que não condiz com o observado na análise por ultravioleta, onde a catequina apresentou uma maior complexação com PVPP-P6755, em detrimento do pirogalol e ácido gálico. Isso reforça a negação de uma equivalência nos comportamentos entre misturas líquidas e sólidas de substâncias, prevalecendo a cautela na transposição de resultados obtidos por métodos calorimétricos em meio sólido e métodos espectrofotométricos em meio líquido.

Tabela 13. Comparação entre os parâmetros térmicos observados para a catequina (CAT) e PVPP-P6755 (PVPP) e suas misturas nas proporções ponderais 1:1, 1:5, 1:10.

Amostra (massa; mg)	Eventos														
	Endotérmico			Endotérmico			Endotérmico			Endotérmico			Transição vítrea		
	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>máx.</sub> (°C)	ΔH (J g <sup>-1</sup> )	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>máx.</sub> (°C)	ΔH (J g <sup>-1</sup> )	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>máx.</sub> (°C)	ΔH (J g <sup>-1</sup> )	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>máx.</sub> (°C)	ΔH (J g <sup>-1</sup> )	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>med.</sub> (°C)	Trans. (J g <sup>-1</sup> )
CAT (1,7)	61,63	84,01	73,03	140,48	149,26	37,71	171,28	176,59	13,62						
PVPP (1,3)										22,31	53,61	215,12	198,79	206,56	0,08
1:1 (1,2)	92,61	98,60	4,57	140,21	147,60	16,68	171,63	176,50	6,65	24,31	85,61	201,48			
1:5 (1,4)	27,00	73,76	432,89*	139,56	147,60	8,18	171,91	176,69	4,55						
1:10 (1,4)	29,94	74,91	318,11*	140,76	147,44	4,19	171,85	176,00	2,40						

Nota: \* representam o primeiro fenômeno endotérmico da catequina e a perda de água da PVPP-P6755.

O ácido tânico apresenta um perfil térmico por DSC sem eventos marcantes, da mesma forma que a própria PVPP-P6755. Isso impossibilitou a realização de análises comparativas entre substâncias isoladas e as respectivas misturas.

### 5.7.3 Efeito da purificação ácida da PVPP-P6755 sobre a capacidade complexante

O estudo da influência do processo de purificação objetivou a eventual constatação de efeitos adversos por parte de resíduos de síntese solúveis, como  $H_2O_2$ , e de frações de oligômeros de baixa massa molecular na formação de complexos entre a PVPP-P6755 e substâncias polifenólicas. Para isso, a capacidade de complexação foi testada utilizando catequina, antes e após o processo de purificação da PVPP-P6755 (figura 22; ANEXO-tabela 7A).

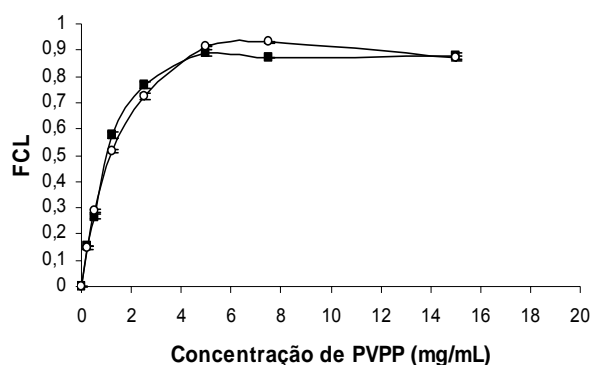


Figura 22. Influência da purificação ácida da PVPP-P6755 sobre a fração de catequina ligada. (■) PVPP-P6755 não purificada, (○) PVPP-P6755 purificada.

Os resultados obtidos demonstraram que não existe diferença significativa na capacidade de complexação entre a PVPP-P6755 tal e como recebida do fornecedor e a mesma após o processo de purificação. No entanto, por já ter sido relatada a utilização do polímero purificado (DONNER *et al.*, 1993, SOARES, 2002) optou-se pela utilização deste nas análises seguintes.

### 5.7.4 Efeito do pH sobre a capacidade complexante

ANDERSEN e SOWERS (1968) investigando a ligação de PVPP a diversos compostos fenólicos observaram que a complexação é máxima quando o pH é suficientemente baixo, suprimindo a ionização de hidroxilas fenólicas e favorecendo a formação de ligações de hidrogênio. SOARES (2002), ao estudar a formação de complexos entre catequina e derivados da PVPP em diferentes condições de pH, observou que a razão molecular do complexo polifenol-PVPP permanece inalterada na faixa de pH de 3,1 a 7,0. No entanto, quando o pH foi elevado a 8,0, houve

pequena redução no teor de catequina ligada à PVPP e, em valores de pH superiores a 8,0, observou reversão significativa da fração de catequina ligada à PVPP.

Com a finalidade de otimizar os parâmetros de complexação, realizou-se ensaio avaliando a influência do pH sobre a estabilidade dos complexos. Nos experimentos realizados com PVPP-P6755 e catequina (figura 23; ANEXO-tabela 8A), se observou maior complexação entre o polímero e a substância de referência quando o pH foi inferior ou igual a 8,0. Nesses casos, devido a total complexação da catequina, os valores de absorvância obtidos foram baixos (em torno de 0,09 e 0,10), originando desvios padrões grandes, em função de se estar trabalhando na faixa de erro do equipamento. Quando o pH foi elevado para 8,5 ocorreu queda brusca na fração de catequina ligada (FCL) e acima desse valor de pH verificou-se uma FCL praticamente nula.

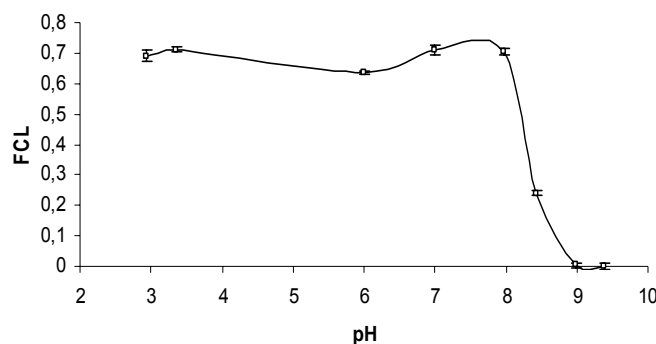


Figura 23. Influência do pH sobre a fração de catequina ligada (FCL) à PVPP-P6755

Esses resultados corroboram com estudos anteriores que afirmam que as ligações de hidrogênio são importantes na ligação de PVPP a compostos fenólicos (ANDERSEN; SOWERS, 1968, PLAIZIER VERCAMEN; DE NEVE, 1982, HORN; DITTER, 1982, SOARES, 2002). Ao mesmo tempo, esses confirmam a possibilidade de realização dos experimentos empregando água destilada como solvente, desde que o pH do meio se mantenha neutro ou levemente ácido.

FICKEL e colaboradores (1999), ao investigar a associação de taninos a PVPP, gelatina, albumina sérica bovina e proteínas da saliva a um pH 8,2, evidenciaram que todos os agentes complexantes testados formaram complexos solúveis com taninos, não sendo observada a precipitação dos complexos e indicando que a precipitação é dependente do pH. No entanto, a PVPP apresentou maior capacidade de complexação, quando comparada aos demais agentes testados.

#### *5.7.5 Avaliação da especificidade da formação de complexos entre diferentes PVPP e substâncias de referência*

Os métodos utilizados para avaliação da especificidade foram o espectrofotométrico e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As limitações de especificidade observadas quando da utilização de derivados protéicos para a quantificação de taninos, assim como as restrições levantadas por SOARES (2002) à utilização de PVPP, segundo as quais o polímero também poderia reagir de forma inespecífica com flavonóides, levaram a realização de estudos mais aprofundados nesse sentido.

Com a finalidade de verificar a capacidade de complexação das PVPP com flavonóides, optou-se pela análise das características de complexação da rutina com diferentes tipos de PVPP (figura 24; ANEXO-tabela 9A). Ao mesmo tempo, foi também explorada a fração de polifenóis, presentes na solução extrativa, com a mesma finalidade.

Os resultados demonstram que, de fato, ocorre complexação entre rutina e diferentes tipos de PVPP. No entanto, percebe-se que a afinidade dos polímeros pela catequina e ácido tânico é maior (figura 18B e 18D), o que sugere uma maior afinidade pelos taninos.

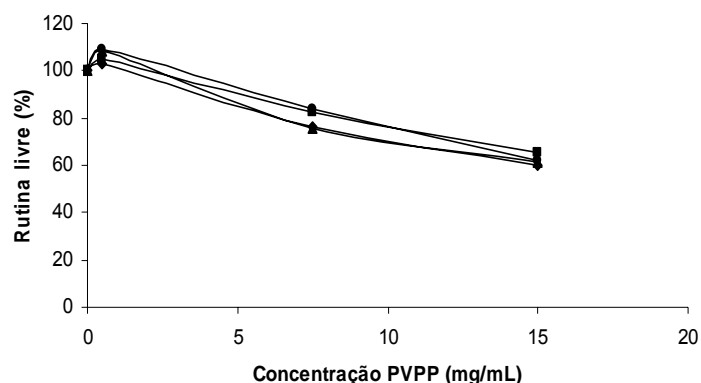


Figura 24. Complexação de rutina com as diferentes PVPP PVPP-P6755 (■); Kollidon CL® (▲); Divergan® F(◆); Divergan® RS (●).

Para comprovação desta hipótese, realizou-se a complexação de uma solução contendo catequina (monômero de tanino condensado) e rutina com a PVPP-P6755, sendo os complexos analisados em 280 nm e 352 nm, comprimentos de onda de absorção máxima da catequina e rutina, respectivamente (figura 25; ANEXO-tabela 10A). Cabe salientar que, no comprimento de onda de 352 nm, a rutina e outros derivados flavonoídicos derivados da quercetina apresentam uma forte absorção, não assim a catequina, que nesse comprimento de onda não é detectada.

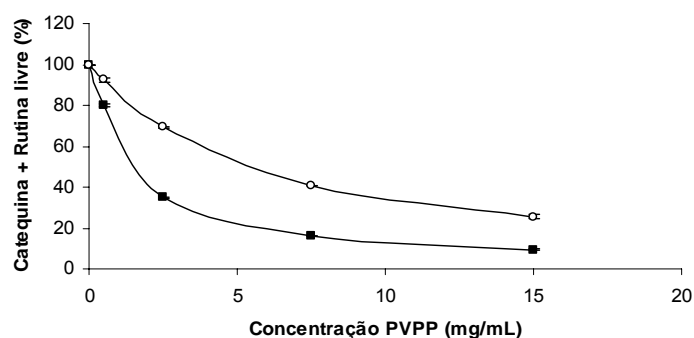


Figura 25. Complexação de solução contendo catequina e rutina com PVPP-P6755 (Sigma); (■) 280 nm, (○) 352 nm.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar uma maior afinidade da PVPP-P6755 pela catequina, a julgar pela diminuição mais acentuada da absorvância em 280 nm, quando comparada à observada em 352 nm. Pela análise comparativa em nível molecular, esse fato resulta coerente. A rutina, quando comparada a catequina (figura 26) apresenta a hidroxila da posição C3 ligada a uma molécula de rutosídeo, o que impediria a formação de ligações de hidrogênio entre a

PVPP-P6755 e uma das posições mais ativas da molécula de rutina, dificultando assim o acesso do polímero a outros grupamentos hidroxila da rutina (DONNER *et al.*, 1993).

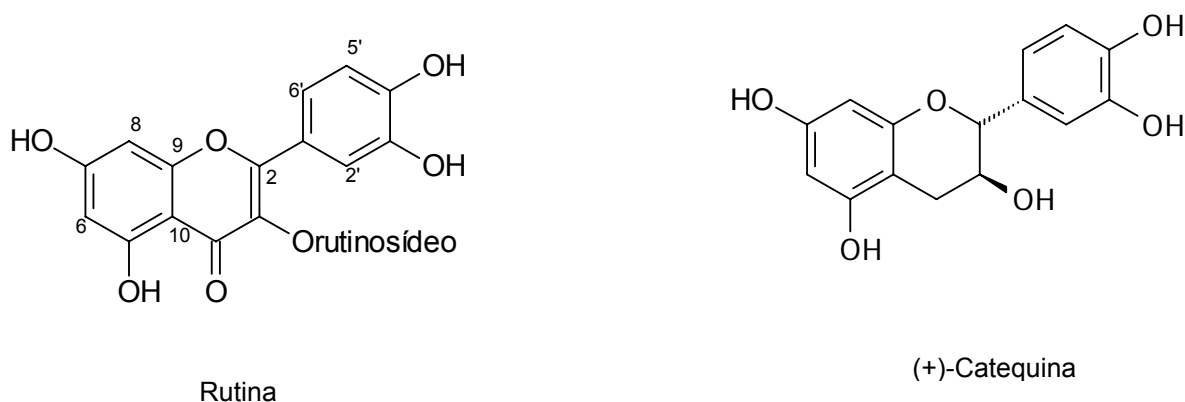


Figura 26. Estruturas moleculares da catequina e da rutina.

