

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS EM *EUGENIA PUNICIFOLIA***

**Bolsista: Carolina Carvalho Pacheco**

**MANAUS**

**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**RELATÓRIO FINAL**

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS EM *EUGENIA PUNICIFOLIA*  
PIB-S/0056/2009**

**Bolsista: Carolina Carvalho Pacheco  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiane Pereira de Souza**

**MANAUS  
2010**

## **APRESENTAÇÃO**

Neste relatório são descritas as atividades realizadas no período correspondente a agosto de dois mil e nove a junho de dois mil e dez. O trabalho contém introdução, objetivos, revisão bibliográfica sobre o tema, descrição da metodologia empregada, resultados e discussão, assim como a bibliografia consultada.

## RESUMO

O controle de qualidade vem se tornando uma etapa essencial para assegurar a eficácia e segurança de fitoterápicos. Para isso, os métodos de quantificação de compostos biologicamente ativos estão entre as principais ferramentas utilizadas para a avaliação da qualidade de produtos de origem vegetal. Sendo assim, os taninos têm sido amplamente empregados como substâncias marcadoras para a avaliação da qualidade dessas matérias-primas. As principais metodologias de avaliação fundamentam-se na capacidade de formação de complexos com macromoléculas. A espécie vegetal *Eugenia punicifolia*, conhecida popularmente como pedra-ume-caá, é amplamente utilizada na região amazônica, principalmente contra distúrbios glicêmicos, mas também utilizada no tratamento de ferimentos e doenças infecciosas, febre, resfriado e problemas no fígado. Assim, o trabalho tem como objetivo otimizar metodologia analítica para quantificação de taninos em *Eugenia punicifolia*. A matéria-prima vegetal, constituída por folhas de *E. punicifolia*, foi caracterizada através da perda por dessecação, teor extrativo e análise granulométrica por tamisação. A solução extrativa elaborada por meio de infusão e contendo a relação droga:solvente de 7,5:100 (m/v), foi caracterizada através da determinação do resíduo seco, densidade e pH. O doseamento espectrofotométrico no UV-vis se deu por medição direta e após complexação com o reagente de Folin-Denis. Na otimização da metodologia foi determinado o comprimento de onda ideal e a influência do tipo e concentração de agente complexante utilizando 50, 100 e 150 mg de caseína, polivinilpirrolidona (PVP) e celulose microcristalina, respectivamente. As metodologias foram validadas através dos ensaios de linearidade, repetibilidade e exatidão tanto para a substância de referência (ácido gálico) quanto para a solução extrativa. Os resultados foram avaliados através de ANOVA e análise de regressão e correlação linear utilizando o pacote de programa estatístico do Excel 2003. As condições ideais de análise para leitura direta são o  $\lambda = 270$  nm e utilização de 150 mg do agente complexante polivinilpirrolidona (PVP), o qual determinou elevado teor de taninos ( $18,24 \pm 0,02$  g%) na espécie em estudo. Além disso, ao se comparar a metodologia direta e após complexação com Folin-Denis, quanto ao teor de taninos utilizando-se PVP 150 mg, observou-se que não houve diferença significativa entre os dois métodos. Com relação a validação da metodologia analítica por leitura direta verificou-se que tanto o padrão como a solução extrativa apresentaram linearidade com  $r^2$  acima de 0,99, precisão abaixo de 1% e exatidão acima de 90%. Não foi possível validar a metodologia após complexação com Folin-Denis, uma vez que apenas o parâmetro linearidade apresentou-se dentro da faixa ideal. De acordo com os resultados, o método de medição direta para quantificação do teor de taninos por espectrofotometria a 270 nm foi validado apresentando-se linear, específico e preciso, de baixo custo e fácil execução.

**Palavras-chave:** *Eugenia punicifolia*, taninos, validação metodologia analítica

## ABSTRACT

Quality control is becoming an essential step to ensure the safety and efficacy of herbal medicines. For this, methods for quantification of biologically active compounds are among the main tools used to assess quality of products of plant origin. Thus, the tannins have been widely used as marker substances for assessing the quality of raw materials. The main methodologies are based on the ability to form complexes with macromolecules. The plant species *Eugenia punicifolia*, popularly known as pedra-ume-caá, is widely used in the Amazon region, especially against glucose disorders, but also used to treat injuries and infectious diseases, fever, colds and liver problems. Thus, the work aims to optimize the analytical methodology for quantification of tannins in *Eugenia punicifolia*. The raw plant consisting of leaves of *E. punicifolia* was characterized by loss on drying, extractive content and particle size analysis by sieving. The extractive solution prepared by infusion, containing the ratio drug: solvent 7,5:100 (w/v) was characterized by determining the dry weight, density and pH. The spectrophotometric assay UV-Vis occurred by direct measurement and after complexation with the Folin-Denis. In the optimization of the methodology was given the ideal wavelength and influence the type and concentration of complexing agent with 50, 100 and 150 mg of casein, polyvinylpyrrolidone (PVP) and microcrystalline cellulose, respectively. The methodologies were validated through the testing of linearity, repeatability and accuracy for both reference substance (gallic acid) and for the extractive solution. The results were evaluated by ANOVA and regression analysis and linear correlation using the statistical software package Excel 2003. The ideal conditions for direct reading of analysis are  $\lambda = 270$  nm and using 150 mg of complexing agent polyvinylpyrrolidone (PVP), which determined high tannin content ( $18.24 \pm 0.02$  g%) in this species. Moreover, when comparing the direct method and after complexation with Folin-Denis, on the tannin content using 150 mg PVP, it was observed that there was no significant difference between the two methods. Regarding the validation of analytical methodology for direct reading was found that both the pattern and the extractive solution showed linearity with  $r^2$  above 0.99, down 1% precision and accuracy above 90%. Unable to validate the method after complexation with Folin-Denis, since only the parameter linearity was within the ideal range. According to the results, the direct measurement method for quantification of tannin content by spectrophotometry at 270 nm was validated presenting linear, specific, accurate, low cost and easy implementation

**Keyword:** *Eugenia punicifolia*, tannins, analytical methodology validation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto de <i>Eugenia punicifolia</i> coletada na EMBRAPA.....	15
Figura 2 - Ramos Floridos da <i>Eugenia punicifolia</i> .....	17
Figura 3 - Caracteres comuns às espécies de <i>Eugenia punicifolia</i> (H.B.K) DC.....	17
Figura 4 - <i>Eugenia punicifolia</i> : Ramo, Inflorescência em fascículo, Botão floral, Corte transversal do ovário, Fruto .....	18
Figura 5 - Estrutura Química dos Taninos .....	22
Figura 6 - Esquema do doseamento espectrofotométrico de taninos totais .....	41
Figura 7 - Histograma de distribuição da matéria-prima vegetal <i>E. punicifolia</i> .....	47
Figura 8 - Curva de retenção e passagem da matéria-prima vegetal <i>E. punicifolia</i> .....	47
Figura 9 - Espectro de varredura da solução extrativa (em roxo) e do padrão ácido gálico (em preto) através de leitura direta.....	49
Figura 10 - Espectro de varredura da solução extrativa (em verde) e do padrão ácido gálico (em azul) após leitura utilizando o reagente de Folin-Denis .....	50
Figura 11 - Curva de Calibração para o ácido gálico após leitura direta .....	51
Figura 12 - Curva de Calibração para o ácido gálico após reação com Folin-Denis.....	52
Figura 13 – Gráfico da determinação do teor de taninos totais (TT) por leitura direta .....	53
Figura 14 - Influência da concentração do reagente de Folin-Denis sobre a absorbância de polifenóis totais .....	54
Figura 15 - Influência do tempo de leitura sobre a absorbância dos polifenóis após reação com o reagente de Folin-Denis .....	54
Figura 16 - Curva de calibração da solução extrativa após medição direta.....	56
Figura 17 - Curva de calibração da solução extrativa após reação com o reagente de Folin-Denis .....	57

**LISTA DE TABELA**

Tabela 1 - Tipo e concentração de agentes complexantes .....	40
Tabela 2 - Caracterização da Matéria-Prima Vegetal .....	46
Tabela 3 - Caracterização da solução extrativa.....	48
Tabela 4 - Parâmetros de regressão da curva de Calibração para o ácido gálico após leitura direta .....	51
Tabela 5 - Parâmetros de regressão da curva de Calibração para o ácido gálico após reação com Folin-Denis.....	52
Tabela 6: Teor de taninos totais em extrato seco de <i>E. puniceifolia</i> após reação com Folin-Denis e por leitura direta.....	55
Tabela 7 - Linearidade para o padrão ácido gálico e para a solução extrativa após medição direta.....	56
Tabela 8 - Repetibilidade do padrão ácido gálico e solução extrativa.....	56
Tabela 9 - Resultados do estudo de recuperação do ácido gálico pela solução extrativa de <i>E. puniceifolia</i> .....	57
Tabela 10 - Linearidade para o padrão ácido gálico e para a solução extrativa após reação com o reagente de Folin-Denis .....	58
Tabela 11 - Repetibilidade do padrão ácido gálico e solução extrativa após reação com o reagente de Folin-Denis .....	58
Tabela 12 - Resultados do estudo de recuperação do ácido gálico pela solução extrativa de <i>E. puniceifolia</i> após reação com o reagente de Folin-Denis .....	58