DONNER e colaboradores (1993), estudando a afinidade de flavonóides a PVPP, observaram que a complexação dos flavonóides por parte do polímero varia de acordo com o padrão de substituição. De uma maneira geral, para flavonóides com grande número de grupamentos hidroxila, a afinidade por PVPP mostra-se aumentada. Por outro lado, a metilação e a glicosilação, como explicitado para a rutina, diminuem a complexação de favonóides por parte da PVPP. A falta de afinidade das isoflavonas por PVPP, já mencionada neste trabalho, pode ser atribuída à falta de planaridade do anel C. Dessa forma, poderia-se especular, por exemplo, que espécies vegetais mais evoluídas, com níveis de oxidação maiores nos seus flavonóides, apresentem afinidade diferenciada por PVPP, já que os graus de oxidação e substituição estão associados à evolução das mesmas. Por esse motivo, a complexação de flavonóides por parte de polímeros reticulados da povidona deve ser vista com cautela, não se pode generalizar que a PVPP tenha a mesma afinidade por flavonóides de outras espécies vegetais que não *Psidium guajava*.

Realizou-se ainda a complexação entre PVPP-P6755 e uma solução contendo pirogalol e rutina, ambas substâncias com baixa afinidade pelo polímero (figura 27; ANEXO-tabela 11A).



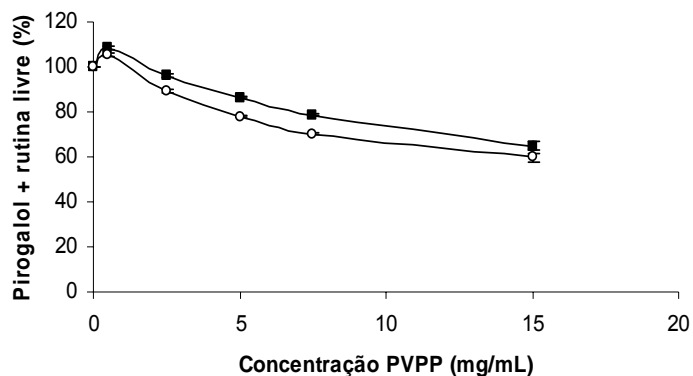


Figura 27. Complexação de solução contendo pirogalol e rutina com PVPP-P6755; (■) 267 nm, (○) 352 nm.

A semelhança entre os efeitos nas absorvâncias, observados em 280 nm e 352 nm, indica uma afinidade semelhante do polímero pelas duas substâncias. Esse resultado difere do observado para a catequina e rutina. A menor afinidade do pirogalol pela PVPP-P6755, quando comparada à catequina, está relacionada, como já dito anteriormente, com o número de grupamentos hidroxila presentes na molécula e com a baixa massa molecular do mesmo, dificultando a sua complexação com o polímero.

Para rutina e pirogalol, cabe destacar o aumento da absorvância quando da utilização da dispersão a  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , origina teores percentuais maiores do que 100 % (figura 27). O mesmo fenômeno foi observado nas figuras 18 D e 24 e não pôde ser explicado em função da turbidez, pelo fato de o líquido de compensação ser água ou por dissolução de frações de baixa massa molecular de PVPP, uma vez que a mesma foi previamente purificada. Provavelmente, esse fenômeno está relacionado a adição de pequenas quantidades de PVPP a soluções de substâncias com baixa afinidade pelo polímero, provocando um leve efeito hipercrômico.

Os resultados espectrofotométricos foram comparados com os obtidos mediante CLAE-PDA, técnica que permitiu a identificação e separação do ácido gálico, catequina, pirogalol e rutina (figuras 9 e 10).

Os resultados obtidos com uma solução das substâncias de referência em mistura, submetida à complexação com diferentes concentrações de PVPP-P6755, demonstraram que pequenas concentrações do polímero, de até 10 mg, foram

capazes de complexar de modo indiferente a rutina e as substâncias de referência (tabela 14; ANEXO-tabela 12A).

Tabela 14. Percentuais de ácido gálico + pirogalol, catequina e rutina complexados à diferentes quantidades de PVPP-P6755. Detecção em 280 nm e 352 nm.

	AG + Piro	CAT	RUT
SP + 10 mg PVPP	20,13%	73,98%	15,78%
SP + 50 mg PVPP	56,19%	96,56%	49,70%
SP + 150 mg PVPP	57,67%	98,95%	75,18%
SP + 300 mg PVPP	51,76%	99,71%	86,43%

Nota: SP: solução-mãe dos padrões

## 5.8 Complexação de taninos de *Psidium guajava* com PVPP-P6755

### 5.8.1 Curva de calibração

A curva de calibração foi construída utilizando catequina como substância de referência, em detrimento do pirogalol, que apresenta um perfil de complexação diferenciado dos taninos e caracterizado pela escassa sensibilidade frente à PVPP-P6755. Para isso utilizaram-se 2,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, garantindo a linearidade na faixa de trabalho, conforme já antes discutido para o pirogalol (item 5.6.2).

Três curvas de calibração obtidas foram submetidas à análise de regressão linear e os parâmetros comparados a fim de verificar diferenças entre as inclinações e elevações obtidas nas retas (tabela 15).

Tabela 15. Resultados da análise de regressão linear das curvas analíticas da catequina em 760 nm

Curva 1	Coeficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	0,06561	0,00623	0,05215	0,07907	9,86 x 10 <sup>-8</sup>
Inclinação (b)	0,11859	0,00146	0,11541	0,12176	5,79 x 10 <sup>-19</sup>
$R^2 = 0,9980$ ; $F_{\text{tabelado}} = 4,67$ ; $F_{\text{calculado}} = 6227,23$ ; Equação 1: $y = 0,11859x + 0,06561$					
Curva 2	Coeficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	0,05051	0,00565	0,03828	0,06274	6,61 x 10 <sup>-7</sup>
Inclinação (b)	0,12089	0,00133	0,11801	0,12377	1,33 x 10 <sup>-19</sup>
$R^2 = 0,9984$ ; $F_{\text{tabelado}} = 4,67$ ; $F_{\text{calculado}} = 8223,71$ ; Equação 2: $y = 0,12089x + 0,05051$					
Curva 3	Coeficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	0,07983	0,00432	0,07048	0,08918	1,05 x 10 <sup>-10</sup>
Inclinação (b)	0,11280	0,00101	0,11061	0,11499	9,23 x 10 <sup>-21</sup>
$R^2 = 0,9989$ ; $F_{\text{tabelado}} = 4,67$ ; $F_{\text{calculado}} = 12390$ ; Equação 3: $y = 0,11280x + 0,07983$					

Realizando a comparação entre as três curvas analíticas, verificou-se que a diferença entre os coeficientes angulares (inclinações) é significativa ( $F_{\text{calc}} = 8,626 > F_{0,05} (2) 2,39 = 3,238$  e maior que  $F_{0,01} (2) 2,39 = 5,194$ ). Quando comparadas as equações um e dois e dois e três, pelo teste de Tuckey, não foi constatada diferença entre as inclinações. No entanto, verificou-se que existe diferença significativa entre as inclinações das equações dois e três ( $q_{\text{calc}} = 3,620 > q_{0,05, 39, 3} = 3,442$ ), indicando que essas retas diferem estatisticamente (ZAR, 1999).

As elevações das três retas demonstraram ser idênticas ( $F_{\text{calc}} = 1,571 < F_{0,05} (1) 2, 41 = 3,22$ ) indicando que as retas ocupam o mesmo plano em relação ao eixo dos Y (ZAR, 1999).

A análise dos resíduos de regressão, realizada pelo teste de Durbin-Watson, não detectou autocorrelação para a equação três ( $dw_{\text{calculado}} 2,203 > dw_{\text{inferior}} 1,08 > dw_{\text{superior}} 1,36$ ; para  $n = 15$ ;  $\alpha = 0,05$ ). Por sua vez, esse teste não foi conclusivo para a equação um ( $dw_{\text{superior}} 1,36 > dw_{\text{calc}} = 1,278 > dw_{\text{inferior}} = 1,08$ ). Para a equação dois, o teste de Durbin-Watson detectou autocorrelação entre os resíduos ( $dw_{\text{calc}}$

1,059 <  $dW_{inferior}$  1,08). Com base nos resultados obtidos entre a comparação das retas e a análise de resíduos optou-se por retirar a equação dois do conjunto de curvas analíticas e obter uma única curva a partir do conjunto de dados que gerou as equações um e três, sendo essa utilizada para fins de cálculo. Os resultados determinados pela análise de regressão estão ilustrados na tabela 16.

Tabela 16. Resultados da análise de regressão linear da curva analítica obtida para catequina, em 760 nm, a partir da comparação das curvas.

Parâmetros	Coefficiente	Erro padrão	LC <sub>inferior</sub>	LC <sub>superior</sub>	Valor-p
Interseção (a)	0,07261	0,00435	0,05215	0,06368	$4,6 \times 10^{-16}$
Inclinação (b)	0,11605	0,00102	0,11541	0,11394	$8,55 \times 10^{-39}$

$$R^2 = 0,9978; F_{\text{tabelado}} = 4,19; F_{\text{calculado}} = 12777,22; \text{Equação : } y = 0,11605x + 0,07261$$

Dessa forma, o coeficiente de absorção específica ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) da catequina, calculado a partir da curva de calibração utilizando 2,0 mL de reagente foi de 1359,65.

#### 5.8.2 Complexação de taninos de *Psidium guajava* com PVPP-P6755

Com a finalidade de verificar o perfil de complexação da solução extrativa de *Psidium guajava* frente ao derivado PVPP-P6755 realizaram-se complexações utilizando diferentes concentrações desse agente precipitante.

Foi detectado para a solução extrativa de *Psidium guajava* (figura 28; ANEXO-tabela 13A) o mesmo comportamento observado para o ácido tânico e catequina sem o uso do reagente de Folin-Ciocalteu, através de leitura espectrofotométrica direta (figura 18 B e C).

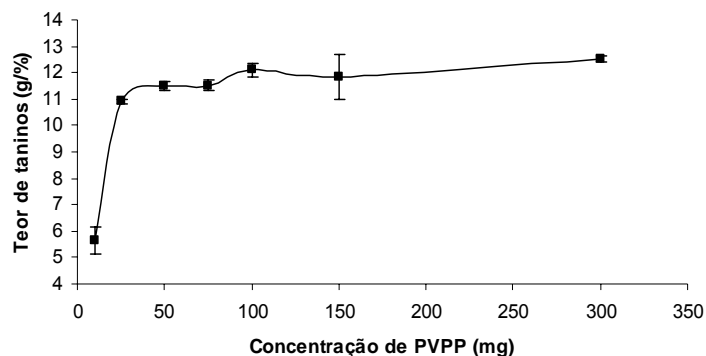


Figura 28. Perfil de complexação para a solução extrativa de *Psidium guajava* em função da concentração PVPP-P6755 (PVPP), expresso como taninos totais (TT), com determinação em 760 nm.

Pela análise do perfil de complexação, verifica-se que, a partir da utilização de 50,0 mg de PVPP-P6755, o teor de taninos totais calculado permaneceu praticamente inalterado. Mais ainda, os valores de absorvância nesse platô foram bastante baixos, em torno de 0,09 e 0,10. Isso indica um esgotamento quase total da fração não-tanante, no qual, não somente os taninos foram complexados, mas também todos os outros polifenóis presentes na solução extrativa. Esse fenômeno é semelhante ao observado quando da utilização de 800,0 mg de caseína GT e 100,0 mg de pó-de-pele

A especificidade da complexação também foi avaliada através da técnica de CLAE-PDA. Os cromatogramas obtidos para a solução extrativa sem PVPP-P6755 estão ilustrados nas figuras 11 e 13. Os resultados indicam que uma concentração de 50,0 mg de PVPP-P6755 é, de fato, capaz de complexar a catequina em sua totalidade e a maior parte dos flavonóides presentes na solução extrativa (tabela 17; ANEXO-tabela 14A), demonstrando falta de especificidade do método. O emprego de 150,0 e 300,0 mg de PVPP-P6755 promovem a retirada de praticamente todos os outros polifenóis do meio, com exceção do ácido gálico (figura 29), confirmando a baixa capacidade de complexação para este polifenol, já antes observada com pó-de-pele e caseína.

Tabela 17. Percentual de ácido gálico, catequina e flavonóides de *Psidium guajava* complexados com diferentes quantidades de PVPP-P6755. Detecção em 280 (ácido gálico e catequina) e 352 nm (flavonóides).

Detecção	280 nm		352 nm					
	AG CV %	CAT CV%	Pico 1 CV%	Pico 2 CV%	Pico 3 CV%	Pico 4 CV%	Pico 5 CV%	Pico 6 CV%
SE + 10 mg PVPP	28,64% 2,26%	76,53% 1,94%	36,24% 3,16%	71,68% 1,43%	79,40% 1,00%	65,00% 0,25%	55,19% 0,14%	84,00% 1,17%
SE + 20 mg PVPP	30,89% 0,25%	100%	37,80% 2,84%	84,30% 1,19%	90,67% 1,36%	77,62% 1,41%	69,73% 0,36%	85,35% 6,64%
SE + 30 mg PVPP	42,69% 4,76%	100%	46,79% 1,53%	91,21% 3,82%	94,94% 2,04%	86,03% 0,67%	82,41% 2,84%	86,34% 4,96%
SE + 40 mg PVPP	47,38% 4,40%	100%	53,90% 1,33%	93,83% 1,72%	96,47% 3,49%	89,78% 2,54%	87,68% 0,99%	89,13% 8,83%
SE + 50 mg PVPP	57,59% 1,62%	100%	68,09% 0,64%	95,96% 3,18%	97,72% 5,09%	92,97% 2,20%	92,87% 1,57%	91,35% 4,34%
SE +150 mg PVPP	63,34% 0,97%	100%	88,76% 2,56%	100%	100%	97,81% 5,20%	98,24% 1,76%	91,95% 4,01%
SE + 300 mg PVPP	69,79% 0,32%	100%	95,38% 8,81%	100%	100%	100%	99,44% 21,98%	91,77% 9,94%

Nota: AG: ácido gálico; CAT: catequina; SE: solução extrativa; CV%: coeficiente de variação percentual (n = 3).

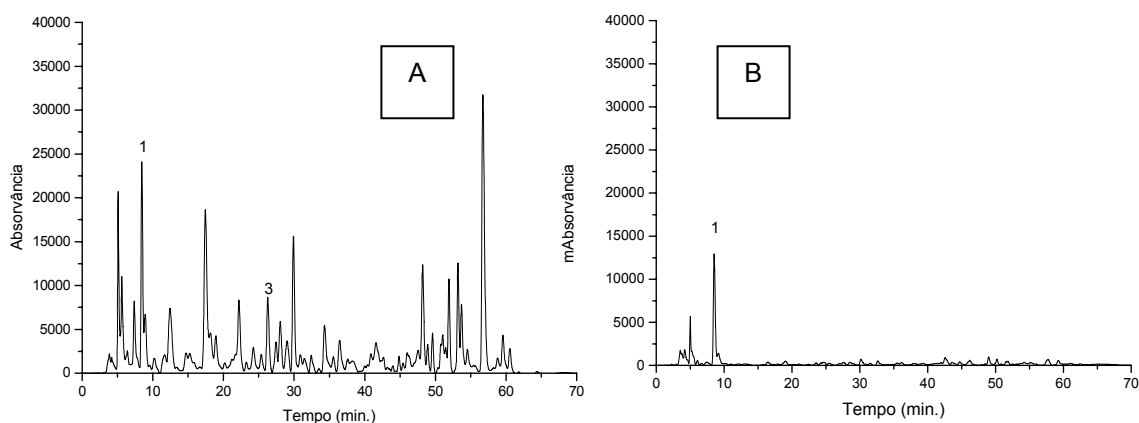


Figura 29. Cromatogramas da solução extrativa, obtidos sem tratamento (A) e após tratamento com 150,0 mg de PVPP-P6755 (B). Detecção em 280 nm.

## 5.9 Análise comparativa dos teores de taninos totais, calculados mediante utilização de caseína, pó-de-pele e PVPP-P6755

### 5.9.1 Efeito da substância de referência no cálculo do teor de taninos totais

As substâncias de referência utilizadas no presente trabalho (ácido tânico, ácido gálico, catequina e pirogalol) são relatadas na literatura para o cálculo de taninos totais. Devido aos resultados divergentes assinalados para o ácido tânico proveniente de fornecedores diferentes (MAKKAR; BECKER, 1993), logo de início descartou-se a utilização desse como substância de referência.

Apesar da semelhança entre os espectros obtidos para o pirogalol e a solução extrativa de *Psidium guajava*, a falta de afinidade desse, por derivados da PVPP (figura 18 C), restringe sua utilização como substância de referência na quantificação de taninos. De modo semelhante, o ácido gálico apresenta baixa afinidade em relação à PVPP-P6755 (tabela 17 e figura 28) e em relação aos derivados protéicos caseína e pó-de-pele, (tabela 10), sendo também questionável sua utilização como substância de referência.

Nesta etapa final do trabalho, a escolha da catequina mostrou-se mais adequada em função da sua maior afinidade pelos agentes complexantes, tanto pelos de natureza protéica, como pelos derivados da PVPP (tabela 10, figura 18, tabela 17). Esse fato nos permite especular que a catequina apresenta capacidade de redução do reagente de Folin-Ciocalteu semelhante ao que se verifica para as estruturas poliméricas dos taninos, sendo portanto mais indicada para referenciar essa classe de substâncias. O reagente de Folin-Ciocalteu mede a capacidade de redução da amostra, que depende da estrutura fenólica, sendo necessário uma substância de referência com capacidade de redução do reagente semelhante à do extrato analisado, para que a representação dê origem a resultados precisos.

Uma comparação do teor de taninos obtidos pela utilização de diferentes agentes precipitantes e de duas substâncias de referência encontra-se na tabela 18.

Tabela 18. Teor de taninos obtido com a utilização de diferentes concentrações de caseína, pó-de-pele e PVPP-P6755.

Teor de taninos totais (g%)		
	Pirogalol (g%); CV%	Catequina (g%); CV%
SE + 400 mg de caseína	3,62; 4,39	5,58; 4,39
SE + 800 mg de caseína	8,25; 2,94	12,34; 2,94
SE + 100 mg de pó-de-pele	7,64; 1,18	11,79; 1,18
SE + 10 mg de PVPP	3,67; 9,02	5,26; 9,02
SE + 25 mg de PVPP	7,07; 0,77	10,90; 0,77
SE + 50 mg de PVPP	7,44; 1,48	11,49; 1,48

Pelos valores obtidos de  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  para pirogalol e catequina e considerando que a razão entre eles é 1:1,54, verifica-se que as diferenças observadas nos respectivos teores de taninos totais, são basicamente, devidas à variação no valor de  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ . A equivalência na proporção 1:1,54, assinalada para as razões das absorvâncias específicas (do pirogalol e da catequina) e os teores calculados (com 50,0 mg de PVPP-P6755 e 100,0 mg de pó-de-pele), reflete diretamente, uma capacidade diferenciada do reagente de Folin-Ciocalteu em reduzir ambas substâncias de referência.

### 5.9.2 Efeito do agente complexante

Os três agentes complexantes avaliados nesse trabalho diferem quimicamente em relação à estrutura. Contudo, apresentam comportamentos semelhantes em relação à falta de especificidade na determinação do teor de taninos da *Psidium guajava*.

De maneira geral, a caseína apresenta uma menor capacidade de complexação em relação tanto ao pó-de-pele quanto à PVPP-P6755. A diferença pode ser constatada através de comparação entre os teores de taninos obtidos pelo método espectrofotométrico (tabela 18), além da comparação dos percentuais de ácido gálico e catequina, bem como dos flavonóides complexados (tabelas 10, 17).



Por extrapolação dos resultados aqui obtidos e os mostrados na figura 7, onde se observa uma tendência quase linear para as quantidades de 600,0 a 800,0 mg de caseína, é possível estimar que 750,0 mg de caseína GT provocam o mesmo efeito que 100,0 mg de pó-de-pele para a solução extrativa de *Psidium guajava*. Contudo, cabe enfatizar o fato de os teores de taninos calculados espectrofotometricamente com 800,0 mg de caseína e 100 mg de pó-de-pele terem sido semelhantes, o que não reflete no perfil dos flavonóides em ambos casos, o qual difere claramente. Observou-se uma maior afinidade pela catequina e por flavonóides, bem como uma menor afinidade por ácido gálico quando da utilização de caseína, e, diferentemente, uma maior afinidade pelo ácido gálico quando utilizado o pó-de-pele. Essas diferenças não puderam ser detectadas pelo método espectrofotométrico, mas foram comprováveis estatisticamente, através de realização de teste *t* de Student considerando variâncias diferentes. O resultado do teste indica que existem diferenças entre os teores de flavonóides obtidos pela utilização de 800,0 mg de caseína e 100,0 mg de pó-de-pele ( $t_{\text{calculado}} = 3,1744 > t_{0,05(2)} = 2,571$ ).

Observa-se ainda, que o teor calculado quando da utilização de 50,0 mg de PVPP-P6755 foi semelhante àquele obtido com 100,0 mg de pó-de-pele (tabela 18). Nessa oportunidade, houve diferenças na complexação dos flavonóides presentes na solução extrativa, quando utilizados pó-de-pele ou PVPP-P6755, as quais ocorreram de maneira diferenciada segundo o flavonóide analisado. No entanto, considerando a fração flavonoídica como um todo, não foram constatadas diferenças estatísticas significativas quando aplicado o teste *t* de Student para variâncias diferentes ( $t_{\text{calculado}} = 2,1555 < t_{0,05(2)9} = 2,26$ ). Em relação ao ácido gálico, tanto o pó-de-pele quanto a PVPP-P6755 comportaram-se de maneira semelhante. No entanto, quando analisa-se especificamente o caso da catequina, percebe-se uma maior afinidade dessa pela PVPP-P6755, o que foi tido como uma vantagem desse polímero (tabelas 10 e 17).

Aparentemente, esses resultados diferem parcialmente daqueles relatados por LIAO e colaboradores (2003). Segundo esses, o pó-de-pele apresentou uma maior afinidade pelo galato de (-)-epigalocatequina, galato (-)-galocatequina e (-)-epigalocatequina, quando comparado ao Divergan® RS. No entanto, a julgar pelos

dados informados no artigo, verifica-se que os autores adicionaram ácido tânico somente à solução submetida a complexação com PVPP, em detrimento da solução submetida à complexação com pó-de-pele. Esse fato pode influenciar a complexação do Divergan® RS com as substâncias supracitadas, tendo em vista a grande afinidade da PVPP pelo ácido tânico (FRÖMMING *et al.*, 1981; HORN; DITTER, 1982). Além disso, não foi possível verificar se as soluções comparadas apresentavam concentrações idênticas, já que os métodos utilizados para as análises por CLAE foram, nesse trabalho citado, distintos.

Observou-se ainda que um teor de taninos comparável ao obtido com 400,0 mg de caseína GT foi encontrado com a utilização de 10,0 mg de PVPP-P6755 (tabela 18).

Visto como um todo, o método proposto é, no mínimo, equivalente aos que utilizam caseína e pó-de-pele. Especificamente, pode-se afirmar que uma solução extrativa de *Psidium guajava*, quando analisada com 2,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e tratada com 50,0 mg de PVPP-P6755, leva a um teor de taninos equivalente ao obtido a partir do método oficial da Ph. Eur (2002), que preconiza o uso de 100,0 mg de pó-de-pele. Teor semelhante também é obtido quando se utiliza 750,0 mg de caseína. Levando em consideração, preço, facilidade de aquisição e pequena variabilidade de lote, o uso de PVPP, ainda que com as mesmas limitações de especificidade observadas no caso específico de solução extrativa de *Psidium guajava*, surge como uma alternativa analiticamente viável, se comparado ao pó-de-pele.

Considerando finalmente as especificidades da estrutura molecular que muito provavelmente estão envolvidas na interação PVPP-flavonóides, fica negada a transposição dos dados obtidos para *Psidium guajava* para outras drogas vegetais. Com isso, abre-se a possibilidade de estudos subseqüentes da aplicação dessa metodologia para espécies, oficiais ou não, onde não se observe a falta de especificidade assinalada para o método com PVPP, deficiência esta também sentida com pó-de-pele e caseína.

## **6. CONCLUSÕES:**

---

---



- A análise comparativa de diversos métodos oficiais preconizados para o doseamento do teor de taninos revelou uma falta de uniformidade, em termos de reagente, comprimento de onda de leitura e tempo de leitura.
- A análise comparativa das características de complexação da caseína purificada e caseína grau técnico (GT) assinalou falta de precisão intermediária para o uso da caseína purificada, provavelmente, em função da defosforilação implícita no processo de purificação.
- Para os métodos espectrofotométrico e por CLAE, evidenciou-se falta de especificidade para os agentes complexantes caseína GT e pó-de-pele, frente ao flavonóide rutina e à fração flavonoídica da solução extrativa de *Psidium guajava*.
- A comparação da capacidade de complexação dos diferentes tipos de PVPP evidenciou diferenças entre eles, sendo selecionada a PVPP-P6755 para a realização das análises subseqüentes.
- A formação de complexos entre PVPP-P6755 e catequina mostrou ser pH dependente. Quando o pH assumiu valores iguais ou superiores a 8,5 ocorreu uma queda brusca da fração de catequina ligada, comprometendo a complexação.
- Evidenciou-se falta de afinidade do ácido gálico e pirogálico, em relação à caseína GT e pó-de-pele, assim como para a PVPP-P6755, comprometendo, de certa forma, sua utilização como substâncias de referência na quantificação de taninos.