## SUMÁRIO

Apresentação .....	III
Resumo.....	IV
Abstract .....	V
Lista de figuras.....	VI
Lista de tabelas.....	VII
1. Introdução .....	10
2. Objetivos .....	13
3. Revisão Bibliográfica.....	14
3.1 Família Myrtaceae e gênero <i>Eugenia</i> .....	14
3.2 <i>Eugenia puniceifolia</i> .....	15
3.2.1 Aspectos Botânicos .....	16
3.2.2 Composição Química.....	18
3.2.3 Estudos Farmacológicos .....	19
3.3 Taninos.....	20
3.3.1 Características químicas de taninos .....	20
3.3.2 Atividade biológica e utilização dos taninos.....	22
3.3.3 Métodos de identificação e quantificação de taninos.....	24
3.3.3.1 Métodos colorimétricos para polifenóis totais .....	25
3.3.3.2 Métodos baseados na precipitação de proteínas .....	27
3.3.3.2.1 Método direto por precipitação de proteínas.....	28
3.3.3.3 Complexação com derivados da povidona.....	28
3.4 Espectrofotometria UV-Vis .....	29
3.5 Validação de metodologia analítica .....	29
3.5.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos.....	31
3.5.1.1 Especificidade .....	31
3.5.1.2 Intervalo .....	32
3.5.1.3 Linearidade.....	32
3.5.1.4 Exatidão .....	33
3.5.1.5 Precisão .....	33
3.5.1.6 Robustez.....	34
3.5.1.7 Sensibilidade .....	34
3.5.1.8 Limite de detecção .....	34
3.5.1.9 Limite de quantificação.....	35
4. Metodologia .....	36
4.1 Material Vegetal.....	36
4.2 Tratamento do material vegetal e obtenção da Matéria-Prima Vegetal (MPV) .....	36
4.3 Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV) .....	36
4.3.1. Determinação de perda por dessecação .....	36
4.3.2. Análise granulométrica por tamisação .....	36
4.3.3 Teor de extrativos.....	37
4.4 Obtenção da solução extrativa e do extrato seco .....	37
4.4.1 Caracterização da solução extrativa.....	37
- Determinação de resíduo seco .....	38
- Determinação de densidade .....	38
- Determinação do pH.....	38
4.5 Otimização de metodologia analítica para quantificação de taninos em <i>Eugenia puniceifolia</i> .....	38



4.5.1 Doseamento Espectrofotométrico .....	38
4.5.2 Seleção do comprimento de onda de leitura ideal.....	39
4.5.2.1 Medição direta.....	39
4.5.2.2 Medição após complexação com Folin-Denis .....	39
4.5.3 Obtenção de curva de calibração do padrão Ácido Gálico .....	39
4.5.3.1 Medição direta.....	39
4.5.3.2 Medição após complexação com Folin-Denis .....	39
4.5.3.3 Determinação do coeficiente de extinção molar ( $A_{1cm}^{1\%}$ ) do padrão de ácido gálico.....	40
4.5.4 Determinação do tipo e concentração do agente complexante .....	40
4.5.5 Doseamento espectrofotométrico dos Taninos totais.....	41
4.5.5.1 Doseamento espectrofotométrico de Polifenóis Totais e Fração não-tanante através de leitura de direta para determinação de Taninos totais.....	41
4.5.5.2 Doseamento espectrofotométrico de PT e FNT através de reação com reagente Folin-Denis para determinação de Taninos totais .....	42
4.5.5.3 Determinação do teor de taninos totais (TT) .....	42
4.5.6 Otimização de doseamento espectrofotométrico através de reação com reagente Folin-Denis.....	43
4.5.6.1 Influência da concentração do reagente sobre a absorbância no doseamento de polifenóis totais .....	43
4.5.6.2 Influência do tempo de leitura .....	43
4.5.7 Validação de metodologias analíticas .....	43
4.5.7.1 Linearidade.....	43
4.5.7.2 Exatidão .....	44
4.5.7.3 Repetibilidade .....	45
4.5.8 Análise Estatística .....	45
5. Resultados e Discussão .....	46
5.1. Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV) .....	46
5.2 Caracterização da solução extrativa .....	47
5.3 Doseamento Espectrofotométrico .....	48
5.3.1 Seleção do comprimento de onda de leitura ideal.....	48
5.3.1.1 Medição direta.....	48
5.3.1.2 Medição após reação com Folin-Denis .....	49
5.3.2 Curva de calibração do padrão Ácido Gálico .....	50
5.3.2.1 Medição direta.....	50
5.3.2.2 Medição após reação com Folin-Denis.....	51
5.3.3 Seleção de tipo e concentração de agente complexante para determinação de taninos totais .....	52
5.4 Otimização de metodologia analítica para quantificação de taninos em <i>Eugenia punicifolia</i> utilizando o reagente de Folin-Denis.....	53
5.4.1 Influência da concentração do reagente sobre a absorbância no doseamento e polifenóis totais .....	53
5.4.2 Influência do tempo de leitura .....	54
5.4.3 Determinação do teor de taninos totais (TT) após reação com Folin-Denis.....	55
5.5 Validação de metodologias analíticas .....	55
5.5.1 Medição direta.....	55
5.5.2 Medição após reação com o reagente de Folin-Denis.....	57
6. Conclusão.....	59
6. Referências Bibliográficas .....	60
7. Cronograma.....	66

## 1. Introdução

De acordo com a OMS, 60-80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou fitoterapia no tratamento de doenças (OMS, 2002). Nos últimos anos, a utilização de produtos farmacêuticos elaborados a partir de plantas medicinais teve um crescente aumento fazendo com que o faturamento no mercado mundial de fitoterápicos, que girava em torno de 22 bilhões de dólares em 2001, passasse a ser de 60 bilhões/ano, atraindo a atenção de grandes indústrias (WHO, 2006). Entre os fatores responsáveis por tal crescimento, está a diminuição de efeitos colaterais por parte deste tipo de medicamento, segurança, eficácia, menor custo que medicamentos sintéticos e o maior interesse da população por terapias alternativas (GRUNWALD, 1995).

Para as matérias-primas vegetais, o estabelecimento de parâmetros de controle é fundamental para assegurar a qualidade dos medicamentos fitoterápicos. No entanto, para esse tipo de matéria-prima, os requisitos exigidos não são fáceis de serem alcançados, pois a qualidade depende de fatores tais como a variabilidade biológica, formas de cultivo e de coleta, além de alterações introduzidas com as operações posteriores, tais como secagem, armazenamento e moagem, que podem modificar, significativamente, a complexa composição do material vegetal e/ou seu produto derivado. Dessa forma, para que haja reprodutibilidade na qualidade de fitomedicamentos é necessário que um rígido protocolo de controle seja implementado desde a produção do material vegetal, passando pelas operações de transformação, prosseguindo até a avaliação da forma farmacêutica final (SIMÕES *et al.*, 2005).

Os métodos de quantificação de compostos ativos estão entre as principais ferramentas utilizadas para a avaliação da qualidade de produtos de origem vegetal. Através destes é possível avaliar se os parâmetros envolvidos nas operações de transformação modificam os compostos químicos ou teor destes. No entanto, para diversos vegetais, que apresentam atividade terapêutica comprovada, ainda não foi possível estabelecer quais substâncias ou grupo de substâncias são responsáveis por sua atividade biológica. Nos casos acima citados, substâncias marcadoras são normalmente utilizadas como parâmetros para o controle de qualidade da espécie vegetal. Estes marcadores, por sua vez, não precisam ser necessariamente o responsável pela atividade farmacológica, mas devem estar presentes em todos os produtos do ciclo de transformação da droga vegetal (LIST e SCHMIDT, 1989).

Os polifenóis são um grupo de substâncias presentes na maioria das espécies vegetais. Os taninos, uma das classes de polifenóis, apresentam estrutura diversificada e se encontram divididos em dois grandes grupos: hidrolisáveis (derivados do ácido gálico) e condensados (polímeros de flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis). Estes compostos encontram-se amplamente distribuídos pelo reino vegetal e apresentam inúmeras atividades biológicas (MELLO e SANTOS, 2001).

Dessa forma, os taninos têm sido amplamente empregados como substâncias marcadoras para a avaliação da qualidade de diversas matérias-primas vegetais. As principais metodologias de avaliação fundamentam-se na capacidade de formação de complexos com proteínas. Assim, através de sua separação por precipitação ou filtração, a quantificação pode ser realizada por gravimetria ou absorciometria (STICHER, 1999; MELLO e SANTOS, 2001; SOARES, 2002).

*Eugenia punicifolia*, espécie nativa da flora amazônica e conhecida popularmente como pedra-ume-caá, apresenta grande potencial terapêutico principalmente como hipoglicemiante (REVILLA, 2001; BORRÁS, 2003). Estudos realizados com extratos a partir de folhas de *E. punicifolia* revelam uma possível atividade antagonista de receptores colinérgicos (GRANJEIRO *et al.*, 2006). Além disso, a literatura registra que algumas espécies do gênero *Eugenia* sp. apresentam compostos químicos com grande potencial antiinflamatório e antimicrobiano (GARCIA *et al.*, 1999; BELTRAME *et al.*, 2001). O uso de partes da planta, através de infusão, é muito comum pela população Amazônica (REVILLA, 2001; BORRÁS, 2003).

O controle de qualidade de fitoterápicos é imprescindível no meio comercial, pois muitas espécies vegetais são vendidas sem quaisquer garantia de qualidade, favorecendo, desde a venda de espécies falsificadas, até o armazenamento inadequado durante a sua comercialização. Diante desta realidade, se torna fundamental a sistematização de técnicas para uma melhor comprovação científica da real utilização dos fitoterápicos e validação dos processos tecnológicos de cultivo e produção (CARVALHO *et al.*, 2008).

O emprego de medicamentos de origem vegetal requer, para a constância dos efeitos terapêuticos, que a droga vegetal ou formas farmacêuticas derivadas tenham sua qualidade mantida dentro de parâmetros preestabelecidos; e a verificação desta adequabilidade ao uso, denominada de padronização, deve ser feita ao nível das características físico-químicas, físicas, químicas, botânicas e biológicas (PETROVICK *et al.*, 1988). Para tanto, faz-se necessário à existência de metodologias de quantificação das substâncias químicas adequadas e validadas para cada espécie vegetal.

A determinação do teor de taninos totais, por espectrofotometria, tem como base os métodos preconizados pela Farmacopéia Alemã para *Krameria argentea* (raiz de ratânia) (DEUTSCHES, 1976 e 1986) e pelo método oficial da AOAC (Association of official Analytical Chemists) (HEBRICH, 1990). Ambos os métodos fundamentam-se na medição das absorvâncias da fração de polifenóis totais, onde são detectados, além de taninos, polidioxicarboxiácidos, flavonóides e outros polifenóis, de acordo com seus grupos funcionais. A absorvância resulta da redução não específica do reagente de Folin-Denis (ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico) pelos polifenóis, formando um complexo azul de politungstato (HARTKE e MUTSCHLER, 1987). Os taninos totais são quantificados a partir da diferença da absorvância dos polifenóis totais e da fração não tanante (substâncias não precipitadas por um agente precipitante) e são expressos em gramas por cento de droga seca.