- PVPP-P6755 demonstrou a mesma falta de especificidade relatada para o pó-de-pele e caseína frente à solução extrativa de *Psidium guajava* e, também, frente às substâncias de referência, ácido gálico, catequina, pirogalol e rutina, tanto para o método espectrofotométrico quanto por CLAE.
- Avaliando e estudando as peculiaridades de cada método e confrontando os resultados obtidos verificou-se que a utilização de 100,0 mg de pó-de-pele, método preconizado por Ph. Eur (2002), origina teores de taninos semelhantes aos obtidos quando se utiliza 50,0 mg de PVPP-P6755 para a quantificação de taninos em *Psidium guajava*. Dessa forma, pode-se sugerir um método de quantificação com a utilização de 2,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, leitura em 760 nm e 50,0 mg de PVPP-P6755 para *Psidium guajava*.
- Abre-se a possibilidade de estudos subseqüentes da aplicação dessa metodologia para outras espécies vegetais, já que especificidades da estrutura molecular estão envolvidas na interação PVPP-flavonóides, o que veda a transposição de resultados para outras drogas vegetais.

## **7. REFERÊNCIAS**

---

---





ANDERSEN, R.P.; SOWERS, J. A. Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinilpyrrolidone. **Phytochemistry**, v. 7, p. 293-301, 1968.

ANDO, H.; RADEBAUGH, G. W. Preformulation. In: GENARO, A. R. (Ed.). **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 20. ed. Philadelphia: University of the Science, p. 700-720, 2000.

APPEL, H. M.; GOVERNOR, H. L.; D'ASCENZO, M.; SISKI, E.; SCHULTZ, J. C. Limitations of folin assays of foliar phenolics in ecological studies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, p. 761-778, 2001.

ASEGA, A. F.; CARVALHO de, M. A. M. Fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 313-319, 2004.

BASF. Products for the Food and Pharmaceutical Industry. **Technical Information**. p.191-197, 2003.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, p. 175-177, jul-dez, 2002.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; LUBERT, S. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BORNEMAN, Z.; GÖKMEN, V.; NIJHUIS, H. H. Selective removal of polyphenols and brown colour in apple juices using PES/PVP membranes in a single ultrafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 22-23, p. 53-61, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Resolução n ° 899 de 29/05/2003. Disponível na internet endereço: <http://www.anvisa.gov.br>.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationary Office, 1999, v. I.

BRUNETON, J. **Farmacognosia – Fitoquímica Plantas Medicinales**. 2 ed. España: Editorial Acríbia S. A., 2001, p. 365-400.

BRUYNE, T. de.; PIETERS, L.; WIEVROUW, M.; CLERO, E. de.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. J. Biological evaluation of proanthocyanidin dimmers and related polyphenols. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 954-958, 1999.

BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck Index**. 12. ed. White House Station: Merck, 1996.

CARVALHO, E.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 97-101, 2004.

CHARLTON, A. J.; BAXTER, N. J.; KHAN, M.L.; MOIR, A. J. G. HASLAM, E.; DAVIES, A.P.; WILLIAMSON, M. P. Polyphenol/peptide binding and precipitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1593-1601, 2002.

CHIEN, Y.; HAGERMAN, A. E. Characterization of soluble non-covalent complexes between bovine serum albumin and  $\beta$ -1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose by

- MALDI-TOF MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4008-4011, 2004.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1994, v. I.
- COSTA, I. De M. **Estudo de pré-formulação com o composto polifenólico quercetina**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- DE SOUZA, T. P. De. **Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae)**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- DEUTSCHES Arzneibuch. 9. Franckfurt: Govi-Deutscher Apotheker, 1986.
- DEUTSCHES Arzneibuch. 3. ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1998.
- DONNER, L.W., BÉCARD, G. IRWIN, P.L. Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, p. 753-757, 1993.
- EMA –7. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) VICH Topic GL1 (Validation: Definition): **Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology**, 1998.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. 4. ed. France: EDQM, p. 187, 2002.
- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Ver. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003, Cap. 12, p. 263-288.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FAO/IAEA. Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. **Quantification of Tannins in Tree Foliage**. Vienna, 2000.
- FERNÁNDEZ, M. J.; OLIVA, J.; BARBA, A.; CÁMARA, M. A. Effects of clarification and filtration processes on the removal of fungicide residues in red wines (var. Monastrel). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6156-6161, 2005.
- FICKEL, J.; PITRA, C.; JOEST, B. A.; HOFMANN, R. R. A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 122, p. 225-229, 1999.
- FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v XII, p.239-243, 1912

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. LXXIII, p. 627-650, 1927.

FOLIN, O.; MACALLUM, A.B. On the blue color reaction of phosphotungstic acid with uric acid and other substances. **The Journal of Biological Chemistry**, v. XII, p. 265-266, 1912.

FORD, J.L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis**. Techniques and Applications. Chichester: Ellis Horwood, 1989.

FREITAS, V. de.; CARVALHO, E.; MATEUS, N. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. **Food Chemistry**, v. 81, p. 503-509, 2003.

FREITAS, V. de. MATEUS, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 940-945, 2001.

FRÖMMING, K. H.; DITTER, W.; HORN, D. Sorption properties of cross-linked insoluble polyvinylpyrrolidone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 738-743, 1981.

GARRIDO, A.; CABRERA, G.; GERRERO, J.E.; MEER, van der J. M. Effects of treatment with polyvinylpyrrolidone and polyethylene glycol on faba bean tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v.35, p. 199-203, 1991.

GAULEJAC, S-C.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.425-431, 1999.

GÓMEZ-PLAZA, E.; GIL-MUÑOZ, R.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; MARTÍNEZ, A. Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 736-741, 2000.

GONÇALVES, J. L. S.; LOPES, R. C.; OLIVEIRA, D. B.; COSTA, S. S.; MIRANDA, M. M. F. S.; ROMANOS, M. T. V.; SANTOS, N. S. O.; WIGG, M. D. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 403-407, 2005.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. USA: Prentice Hall, 2000.

GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 89, p. 1-9, 2005.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 809-812, 1978.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 4494-4497, 1981.

- HAGERMAN, A. E.; RICE, M. E.; RITCHARD, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin <sub>16</sub> – (4→8) catechin (procyanidin). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v 46, p. 2590-2595, 1998.
- HAINES, P. J. **Thermal Methods of Analysis**. Principles, Applications and Problems. London: Chapman & Hall, 1995.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The Flavonoids**. v. I. New York: Academic Press, 1975.
- HARVEY, I. M. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 3-20, 2001.
- HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; CAI, Y.; MARTIR, R.; MAGNOLATO, D. Traditional herbal medicines-the role of polyphenols. **Planta Medica**, v. 55, 8p. 1989.
- HATAKEYAMA, T.; QUINN, F. X. **Thermal Analysis and Applications to Polymer Science**. 2. ed. Chichester: Wiley, 1999.
- HEFENDEHL, F. W. Anforderung an die Qualitätskontrolle pflanzlicher Arzneimittel. Seminar der Arbeitsgruppe "Pharmazeutische Analytik" der österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft, Graz, 1985.
- HÖRN, D.; DITTER, W. Chromatographic study of interaction between polyvinylpyrrolidone and drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 1021-1026, 1982.
- JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P.; SURIYAWONG, P.; SARAYA, M. L. S.; RUANGSOMBOON, O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Liin. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 203-212, 1999.
- JÖBSTL, E.; O'CONNELL, J.; FAIRCLOUGH, J. P. A.; WILLIAMSON, M. P. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 942-949, 2004.
- JORMALAINEM, V.; HONKANEN, T.; VESAKOSKI, O.; KOIVIKKO, R. Polar extracts of the brown alga *Fucus vesiculosus* (L.) reduce assimilation efficiency but do not deter the herbivorous isopod *Idotea baltica* (Pallas). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 317, p. 143-157, 2005.
- JURD, L. Spectral properties of flavonoid contents. In: GEISSMAN, T. A. (ed). **The Chemistry of Flavonoid Compounds**. New York: Macmillan, 1962. Cap. 5. p. 107-155.
- KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F.; MURAKAMI, K. Stoichiometric studies of tannin co-precipitation. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1427-1431, 1996.
- KAWAMOTO H.; NAKATSUBO, F. Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. **Phytochemistry**, v. 46, p. 479-483, 1997a.

- KAWAMOTO H.; NAKATSUBO, F. Solubility of protein complexes with galloylglucoses. **Phytochemistry**, v, 46, p. 485-488, 1997b.
- KILKUSKIE, R. E.; KASHIWADA, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; BODNER, A. J.; CHENG, Y-C. LEE, K-H. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2. p. 1529-1534, 1992.
- KOLLIDON **Polyvinylpyrrolidone for the Pharmaceutical Industry**. 6. ed. Ludwigshafen: Basf, 2001.
- KONDO, S.; KITTIKORN, M.; KANLAYANARAT, S. Preharvest antioxidant activities of tropical fruit and the effect of low temperature storage on antioxidants and jasmonates. **Postharvest Biology and Technology**, v. 36, p. 309-318, 2005.
- KRUIF, C. G. de. Casein micelle interactions. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 183-188, 1999.
- LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGEWATER, E. Medicinal plants used for dogs in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, p. 201-220, 2000.
- LAPCÍK, O.; KLEJDUS, B.; KOKOSKA, L.; DAVIDOVÁ, M.; AFANDI, K.; KUBÁN, V.; HAMPL, R. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 983-992, 2005.
- LIAO, X. P.; LU, Z. B.; SHI, B. Selective adsorption of vegetable tannins onto collagen fibers. **Industrial and Engineering Chemical Research**, v. 42, p. 3397-3402, 2003.
- LOZOYA, X.; MORALES-REYES, H.; CHÁVEZ-SOTO, M. A.; MARTÍNEZ-GARCÍA, M. D. C.; SOTO-GONZÁLEZ, Y.; DOUBOVA, S. V. Intestinal anti-spasmodic effect of phytodrug of *Psidium guajava folia* in the treatment of acute diarrheic disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 19-24, 2002.
- LUCK, G.; LIAO, H.; MURRAY, N. J.; GRIMMER, H. R.; WARMINSKI, E. E.; WILLIAMSON, M. P.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. **Phytochemistry**, v. 37, p. 357-371, 1994.
- MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Behavior of tannic acid from various commercial sources towards redox, metal complexing and protein precipitation assays of tannins. **Journal Science Food Agriculture**, v. 62, p. 295-299, 1993.
- MAKKAR, H. P. S.; BLUMMEL, M.; BECKER, K. Formation of complexes between polyvinylpyrrolidones ou polyethyleneglycols and tannins, and their implication in gas-production and true digestibility in *in vitro* techniques. **British Journal of Nutrition**. v. 73, p. 897-913, 1995.
- MAKKAR, H.P.S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, v. 49, p. 241-256, 2003.

- MAKRIS, D. P.; PSARRA, E.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. **Food Research International**, v. 36, p. 805-814, 2003.
- MARTINS, A. G. **Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss**. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- MATEUS, N.; CARVALHO, E.; LUÍS, C.; FREITAS, V. de. Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, p. 135-140, 2004.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. de L.; AMORIN, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p.892-896, 2005.
- NAGAYAMA, K.; SHIBATA, T.; FUJIMOTO, K.; HONJO, T.; NAKAMURA, T. Algicidal effect os phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on red tide microalgae. **Aquaculture**, v. 218, p. 601-611, 2003.
- NAKAI, S.; INOUE, Y.; HOSOMI, M.; MURAKAMI, A. *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 34, p. 3026-3032, 2000.
- NAKANISHI, K. SOLOMON, P. M. **Infrared Absortion Spectroscopy**. 2. ed. San Francisco: Holden Day, 1977.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3. ed. New York: Worth Publishers, 2000.
- OH, W. K.; LEE, C. H.; LEE, M. S.; BAE, E. Y.; SOHN, CL. B.; OH, H.; KIM, B. Y.; AHN, J. S. Antidiabetic effects os extracts from *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 411-415, 2005.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analyzing tannins. **Journal of Natural Products**, v. 52, p.1-31, 1989.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. 3. ed. Melbourne: Brooks/Cole, 2001.
- PENG, Z.; HAYASAKA, Y.; ILLAND, P. G.; SEFTON, M.; HOJ, P.; WATERS, E. J. Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 26-31, 2001.
- PINELO, M.; RUBILAR, M.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M. J. Effect of bubbling nitrogen and pulsed flow on the antiradical activity of grape residues. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 269-275, 2006.