A análise do princípio implícito no método o torna, a primeira vista, de aplicação geral para os taninos, desde que as características próprias de cada droga vegetal sejam levadas em consideração. Na verdade, cada espécie vegetal apresenta particularidades que invalida a utilização dessa metodologia de uma maneira geral. Assim, cada matriz biológica apresenta reações específicas com o reativo de Folin-Denis e com os agentes precipitantes utilizados, que devem ser levados em consideração de modo a garantir um resultado final verdadeiro.

## 2. Objetivos

### Geral:

Otimizar metodologia analítica para quantificação de taninos em *Eugenia punicifolia*.

### Específicos:

- Caracterizar a matéria-prima vegetal *Eugenia punicifolia*;
- Obter soluções extrativas a partir de *Eugenia punicifolia*;
- Avaliar a viabilidade de utilização de diferentes agentes complexantes para quantificação de taninos na matéria-prima vegetal de *E. punicifolia*;
- Estabelecer condições ótimas para quantificação de taninos: comprimento de onda; tipo e concentração do agente complexante e tempo de reação;
- Validação da metodologia analítica.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Família Myrtaceae e gênero *Eugenia*

Myrtaceae é uma das maiores famílias botânicas com milhares de espécies reunidas em aproximadamente 3000 espécies e cerca de 80 gêneros (DE OLIVEIRA et al, 2006; SILVA et al, 2007). Destaca-se como uma das famílias mais importantes devido suas árvores e arbustos serem largamente espalhados nas florestas brasileiras e distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do globo (DE OLIVEIRA et al, 2005; DE OLIVEIRA et al, 2006). Muitas de suas espécies são cultivadas, seja por conta dos frutos comestíveis, seja com finalidade ornamental ou, ainda, visando-se a extração de essências de valor comercial. Tem como espécies mais frequentes *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC., *E. sulcata* Spring ex Mart., *E. bahiensis* DC., *E. copacabanensis* Kiaersk. e *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) D.Legrand (SOUZA, 2008).

Esta família está dividida em duas subfamílias: Myrtoideae e Leptospermoideae e, no Brasil, todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae, onde se inclui o gênero *Eugenia* (DE OLIVEIRA et al, 2006).

Espécies de Myrtaceae são empregadas principalmente em distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos, doenças infecciosas, sua ação podendo estar relacionada às propriedades adstringentes da planta. As partes mais usadas são as folhas, cascas e também os frutos que são comumente consumidos (CRUZ et al, 2004).

O perfil químico da família Myrtaceae caracteriza-se pela presença de taninos, flavonóides, mono- e sesquiterpenos, triterpenóides, derivados do floroglucinol, cromenos, estilbenóides e outros (CRUZ et al, 2004).

O gênero *Eugenia* é considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com aproximadamente 500 espécies de árvores e arbustos, dos quais cerca de 400 distribuem-se no Brasil e assumem destaque especial por fornecer extratos utilizados na medicina tradicional como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios (GERHARDT et al, 2008), antidiabéticos, nas arritmias ou insuficiência cardíaca, analgésica (GERHARDT et al, 2008), antipirética (GERHARDT et al, 2008), entre outras aplicações (DE OLIVEIRA et al, 2006; BRUNETTI et al, 2006). No Brasil, entre as espécies populares e apreciadas encontram-se a jaboticabeira (*E. edulis* Vell.), a pitangueira (*E. uniflora* L.), o jambolão (*E. jambolana* Lam.) e o cravo da Índia (*E. caryophyllata* Thunb.).

Estudos químicos com espécies de *Eugenia* revelaram, sobretudo, a presença de flavonóides, taninos, terpenóides e óleos essenciais (DE OLIVEIRA et al, 2005; DE

OLIVEIRA et al, 2006; ROMAGNOLO et al, 2006; FRIGHETTO et al., 2005), enquanto, sob o ponto de vista farmacológico, estudos realizados com extratos brutos e compostos, comprovaram as atividades antiinflamatória, analgésica, antifúngica, antipirética; hipotensiva, antidiabética e antioxidante (DE OLIVEIRA et al, 2006).

### 3.2 *Eugenia punicifolia*

Espécie nativa da flora amazônica e amplamente distribuída no Amazonas, *Eugenia punicifolia* é conhecida popularmente como pedra-ume-caá (Figura 1) (GRANJEIRO et al., 2006; JORGE et al, 2000), murta e muta (CRUZ et al, 2004; VIEIRA & MARTINS, 2000).



Figura 1 - Foto de *Eugenia punicifolia* coletada na EMBRAPA

Infusões de *Eugenia punicifolia* são amplamente utilizadas, embora empiricamente, para tratar distúrbios hipoglicemiantes, tais como Diabetes Mellitus (GRANJEIRO et al., 2006; JORGE et al, 2000; CRUZ et al, 2004). Sua utilização popular se dá pela decocção ou infusões de folhas frescas (GRANJEIRO et al., 2006). Infusões alcoólicas de folhas são usadas no tratamento de ferimentos e doenças infecciosas (DE OLIVEIRA et al, 2005). Além disso, as folhas e raízes são usadas para febre, resfriado, diabetes e problemas no fígado (CRUZ et al, 2004; VIEIRA & MARTINS, 2000). A decocção das folhas e das raízes são úteis nos casos de diarreia, enterites, hemorragias e aftas (JORGE et al, 2000).

A espécie *E. punicifolia* apresenta a seguinte classificação taxonômica (ZIPCODEZOO, 2009):

**Domínio:** *Eucariota* - Whittaker & Margulis, 1978 - eukaryotes

**Reino:** *Plantae* - Haeckel, 1866 - Plants

**Sub-reino:** *Viridiplantae* - Cavalier-Smith, 1981

**Filo:** Tracheophyta - Sinnott, 1935 Ex Cavalier-Smith, 1998 - Vascular Plants

**Classe:** *Magnoliopsida* - Brongniart, 1843 – Dicotyledons

**Subclasse:** *Rosidae* - Takhtajan, 1967

**Superordem:** *Myrtales* - Takhtajan, 1967

**Ordem:** *Myrtales* - Reichenbach, 1828

**Subordem:** *Myrtineae*

**Família:** *Myrtaceae* - Adans., 1763, Nom. Cons. - Myrtle Family

**Gênero:** *Eugenia* - Linnaeus, 1753 - Stopper

**Epíteto específico:** *punicifolia*- (Kunth) DC.

**Nome botânico:** *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC.

### 3.2.1 Aspectos Botânicos

*E. punicifolia* tem aspecto arbustivo até arbóreo, podendo atingir até 3 m de altura, possui crescimento clonal e em uma mesma formação arbustiva pode-se encontrar de 10 a 50 ramos saindo do solo, oriundos de uma mesma ligação vegetativa (SILVA et al, 2007).

Distribui-se por quase todo Brasil, Paraguai e Venezuela, ocorrendo em diversas fitofisionomias. Já foi encontrada na formação herbácea fechada de cordão arenoso, na arbustiva aberta não inundável, na arbustiva fechada de cordão arenoso, na arbustiva fechada de pós-praia, floresta de cordão arenoso, na floresta de duna e no complexo florestal inundável. Sua floração ocorre de junho a março e frutificação durante quase todo ano (SOUZA & MORIM, 2008).

Apresenta inflorescências racemosas com flores pediceladas inseridas nas axilas foliares. Apresentam de quatro a sete nós foliares por ramo vegetativo e, durante o pico de floração, as flores se destacam da folhagem dando um aspecto branco às plantas, assim como ocorre em muitas outras espécies de *Myrtaceae*. Esta agregação de flores é o que caracteriza a floração em massa, e pode ser considerada como uma estratégia para atração dos polinizadores (SILVA et al, 2007).

As flores são hermafroditas, com quatro pétalas alvas curvadas sobre o hipanto e quatro sépalas também flexionadas sobre esta estrutura, proporcionando um maior destaque ao androceu (Figura 2). O androceu é polistêmone com muitos estames, variando de 42,4 em *Eugenia punicifolia*. Os estames apresentam filetes filiformes e anteras globosas, bitecas e deiscência longitudinal. Em *E. punicifolia* as anteras são de coloração branca (SILVA et al, 2007).



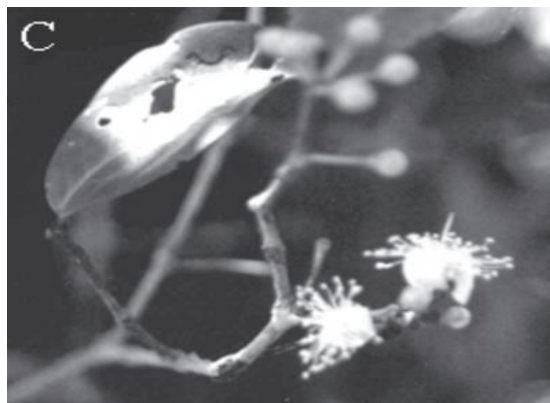


Figura 2 - Ramos Floridos da *Eugenia puniceifolia*. Fonte: SILVA et al, 2007.

As folhas são elípticas ou obovadas (JORGE et al, 2000; SOUZA & MORIM, 2008), com ápice curto obtuso-acuminado, base cuneada ou aguda, bordo revoluto, cartáceas a coriáceas, discolores, pontuações não visíveis a olho nu; 20-100 x 10-65 mm (SOUZA & MORIM, 2008). Nas folhas encontra-se nervura primária única, mediana, fina para o ápice, espessa na base e sulcada na face adaxial e saliente na abaxial; nervuras secundárias alternas e opostas com 11 pares e (Figura 3a) apresentando terminações vasculares com inúmeras anastomoses do tipo escorpióide, rede de nervura densa, às vezes simples bifurcadas, com nervura marginal 1-3 mm do bordo (Figuras 3b e 2c) e pecíolo 2-5 mm de comprimento (ALVAREZ et al, 2006).