- PLAIZIER-VERCAMMEN, J. A.; NÉVE DE, R. E. Interaction of povidone with aromatic compounds III: thermodynamics of the binding equilibria and interaction forces in buffer solutions at varying pH values and varying dielectric constant. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 552-556, 1982.
- POUCHERT, C. J. (Ed.) **The Aldrich Library of Infrared Spectra**. 3. ed. Wisconsin: Aldrich Chemical Company, 1991.
- POUSSIER, S.; CHÉRON, J.J.; COUTEAU, A. LUISETTI, J. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51 p. 349-359, 2002.
- PROESTOS, C.; SERELI, D.; KOMAITIS, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. **Food Chemistry**, v. 95, p. 44-52, 2006.
- RAMMA, A. L.; BAHORUN, T.; CROZIER, A.; ZBARSKY, V.; DATLA, K. P.; DEXTER, D. T.; ARUOMA, O. I. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. **Food Research International**, v. 38, p. 357-367, 2005.
- RAMOS-TEJADA, M. M.; DURÁN, J. D. G.; ONTIVEROS-ORTEGA, A.; JIMENEZ-ESPINOSA, M.; CARPIO-PEREA, R.; CHOWSKI, E. Investigation of alumina/(+)-catechin system properties. Part I: a study of the system by FTIR-UV-Vis spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 24, p. 297-308, 2002.
- RIGO, A.; VIANELLO, F.; CLEMENTI, G. Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1996-2002, 2000.
- RIOU, V.; VERNHET, A.; DOCO, T.; MOUTOUNET, M. Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 17-23, 2002.
- ROW, K. H.; JIN, Y. Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 790-793, 2006.
- SANTOS, S. da. C.; MELLO, J. C. P.de. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. rev. ampl., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2003. Cap. 24, p. 615-656.
- SADEK, P. C. **Troubleshooting HPLC Systems**. New York: Willey, 2000.
- SAVOVA, S. T.; RIBAROVA, F. GEROVA, M. (+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 691-698, 2005.
- SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. **Plant Polyphenols**. New York: Plenum Press, 1992, p. 259-280.

- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.
- SHOJI, T.; MASUMOTO, S.; MORIICHI, N.; KANDA, T.; OHTAKE, Y. Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, p. 206-213, 2006.
- SHUI, G.; LEONG, L. P. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1022, p. 67-75, 2004.
- SIEBERT, K. J.; CARRASCO, A.; LYNN, P. Y. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1997-2005, 1996b.
- SIEBERT, K. J.; LYNN, P. Y. Mechanisms of adsorbent action in beverage stabilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4275-4280, 1997.
- SIEBERT, K. J.; TROUKHANOVA, N. V.; LYNN, P. Y. Nature of polyphenol-protein interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 80-85, 1996a.
- SIEBERT, K. J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, 1999.
- SILANIKOVE, N.; PEREVOLOTSKY, A.; PROVENZA, F. D. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 69-81, 2001.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectroscópica dos Compostos Orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998.
- SIMON, C.; BARATHIEU, K.; LAGUERRE, M.; SCHMITTER, J.-M.; FOUQUET, E.; PIANET, I.; DUFOURC, E. J. Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. **Biochemistry**, v. 42, p. 10385-10395, 2003.
- SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek. – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final**. 2002. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- SPENCER, C.M.; CAI, Y.; MARTIN, R.; GAFFNEY, S.; GOULDIN, P. N.; MAGNOLATO, D.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenol complexation-some thoughts and observations. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2397-2409, 1988.



- STAMPAR, F.; SOLAR, A.; HUDINA, M.; VEBERIC, R.; COLARIC, M. Traditional walnut liqueur – cocktail of phenolics. **Food Chemistry**, v. 95, p. 627-631, 2006.
- SWANSON, A. K.; DRUEHL, L. D. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. **Aquatic Botany**, v. 73. p. 241-253, 2002.
- The United States Pharmacopeia, 29. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.
- TROCHIMCHUK, T.; FOTHERINGHAM, J.; TOPP, E.; SCHRAFT, H.; LEUNG, K. T. A comparison of DNA extraction and purification methods to detect *Escherichia coli* O157:H7 in cattle manure. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 165-175, 2003.
- WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, v. 9, p. 189-192, 1999.
- WANG, B. H.; FOO, L. Y.; POLYA, G. M. Differential inhibition of eukaryote proteins kinases by condensed tannins. **Phytochemistry**, v. 43, p. 359-365, 1996.
- WELLS, J. I. **Pharmaceutical Preformulation**. Chichester: Ellis Horwood, 1988.
- WHO – World Health Organization. **Medicinal Plants in the South Pacific**. Manila: WHO – Regional Publications Series n ° 19, 1998, p. 161.
- YOUN, K-S.; HONG, J-G.; BAE, D-H.; KIM, S-J.; KIM, S-D. Effective clarifying process of reconstituted apple juice using membrane filtration with filter-aid pretreatment. **Journal of Membrane Science**, v. 228, p. 179-186, 2004.
- ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.
- ZUO, Y.; CHEN, H.; DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acid in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. **Talanta**, v. 57, p. 307-316, 2002.



## **8. ANEXOS**

---

---

Tabela 1A. Preparação da Amostra

Farmacopéia	Monografia	Etapas de Preparação						Observações
		1	2	3	4	5	6	
Francesa - 1974	<i>Ratanhiae racine</i>	Pesar exatamente cerca de 0,750g da droga pulverizada (180).	Adicionar 150 mL de água. Aquecer até ferver e manter em banho-maria durante 30 min.	Resfriar a mistura em água corrente.	Transferir para um balão volumétrico de 250 mL e completar com água a 250,0 mL.	Deixar decantar, filtrar o líquido através de papel filtro de 12 cm de diâmetro.	Desprezar os primeiros 50,0 mL de filtrado e utilizar o restante para o doseamento.	
Européia - 1976	<i>Ratanhiae radix</i>							
Alemã - 1987	<i>Ratanhiae radix</i>							
Européia - 1997	<i>Ratanhiae radix</i>							
Britânica - 1999	<i>Rhatany root</i> <i>Hamamelis leaf</i>							
Brasileira IV ed - 1988 ( <b>1996</b> )	<i>Hamamelidis folium</i>	Pesar 0,75g da droga pulverizada.	Transferir para erlenmeyer e adicionar 150 mL de água. Aquecer até ferver e manter em banho-maria a temperatura de 80-90°C por 30 min.	Resfriar em água corrente.	Transferir a mistura para balão volumétrico e diluir a 250,0 mL com água .	Deixar decantar o sedimento e filtrar através de papel filtro.	Desprezar os primeiros 50,0 mL do filtrado.	
Brasileira IV ed - 1988 ( <b>2003</b> )	<i>Eugeniae folium</i>							
Alemã - 1998	Método geral para determinação de taninos	Pesar a quantidade especificada em cada monografia (para droga ).	Transferir para erlenmeyer e adicionar 150 mL de água. Aquecer até a ferver e manter em banho-maria durante 30 minutos.	Resfriar a mistura até 20° C.	Transferir para balão volumétrico e completar com água a 250,0 mL	Deixar sedimentar, filtrar o líquido remanescente através de papel filtro de 12,5 cm de diâmetro.	Desprezar os primeiros 50,0mL do filtrado. O restante é utilizado para a determinação do teor.	Para extratos ou tinturas utilizar a quantidade especificada em cada monografia e diluir a 250,0 mL com água. Filtrar a mistura através de um papel filtro de 12,5 cm de diâmetro. E proceder como descrito no item 5.
Britânica - 2000 e 2001								
Européia - 2002								
Espanhola - 2002								
Portuguesa - 2002								

Tabela 1B. Polifenóis Totais

Farmacopéia	Monografia	1	2	3
Francesa – 1974	<i>Ratanhia racine</i>	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água.	Adicionar a 2,0 mL desta solução, 1,0 mL de ácido fosforúngstico R e 17,0 mL de uma solução 38% (m/v) de carbonato de sódio R.	Medir a absorvância da solução (E1) de 354 a 750 nm, exatamente 2 minutos após a adição do último reagente, utilizando água como branco.
Européia - 1976	<i>Rhataniae radix</i>			
Alemã -1987	<i>Ratanhia radix</i>	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água.	Adicionar a 5,0 mL desta solução 1,0 mL da solução de ácido fosforúngstico R e diluir a 50,0 mL, em balão volumétrico, com uma solução de carbonato de sódio R 15% (m/v).	Medir a absorvância da solução (A1) em 715 nm exatamente 2 minutos após a adição do último reagente, utilizando água como branco.
Européia - 1997	<i>Ratanhia radix</i>			
Britânica – 1999	<i>Rhatany root</i>			
Brasileira IV ed – 1988 (1996)	<i>Hamamelidis folium</i>	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água.	Adicionar a 5,0 mL desta solução, 2,0 mL da solução de ácido fosforúngstico SR e diluir a 50,0 mL, em balão volumétrico, com solução de carbonato de sódio SR.	Medir a absorvância da solução (A1) em 715 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água como branco.
Britânica - 1999	<i>Hamamelis leaf</i>			
Alemã -1998				
Britânica – 2000 e 2001				
Européia 2002	Método geral para determinação de taninos	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água.	Adicionar a 2,0 mL desta solução, 1,0 mL do reagente molibdato-tungstato R, bem como 10,0 mL de água e diluir a 25,0 mL, em um frasco volumétrico de 25,0 mL, com uma solução de carbonato de sódio R 29,0 % (m/v).	Determinar a absorvância da solução (A1) em 760 nm após 30 minutos utilizando água como branco.
Espanhola - 2002				
Portuguesa 2002				
Brasileira IV ed – 1988 (2003)	<i>Eugeniae folium</i>	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água.	Adicionar a 5,0 mL desta solução, 2,0 mL do reagente de Folin-Denis. Diluir a 50,0 mL com uma solução de carbonato de sódio SR.	Determinar a absorvância (A1) em 715 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente. Utilizar água como branco.

Tabela 1C. Fração não-tanante – polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele

Farmacopéia	Monografia	Etapas de Preparação		
		1	2	3
Francesa - 1974	<i>Ratanhia racine</i>	Adicionar a 10,0 mL de filtrado, 0,10 g de pó de pele CRS e agitar vigorosamente durante 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água	*
Européia - 1976	<i>Ratanhia radix</i>	Adicionar a 10,0 mL de filtrado, 0,10 g de pó de pele CRS e agitar vigorosamente durante 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água	*
Alemã - 1987	<i>Ratanhia radix</i>	Adicionar a 10,0 mL de filtrado, 0,10 g de pó de pele CRS e agitar vigorosamente durante 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água	*
Européia - 1997	<i>Ratanhia radix</i>		Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água	*
Brasileira IV ed – 1988 (1996)	<i>Hamamelidis folium</i>	Adicionar a 20,0 mL do filtrado 0,2 g de pó-de-pele e agitar vigorosamente por 60 min. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água	*
Alemã – 1998	Método geral para determinação de taninos	Adicionar a 10,0 mL do filtrado 0,10 g de pó de pele CRS e agitar durante 60 minutos. Filtrar a mistura.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água R.	*
Britânica- 1999	<i>Hamamelis leaf</i>	A 20,0 mL do filtrado adicionar 0,20 g de pó de pele CRS e agitar vigorosamente por 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água R.	*
Britânica- 1999	<i>Rhatany rot</i>	A 10,0 mL do filtrado adicionar 0,10 g do pó de pele CRS e agitar vigorosamente por 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água R.	*
Britânica – 2000 e 2001	Método geral para determinação de taninos	A 10,0 mL do filtrado adicionar 0,10 g do pó de pele CRS e agitar vigorosamente por 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água R.	*
Espanhola - 2002		A 10,0 mL do filtrado adicionar 0,10 g do pó de pele CRS e agitar vigorosamente por 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água R.	*
Européia - 2002		A 10,0 mL do filtrado adicionar 0,10 g do pó de pele CRS e agitar vigorosamente por 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água R.	*
Portuguesa - 2002	<i>Eugeniae folium</i>	A 10,0 mL do filtrado adicionar 0,10 g do pó de pele CRS e agitar vigorosamente por 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água R.	*
Brasileira IV ed – 1988 (2003)		A 20,0 mL do filtrado adicionar 0,20 g de pó de pele e agitar mecanicamente, por 60 minutos. Filtrar.	Diluir 5,0 mL do filtrado a 25,0 mL com água R.	*

Tabela 1D. Solução de Referência

Farmacopéia	Monografia	Etapas de Preparação			Obs
		1	2	3	
Francesa - 1974	<i>Ratanhiae racine</i>	Colocar 50,0 mg de pirogalol (R) exatamente pesados em um balão volumétrico e completar a 100,0 mL com água.	Colocar 5,0 mL desta solução em outro balão volumétrico e completar à 100,0 mL com água.	*	Conservar esta solução ao abrigo da luz e do ar e medir a absorvância dentro de 30 min a partir da dissolução do pirogalol.
Européia – 1976					
Alemã – 1987	<i>Ratanhiae radix</i>	Dissolver 50,0 mg de pirogalol com água a 100,0 mL.	Diluir 5,0 mL desta solução com água a 100,0 mL.	*	Medir a absorvância dentro de 15 minutos após a dissolução do pirogalol.
Brasileira IV ed – 1988 (1996)	<i>Hammamelidis folium</i>				
Européia - 1997	<i>Ratanhiae radix</i>				
Britânica – 1999	<i>Hammamelis leaf</i>				
Britânica- 1999	<i>Rhatany root</i>				
Brasileira - 2003	<i>Eugeniae folium</i>	Dissolver 50,0 mg de pirogalol R com água a 100,0 mL .	Diluir 5,0 mL desta solução a 100,0 mL com água.*	*	
Alemã – 1998	Método geral para determinação de taninos				
Britânica- 2000 e 2001					
Espanhola – 2002					
Européia 2002					
Portuguesa - 2002					

\* As etapas subsequentes são idênticas às adotadas para determinação de polifenóis totais, a partir do item 2. O valor de absorvância obtido designa-se por A<sub>2</sub> ou E<sub>2</sub> dependendo da Farmacopéia

Tabela 1E. Cálculos

Farmacopéia	Monografia	Cálculo do teor de taninos totais (%)
Francesa - 1974	<i>Ratanhia racine</i>	$\frac{4,2 \times 3,125 (E_1 - E_2)}{p \times E_3}$
Européia - 1976	<i>Rhataniae radix</i>	
Alemã - 1987	<i>Ratanhia radix</i>	$\frac{13,12 (A_1 - A_2)}{A_3 \times m}$ <p>m = massa da amostra em g</p> <p>Obs.: somente a F. Brasileira considera a determinação de água na droga seca.</p>
Brasileira IV ed – 1988 (1996)	<i>Hamamelidis folium</i>	
Européia - 1997	<i>Ratanhia radix</i>	
Britânica - 1999	<i>Hamamelis leaf</i>	
Britânica- 1999	<i>Rhatany root</i>	
Brasileira IV ed – 1988 (2003)	<i>Eugeniae folium</i>	
Alemã - 1998		
Britânica- 2000 e 2001		$\frac{62,5 (A_1 - A_2) \cdot m_2}{A_3 \times m_1}$ <p>m1 = massa da amostra em g</p> <p>m2 = massa de pirogalol em g</p>
Espanhola - 2002	Método geral para determinação de taninos	
Européia - 2002		
Portuguesa - 2002		



Tabela 1F. Soluções Reagentes

Farmacopéia		Monografia	Solução de ácido fosfotúngstico - Etapas da preparação				
			1	2	3	4	5
Francesa - 1974		<i>Ratanhia racine</i>	Misturar 10 g de tungstato de sódio	+ 8,0 mL ácido fosfórico	+ 75,0 mL de água	Aquecer durante 3 horas sob refluxo	Resfriar. Diluir com água a 100,0 mL
Européia – 1976		<i>Rhataninae radix</i>	Misturar 10 g de ácido tungstico R	+ 8,0 mL ácido fosfórico R	+ 75,0 mL de água	Aquecer durante 3 horas sob refluxo	Resfriar. Diluir com água a 100,0 mL
Brasileira IV ed – 1988 (1996)		<i>Hamamelidis folium</i>					
Alemã –1987		<i>Rhataninae radix</i>	Misturar 10 g de tungstato de sódio	+ 8,0 mL de ácido fosfórico 85% SR	+ 75,0 mL de água	Aquecer sob refluxo por 3 horas	Resfriar. Diluir com água a 100,0 mL
Européia - 1997		<i>Rhataninae radix</i>					
Britânica – 1999		<i>Hamamelis leaf</i>	Dissolver 10 g de tungstato de sódio em 75mL de água	adicionar 8,0 mL de ácido ortofosfórico		Aquecer sob refluxo por 3 horas	Resfriar, filtrar e adicionar água suficiente para obter 100 mL
Britânica – 1999		<i>Rhatany root</i>					

Farmacopéia		Monografia	Designação	Reagente fosfomolibdotúngstico – Etapas da preparação									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Alemã –1998													
Britânica- 2000 e 2001													
Espanhola - 2002	Método Geral para determinação de taninos		Reagente molibdato-tungstato R (Folin-Ciocalteu)	Pesar 100 g de tungstato de sódio R	+ 25 g de molibdato de sódio R	Solubilizar em 700,0 mL de água R.	Adicionar 100,0 mL HCl 36% R	+ 50,0 mL de ác. fosfórico 85% R	Aquecer a mistura durante 10 horas sob refluxo em aparato de vidro.	Adicionar 150 g de sulfato de lítio R	+ 50 mL de água. Adicionar algumas gotas bromo.	Ferver a mistura para remover o excesso de bromo durante 15 minutos.;refresfriar; diluir a 1000,0 mL com água R e filtrar.	O reagente deve apresentar coloração amarela. Caso apresente coloração esverdeada, é insatisfatório para utilização; pode ser regenerado pela fervura com algumas gotas de bromo R e deve ser novamente fervido para retirar o excesso de bromo Armazenamento 2 a 8 graus
Européia 2002													
Portuguesa - 2002													
Brasileira IV ed – 1988 (2003)	<i>Eugeniae folium</i>	Reagente Folin-Denis		A 75,0 mL de água adicionar 10,0 g de tungstato de sódio	+ 2,0 g de ácido fosfomolibdotungstico	+ 5,0 mL de ácido fosfórico.	Manter em refluxo por 2 horas. Resfriar.	Diluir a 100,0 mL com água. A solução apresenta coloração esverdeada.					

Tabela 1F. Soluções Reagentes - continuação

Farmacopéia	Monografia	Solução de carbonato de sódio R
Francesa - 1974	<i>Ratanhia racine</i>	Carbonato de sódio 38% (m/v)
Européia – 1976	<i>Ratanhia radix</i>	
Alemã –1987	<i>Ratanhia radix</i>	Carbonato de sódio anidro 15,0 % m/V
Européia - 1997	<i>Ratanhia radix</i>	
Britânica – 1999	<i>Rhatany root</i>	
Brasileira IV ed – 1988 (1996)	<i>Hamamelidis folium</i>	Carbonato de sódio anidro a 10,6% m/V
Britânica – 1999	<i>Rhatany root</i> <i>Hamamelis leaf</i>	
Alemã –1998	Método geral para determinação de taninos	Carbonato de sódio anidro 29,0% m/V
Britânica- 2000 e 2001		
Espanhola - 2002		
Européia 2002		
Portuguesa - 2002		

A elaboração das tabelas 1A até a 1F contou com a colaboração do Prof. Dr. George G. Ortega, Profa. Dra. Amélia T. Henriques, Simone G. Verza e Maria T. Kreinecker. Dados não publicados

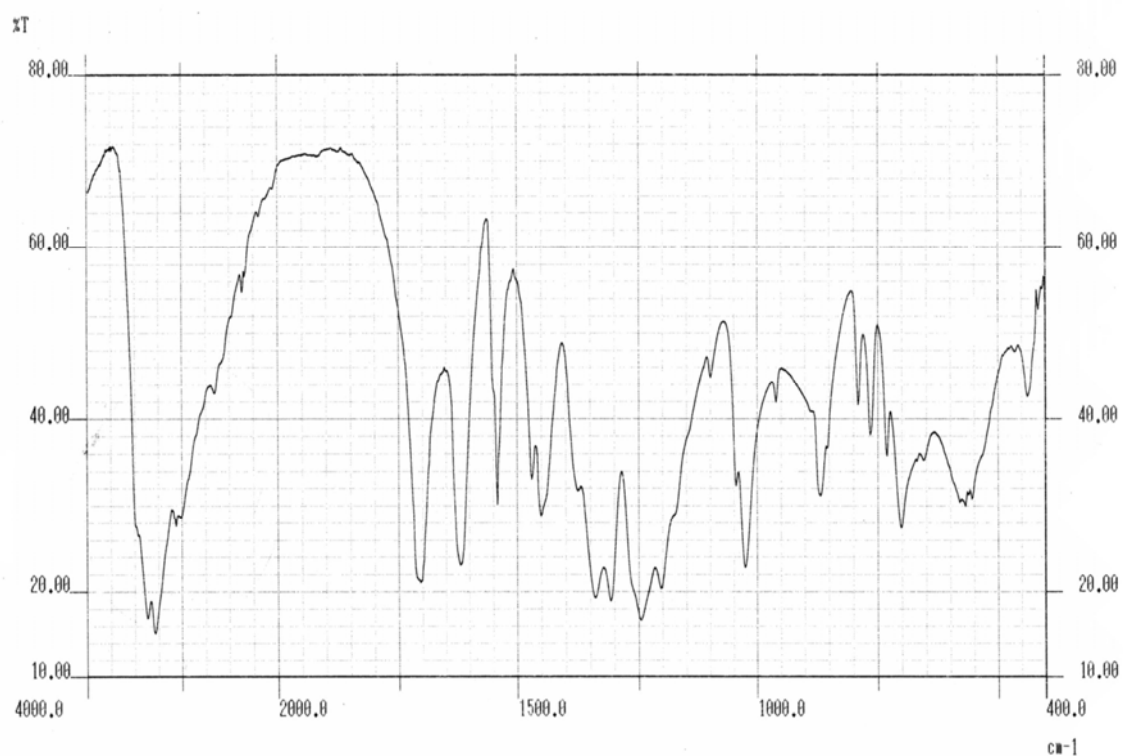


Figura 1A. Espectro na região do infravermelho do ácido gálico em pastilhas de KBr.

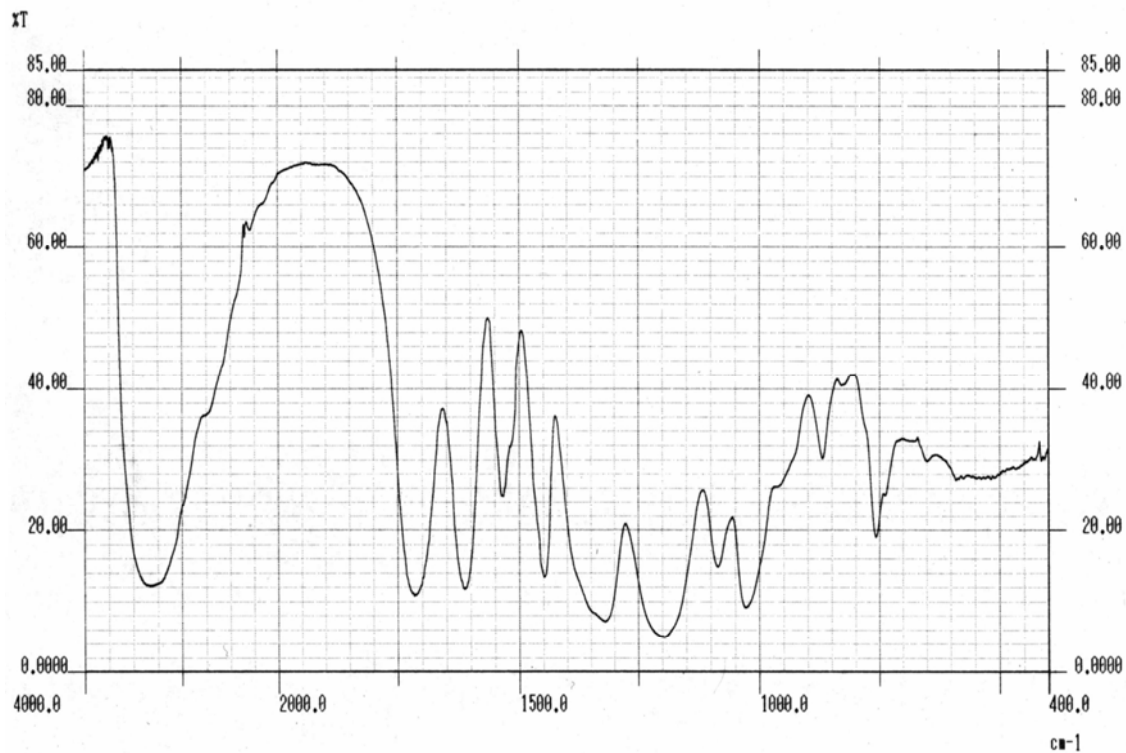


Figura 1B. Espectro na região do infravermelho do ácido tânico em pastilhas de KBr.