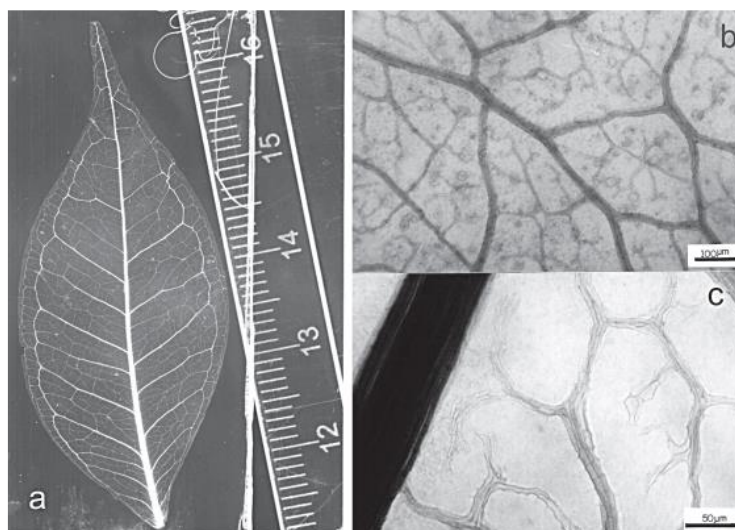


Figura 3 - Caracteres comuns às espécies de *Eugenia puniceifolia* (H.B.K) DC: a) padrão de venação foliar; b) rede de nervuras; c) terminação vascular. Fonte: ALVAREZ et al, 2006.

Possui baga globosa ou elipsóide, até 10 mm de diâmetro e vermelha quando madura (Figura 4) (SOUZA & MORIM, 2008).

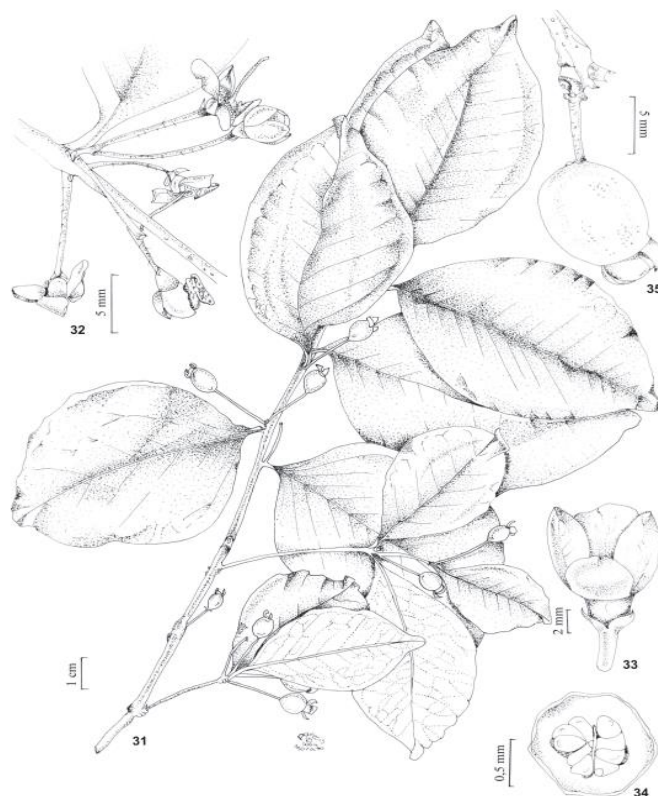


Figura 4 - *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC.: 31. Ramo (Menezes 650). 32. Inflorescência em fascículo. 33. Botão floral. 34. Corte transversal do ovário (Pereira 4108). 35. Fruto (Menezes 650). Fonte: SOUZA & MORIM, 2008.

### 3.2.2 Composição Química

Levantamento bibliográfico sobre o estudo fitoquímico da espécie *E. puniceifolia* revelou uma citação referente à constituição química do óleo essencial das folhas provenientes de duas regiões próximas à Manaus. Em ambas as amostras, o  $\beta$ -cariofileno (amostra “A”: 32,9% e B: 23,6%) foi o constituinte majoritário (DE OLIVEIRA et al, 2005).

Estudo realizado da composição química do óleo essencial das folhas de *E. puniceifolia* nativas de duas localidades de Matas Serranas de Pernambuco e comparação com as de outras regiões do Brasil, relatou que o linalol foi o constituinte majoritário, seguido pelo  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -terpineol. Nesse estudo, os monoterpenos: 1,8-cineol; *cis e trans*-óxido de linalol; isoborneol; terpinen-4-ol;  $\alpha$ -terpineol e os sesquiterpenos: elemol e  $\alpha$ -cadinol são relatados pela primeira vez na espécie *E. puniceifolia* (DE OLIVEIRA et al, 2005).

Além disso, outros estudos revelaram a presença de óleos essenciais nessa espécie vegetal, sendo os componentes principais:  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -elemeno e  $\alpha$ -humuleno (MAIA & ANDRADE, 2009).