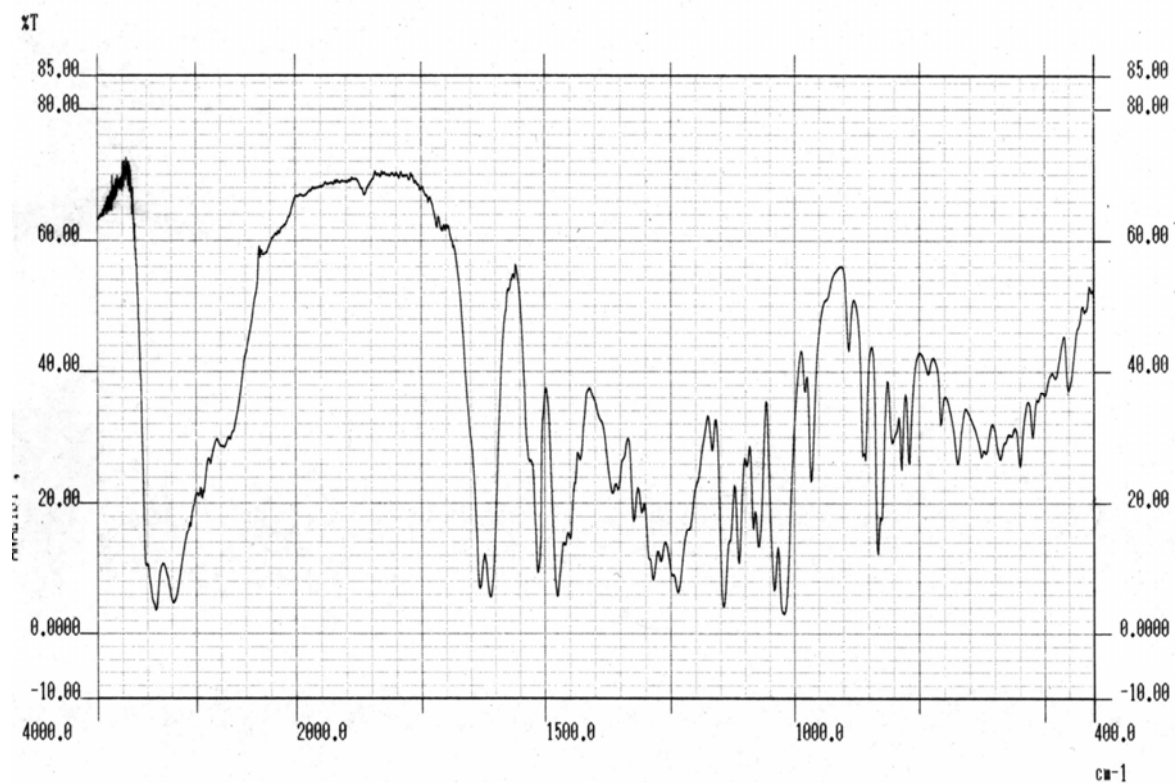


Figura 1C. Espectro na região do infravermelho da catequina em pastilhas de KBr.

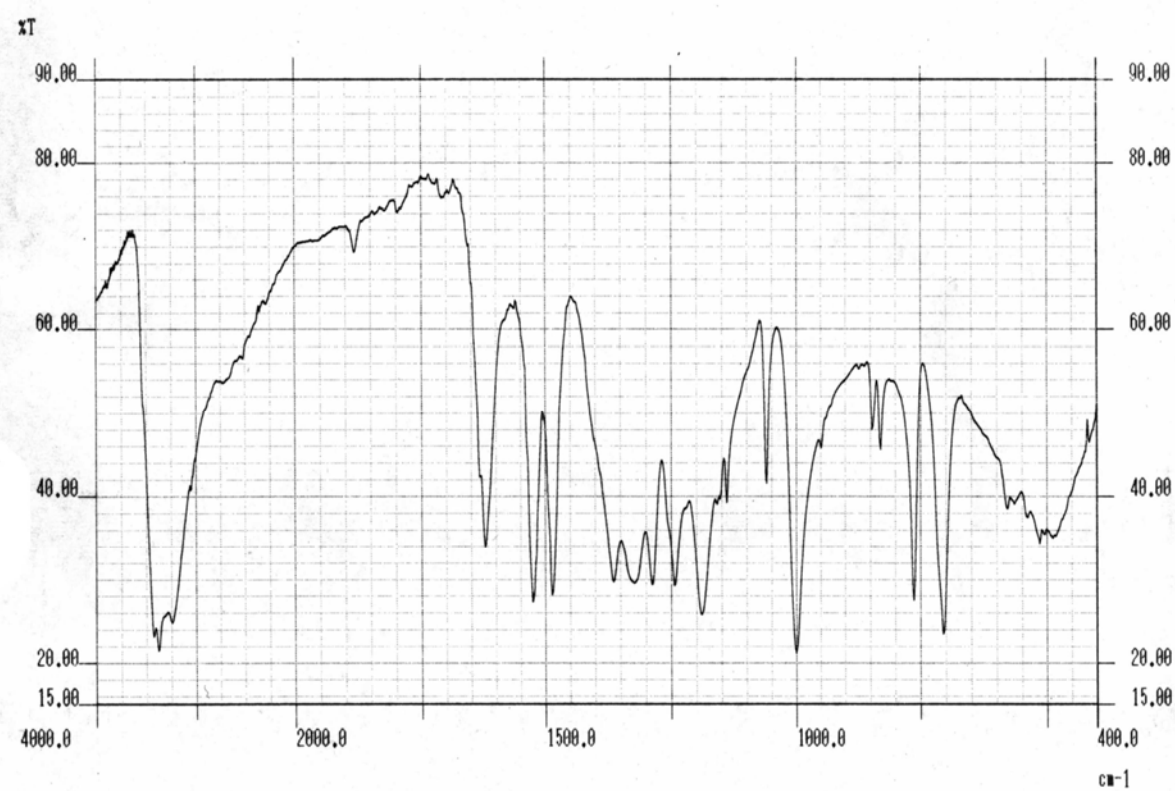


Figura 1D. Espectro na região do infravermelho do pirogalol em pastilhas de KBr.

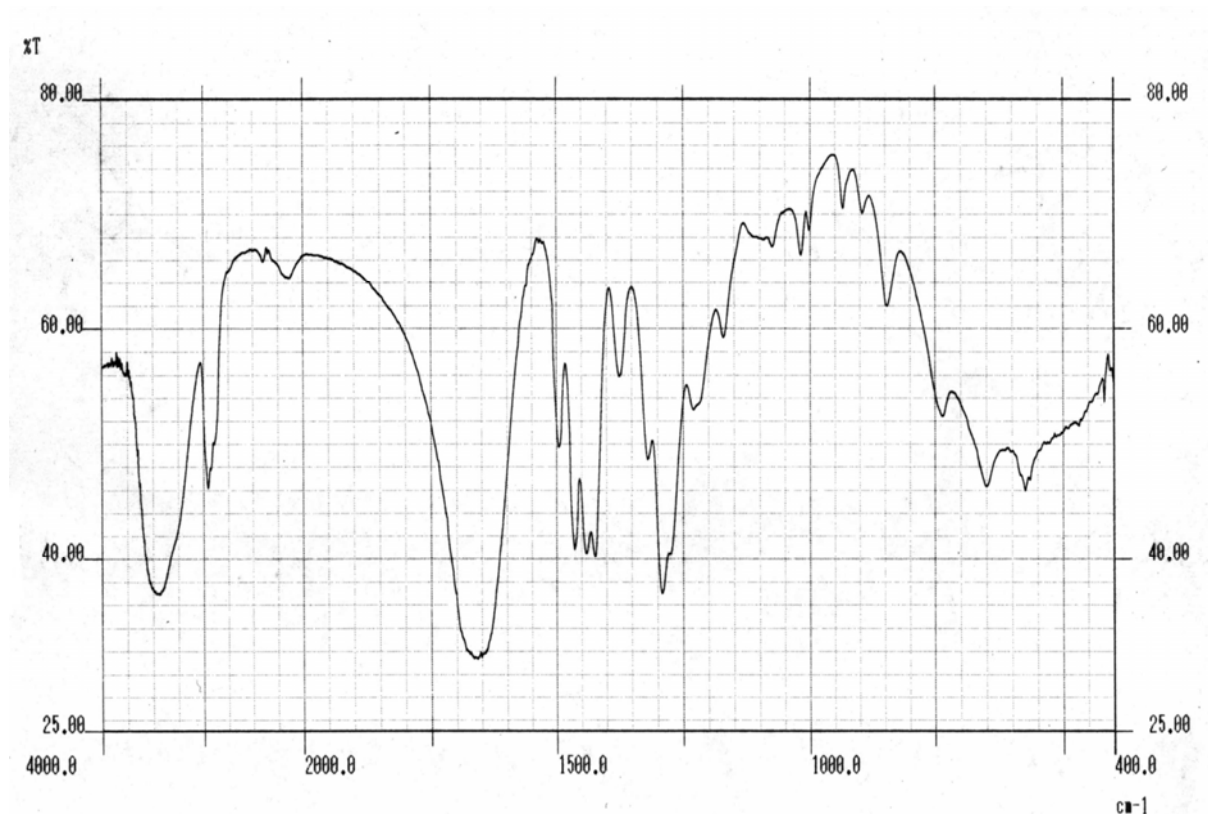


Figura 1E. Espectro na região do infravermelho das PVPP em pastilhas de KBr.

Tabela 2A. Valores médios da absorvância (UA) e CV % obtidos para a fração não-tanante com caseína purificada durante três dias de análise, em triplicata.

Quantidade caseína	Dia 1; CV%	Dia 2; CV%	Dia 3; CV%	Média; CV%
100,0 mg	0,357; 3,32	0,3167; 1,12	0,3704; 1,65	0,3480; 8,03*
200,0 mg	0,2183; 2,19	0,2573; 1,84	0,3363; 1,22	0,2706; 22,24*
300,0 mg	0,1783; 2,60	0,3065; 1,05	0,2617; 1,49	0,2488; 26,14*
400,0 mg	0,1684; 2,01	0,1567; 1,19	0,1086; 3,51	0,1456; 21,90*
500,0 mg	0,0496; 20,50	0,2498; 4,81	0,0369; 13,19	0,1122; 106,48*

Nota: CV %: coeficiente de variação percentual (n = 3); \* n = 9

Tabela 3A. Valores médios da absorvância (UA) e CV % obtidos para a fração não-tanante com caseína grau técnico durante três dias de análise, em triplicata.

Quantidade caseína	Dia 1; CV%	Dia 2; CV%	Dia 3; CV%	Média; CV%
100,0 mg	0,4440; 0,13	0,4465; 1,32	0,4421; 1,31	0,4442; 0,50*
200,0 mg	0,4250; 0,88	0,4286; 0,43	0,4082; 1,74	0,4172; 2,49*
300,0 mg	0,3749; 2,48	0,3625; 2,018	0,3774; 1,08	0,3716; 2,15*
400,0 mg	0,3342; 1,41	0,3509; 1,04	0,3264; 1,12	0,3372; 3,71*
500,0 mg	0,3169; 1,45	0,3034; 1,57	0,2929; 1,24	0,3044; 3,96*
600,0 mg	0,3088; 0,76	0,3005; 1,07	0,2796; 1,98	0,2947; 4,46*
700,0 mg	0,1963; 2,14	0,1418; 2,87	0,1885; 2,69	0,1755; 16,78*
800,0 mg	0,0746; 6,51	0,0577; 1,34	0,0550; 4,71	0,0624; 17,02*

Nota: CV %: coeficiente de variação percentual (n = 3); \* n = 9

Tabela 4A. Absorvâncias obtidas (UA) para a solução extrativa e fração não-tanante (FNT) de *Psidium guajava* antes e após a adição de rutina.

	Sem adição rutina	Contaminado com rutina
<b>Polifenóis totais</b>	0,5947	0,7262
	0,5913	0,7405
	0,5906	0,7279
<b>Média; CV %</b>	<b>0,5922; 0,36</b>	<b>0,7315; 1,06</b>
<b>FNT (400 mg de caseína)</b>	0,3448	0,4428
	0,3415	0,4444
	0,3452	0,4427
<b>Média; CV%</b>	<b>0,3438; 0,59</b>	<b>0,4433; 0,21</b>
<b>FNT (600 mg de caseína)</b>	0,3656	0,3525
	0,3617	0,3597
	0,3612	0,3739
<b>Média; CV%</b>	<b>0,3628; 0,67</b>	<b>0,3620; 3,01</b>

Nota: CV %: coeficiente de variação percentual (n = 3).

Tabela 5A. Áreas dos picos de ácido gálico, catequina e flavonóides complexados com diferentes quantidades de caseína e pó-de-pele. Detecção em 280 nm (ácido gálico e catequina) e 352 nm (flavonóides).

Detecção	280 nm		352 nm					
	AG CV %	CAT CV%	Pico 1 CV%	Pico 2 CV%	Pico 3 CV%	Pico 4 CV%	Pico 5 CV%	Pico 6 CV%
SE	756308,33 3,87	355988,67 5,44	211259,67 4,64	484263 2,87	498337 2,84	304879 4,95	1829781 2,19	104888 3,19
SE + 100 mg de caseína	634707,67 6,29	239379,33 7,49	145489,33 0,86	200359,33 1,26	210617,67 0,34	146976,67 0,90	822999 0,32	34539,67 0,46
SE + 400 mg de caseína	524379,33 0,47	131133,33 1,69	95326,67 1,56	69407 3,86	76458 0,55	62348,33 1,34	206837 0,38	4395,33 5,10
SE + 800 mg de caseína	494989,33 2,07	62391,67 9,16	10883,67 5,36	33634,67 6,23	34012,33 2,63	26174 2,16	72131,33 3,18	10017 2,64
SE + 1600 mg de caseína	390362,67 3,84	86639 2,63	15600 4,30	14914,67 4,48	18363,33 3,70	13389,33 4,67	26297,67 6,26	-
SE + 50 mg de pó-de-pele	373557,67 2,09	138427,33 1,04	58271 1,74	198685,33 1,16	223450,33 0,61	150488 2,71	347445,3 0,95	21319,33 1,70
SE + 100 mg de pó-de-pele	299407 3,26	142331,67 5,05	38769,67 1,40	174514,33 1,85	194412,67 0,42	135160,7 2,50	196593,3 0,81	11144,67 5,64

Nota: AG: ácido gálico; CAT: catequina; SE: solução extrativa; CV %: coeficiente de variação percentual (n = 3).

Tabela 6A. Absorvâncias obtidas na complexação de diferentes PVPP com ácido gálico (AG), ácido tânico (AT), catequina, (CAT), pirogalol (Piro) e solução extrativa (SE).

Concentração PVPP	AG; CV%	AT; CV%	CAT; CV%	Piro; CV%	SE; CV%
0	0,5895; 1,50	0,6906; 0,63	0,6959; 2,04	0,7045; 0,70	0,5808; 0,88
0,5 mg mL <sup>-1</sup> PVPP	0,4050; 0,63	0,3054; 0,67	0,4672; 0,77	0,7125; 1,04	0,2678; 0,95
2,5 mg mL <sup>-1</sup> PVPP	0,3072; 2,43	0,0956; 0,43	0,1033; 2,56	0,6812; 0,71	0,1072; 1,23
7,5 mg mL <sup>-1</sup> PVPP	0,1863; 2,01	0,0560; 6,23	0,0264; 2,14	0,6146; 0,65	0,0952; 2,36
15 mg mL <sup>-1</sup> PVPP	0,1653; 0,89	0,0273; 15,25	0,0179; 8,37	0,5045; 0,40	0,0956; 0,82
0,5 mg mL <sup>-1</sup> K- CL	0,4918; 1,14	0,3087; 2,77	0,4803; 2,04	0,7207; 0,76	0,4007; 0,85
2,5 mg mL <sup>-1</sup> K- CL	0,2531; 0,41	0,1358; 0,20	0,1230; 2,00	0,6578; 1,06	0,1990; 0,41
7,5 mg mL <sup>-1</sup> K- CL	0,1166; 10,9	0,0395; 19,29	0,0339; 7,18	0,5631; 0,75	0,1402; 2,00
15 mg mL <sup>-1</sup> K- CL	0,060; 11,44	0,0809; 1,29	0,0223; 8,04	0,4676; 1,81	0,1032; 0,24
0,5 mg mL <sup>-1</sup> DIV F	0,4579; 1,50	0,2971; 1,92	0,4653; 2,66	0,7146; 0,66	0,3650; 0,57
2,5 mg mL <sup>-1</sup> DIV.F	0,2405; 1,72	0,1446; 8,23	0,0496; 5,30	0,7046; 0,76	0,1529; 0,24
7,5 mg mL <sup>-1</sup> DIV F	0,1053; 3,15	0,0472; 14,91	0,0115; 16,06	0,5585; 0,67	0,0809; 14,49
15 mg mL <sup>-1</sup> DIV F	0,0756; 10,74	0,0651; 10,34	0,0086; 16,01	0,4703; 0,52	0,0671; 14,49
0,5 mg mL <sup>-1</sup> DIV RS	0,5895; 1,50	0,3022; 4,88	0,4099; 1,11	0,7040; 0,60	0,3956; 0,43
2,5 mg mL <sup>-1</sup> DIV RS	0,2919; 2,34	0,1065; 3,39	0,1084; 8,26	0,6730; 1,86	0,1604; 0,61
7,5 mg mL <sup>-1</sup> DIV RS	0,1069; 1,73	0,1031; 0,95	0,0367; 4,53	0,5558; 1,20	0,1149; 5,70
15 mg mL <sup>-1</sup> DIV RS	0,0812; 13,61	0,0632; 11,28	0,0383; 7,66	0,4833; 2,60	0,0859; 8,81

Nota: CV%: coeficiente de variação percentual (n = 3).



Tabela 7A. Valores de absorvância (UA) obtidos para a utilização de PVPP-P6755 purificada e não purificada quando complexada com catequina. Detecção 280 nm.

Quantidade de PVPP-P6755	PVPP-P6755 não purificada; CV%	PVPP-P6755 purificada; CV%
0	0,6769; 0,35	0,6769; 0,35
0,25 mg mL <sup>-1</sup>	0,5745; 0,08	0,5780; 0,51
0,5 mg mL <sup>-1</sup>	0,4968; 1,19	0,4810; 1,08
1,25 mg mL <sup>-1</sup>	0,2874; 3,05	0,3272; 0,97
2,5 mg mL <sup>-1</sup>	0,1576; 4,52	0,1861; 4,27
5,0 mg mL <sup>-1</sup>	0,0747; 11,60	0,0576; 2,80
7,5 mg mL <sup>-1</sup>	0,0879; 1,10	0,0469; 2,79
15 mg mL <sup>-1</sup>	0,0831; 9,26	0,0887; 6,38

Nota: CV%: coeficiente de variação percentual (n = 3).

Tabela 8A. Valores de absorvância obtidos (UA) para a complexação de catequina com suspensão de PVPP-P6755 (15 mg mL<sup>-1</sup>) em diferentes valores de pH. Detecção em 280 nm e 290 nm.

Quantidade de PVPP adicionada	Absorvância (UA); CV%
0	0,3287; 1,15
PVPP-P6755 15 mg mL <sup>-1</sup> ; pH = 2,94	0,1015; 5,28
PVPP-P6755 15 mg mL <sup>-1</sup> pH = 3,36	0,0951; 2,78
PVPP-P6755 15 mg mL <sup>-1</sup> pH = 5,2	0,1199; 1,90
PVPP-P6755 15 mg mL <sup>-1</sup> pH = 6,99	0,0955; 5,54
PVPP-P6755 15 mg mL <sup>-1</sup> pH = 7,98	0,0966; 3,82
PVPP-P6755 15 mg mL <sup>-1</sup> pH = 8,43	0,2499; 0,901
PVPP-P6755 15 mg mL <sup>-1</sup> pH = 8,99	0,3277; 0,76
PVPP-P6755 15 mg mL <sup>-1</sup> pH = 9,39	0,3659; 1,08

Nota: CV%: coeficiente de variação percentual (n = 3).

Tabela 9A. Valores de absorvância (UA) obtidos pela adição de dispersões de PVPP-P6755 à rutina em diferentes concentrações. Detecção em 352 nm.

Quantidade de PVPP adicionada	PVPP-P6755; CV%	K-CL; CV%	DIV. F CV%	DIV. RS; CV%
0	0,7173; 1,21	0,7173; 1,21	0,7173; 1,21	0,7173; 1,21
0,5 mg mL <sup>-1</sup>	0,7536; 1,41	0,7760; 0,96	0,7374; 2,56	0,7831; 2,04
7,5 mg mL <sup>-1</sup>	0,5902; 1,79	0,5407; 1,49	0,5499; 3,76	0,5992; 0,74
15 mg mL <sup>-1</sup>	0,4699; 1,84	0,438; 1,39	0,4316; 1,64	0,4427; 1,83

Nota: CV%: coeficiente de variação percentual (n = 3).

Tabela 10A. Valores de absorvância (UA) obtidos para uma solução de catequina e rutina quando complexada com dispersões de diferentes concentrações de PVPP-P6755. Detecção em 280 e 352 nm.

Quantidade de PVPP adicionada	280 nm; CV%	352 nm; CV%
0	0,9982; 1,03	0,3481; 1,00
0,5 mg mL <sup>-1</sup>	0,8002; 1,03	0,3216; 1,15
2,5 mg mL <sup>-1</sup>	0,3480; 0,57	0,2409; 0,48
7,5 mg mL <sup>-1</sup>	0,1630; 0,48	0,1419; 0,51
15 mg mL <sup>-1</sup>	0,0946; 2,80	0,0891; 2,92

Nota: CV%: coeficiente de variação percentual (n = 3).

Tabela 11A. Valores de absorvância (UA) obtidos para uma solução de pirogalol e rutina quando complexada com dispersões de diferentes concentrações de PVPP-P6755. Detecção em 267 e 352 nm.

Quantidade de PVPP adicionada	267 nm; CV%	352 nm; CV%
0	1,06; 0,23	0,3331; 0,72
0,5 mg mL <sup>-1</sup>	1,15; 0,79	0,3509; 0,75
2,5 mg mL <sup>-1</sup>	1,02; 0,66	0,2980; 0,71
5,0 mg mL <sup>-1</sup>	0,91; 0,48	0,2597; 0,74
7,5 mg mL <sup>-1</sup>	0,83; 0,30	0,2336; 0,76
15 mg mL <sup>-1</sup>	0,69; 2,93	0,1986; 3,82

Nota: CV%: coeficiente de variação percentual (n = 3).

Tabela 12A. Áreas dos picos de ácido gálico + pirogalol, catequina e rutina complexados com diferentes quantidades de PVPP-P6755. Detecção em 280 nm e 352 nm.

	AG + Piro; CV%	CAT; CV%	RUT; CV%
SP	5467300; 0,34	1164392; 0,60	2504255; 0,30
SP + 10 mg PVPP	4366836; 0,04	302975,7; 0,27	2109140; 0,04
SP + 50 mg PVPP	2395323; 0,27	40067,67; 0,25	1259656; 0,41
SP + 150 mg PVPP	2314442; 0,01	12162; 6,41	621578,7; 0,32
SP + 300 mg PVPP	2637174; 0,30	3319; 10,59	339835,3; 0,68

Nota: CV%: coeficiente de variação percentual (n = 3).; SP: solução dos padrões; AG: ácido gálico; Piro: pirogalol; CAT: catequina; RUT: rutina.

Tabela 13A. Valores de absorvância obtidos para a solução extrativa de *Psidium guajava* sem o tratamento com PVPP-P6755 e após o tratamento com diferentes quantidades de PVPP-P6755. Detecção em 760 nm.

Quantidade PVPP-P6755	Dia 1; CV%	Dia 2; CV%	Dia 3; CV%	Média; CV%
0 (PT)	0,6023; 2,24	0,6363; 1,66	0,6125; 1,26	0,6170; 2,83*
10,0 mg	0,3744; 2,09	0,3582; 4,04	0,3796; 2,70	0,3707; 3,01*
250,0 mg	0,1294; 3,67	0,1572; 6,85	0,1433; 9,75	0,1433; 9,69*
50,0 mg	0,1099; 8,47	0,1259; 11,59	0,1183; 8,82	0,1180; 6,75*
75,0 mg	0,1160; 14,37	0,1270; 14,47	0,1075; 3,36	0,1168; 8,37*
100,0 mg	0,0618; 3,80	0,1205; 6,19	0,0910; 15,07	0,0911; 32,16*
150,0 mg	0,1215; 8,82	0,0690; 26,34	0,1169; 15,94	0,1025; 28,36*
300,0 mg	0,0632; 10,33	0,0833; 10,22	0,0714; 10,37	0,0727; 13,89*

Nota: CV%: coeficiente de variação percentual (n = 3);\* n = 9; PT: polifenóis totais.

Tabela 14A. Áreas dos picos de ácido gálico, catequina e flavonóides de *Psidium guajava* complexados com diferentes quantidades de PVPP-P6755. Detecção em 280 (ácido gálico e catequina) e 352 nm (flavonóides).

Detecção	280 nm		352 nm					
	AG CV %	CAT CV%	Pico 1 CV%	Pico 2 CV%	Pico 3 CV%	Pico 4 CV%	Pico 5 CV%	Pico 6 CV%
SE	756308,33 3,87	355988,67 5,44	211259,67 4,64	484263 2,87	498337 2,84	304879 4,95	1829781 2,19	104888 3,19
SE + 10 mg PVPP	539641,67 2,26	83540,67 1,94	134695 3,16	137108,67 1,43	102632,67 1,00	106681 0,25	819915 0,14	16776,33 1,17
SE + 20 mg PVPP	522618 0,25	-	131393,33 2,84	76005,33 1,19	46467,67 1,36	68226 1,41	553717,7 0,36	15365,33 6,64
SE + 30 mg PVPP	433453 4,76	-	112411,67 1,53	42531,67 3,82	25176,33 2,04	42568,33 0,67	321737 2,84	14318,67 4,96
SE + 40 mg PVPP	397960,33 4,40	-	97371 1,33	29874,67 1,72	17549,33 3,49	31153,67 2,54	225277,7 0,99	11395,33 8,83
SE + 50 mg PVPP	320726,33 1,62	-	67409 0,64	19554,67 3,18	11345,67 5,09	21424,67 2,20	130437,7 1,57	9062,5 4,34
SE +150 mg PVPP	277204,67 0,97	-	23732,67 2,56	-	-	6647 5,20	32049 1,76	8442 4,01
SE + 300 mg PVPP	228465,33 0,32	-	9743,33 8,81	-	-	-	10218,67 21,98	8626 9,94

Nota: AG: ácido gálico; CAT: catequina; SE: solução extrativa; CV%: coeficiente de variação percentual; n = 3.