### 3.2.3 Estudos Farmacológicos

Foi realizada uma investigação do efeito de extratos aquoso, butanólico e metanólico de folhas de *Eugenia punicifolia* administradas por gavagem em ratos diabéticos induzidos por *estreptozotocin* durante 26 a 29 dias. Descobriu-se que em ratos tratados com o extrato aquoso, a ingestão de alimentos e líquidos, o volume urinário e peso corporal foram reduzidos, enquanto para os ratos tratados com o extrato metanólico, não somente ocorreu a redução na ingestão de líquidos, do volume urinário e peso corporal, mas também, a redução de glicose urinária e uréia. Ratos tratados com o extrato butanólico mostraram sem alterações significativas em nenhum dos parâmetros medidos. O tratamento crônico com extratos não teve efeito sobre enzimas marcadoras nem sobre os níveis séricos de bilirrubina. Os resultados indicam que os extratos aquosos de folhas de *Eugenia punicifolia* produziram um efeito anoréxico e que os extratos metanólicos tiveram um efeito benéfico sobre o estado diabético melhorando o metabolismo de carboidratos e proteínas, sem provocar efeitos tóxicos hepatobiliares, microvascular, muscular ou pancreático (BRUNETTI et al, 2006).

Estudo realizado com extrato aquoso das folhas de *E. punicifolia* induziu hipoglicemia e efeitos hipotensores em condições normais e em cães pancreateomizados. Esse extrato também teve efeito hipoglicemiante em ratos alloxynizados (GRANJEIRO et al., 2006).

Além disso, foram investigados os efeitos do extrato aquoso bruto (5%) de *Eugenia punicifolia* na neurotransmissão nicotínica colinérgica. Foram estudadas as ações do extrato aquoso bruto sobre o efeito inibitório dos antagonistas colinérgicos nicotínicos galamina ou pancurônio, nas contrações induzidas pela estimulação elétrica do nervo frênico do diafragma de ratos. Os resultados mostram que o extrato aquoso de *E. punicifolia* recuperou a ação competitiva dos antagonistas nicotínicos na junção neuromuscular, ou seja, o extrato aquoso foi capaz de influenciar a neurotransmissão colinérgica no diafragma de ratos (GRANJEIRO et al., 2006).

Outro estudo verificou a atividade antioxidante do extrato hexânico de *E. punicifolia*, através da cromatografia em camada delgada e revelação com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), e teste com o radical DPPH e o extrato em solução metanólica. A atividade antioxidante evidenciada nos extratos hexânico e metanólico de *Eugenia punicifolia* indica que esta fração da planta pode ser de interesse na pesquisa de novas moléculas com possível impacto em doenças que apresentam o estresse oxidativo como fenomenologia básica (GONZAGA et al, 2007; GONZAGA et al, 2008).

### 3.3 Taninos

Os compostos do metabolismo secundário vegetal ou metabolismo especial apresentam um amplo valor nas interações entre a planta e seu ecossistema exercendo, por exemplo, o papel de fago-inibidores contra herbívoros ou como agentes antimicrobianos (MONTEIRO et al, 2005). Como metabólitos secundários, os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MELLO & SANTOS, 2001). Mais especificamente os taninos são substâncias de alto peso molecular, que contêm suficientes grupos hidroxila fenólica, para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (SOLON, 2006). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glucoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (MONTEIRO et al, 2005).

A ligação entre taninos e proteínas ocorre, provavelmente, através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas, emprestando uma duradoura estabilidade a estas substâncias. Para a formação destas ligações é necessário que o peso molecular dos taninos esteja compreendido entre limites bem definidos; se este é demasiadamente elevado, a molécula não pode se intercalar entre os espaços interfibrilares das proteínas ou macromoléculas; se é muito baixo, a molécula fenólica se intercala, mas não forma um número suficiente de ligações que assegure a estabilidade da combinação (MONTEIRO et al, 2005).

#### 3.3.1 Características químicas de taninos

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem fenólicos, os taninos são muito reativos quimicamente, formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares. Um mol de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas; fundamentando-se nessa propriedade pode-se identificar taninos por teste de precipitação de gelatinas (MELLO & SANTOS, 2001). Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (MONTEIRO et al, 2005).

A classificação dos taninos está baseada nas características estruturais e propriedades químicas e dividem-se em dois grupos principais: taninos hidrolisáveis, formados por éster de

ácido gálico e seus derivados (galotaninos, elagitaninos) e os taninos condensados (proantocianidinas poliméricas ou oligoméricas com diferentes acoplamentos de unidades flavônicas) (Figura 5) (TRUGILLHO et al, 1997).

Os taninos hidrolisáveis podem ser considerados como poliésteres da glucose, podendo ser classificados em duas categorias; (a) os galotaninos, que por hidrólise ácida liberam o ácido gálico e seus derivados; (b) os elagitaninos, que por hidrólise liberam o ácido elágico, ácido valônico, sendo o ácido elágico o mais importante. Os taninos hidrolisáveis são formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos (MONTEIRO et al, 2005; TRUGILLHO et al, 1997).

Numa linguagem genérica, os taninos condensados consistem de unidades de flavonóides possuindo diferentes graus de condensação e então invariavelmente associados com seus precursores inéditos, denominados de flavan-3-ols (catequina) e flavan 3-4 diols (leucoantocianidina) (MONTEIRO et al, 2005; TRUGILLHO et al, 1997). Largamente encontrados no reino vegetal, os taninos condensados ou proantocianidinas são produtos do metabolismo do fenilpropanol. As proantocianidinas, assim denominadas provavelmente pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina<sup>2</sup>, apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e a estereoquímica de seus compostos. A ocorrência destes compostos é comum em angiospermas e gimnospermas, principalmente em plantas lenhosas (MONTEIRO et al, 2005).

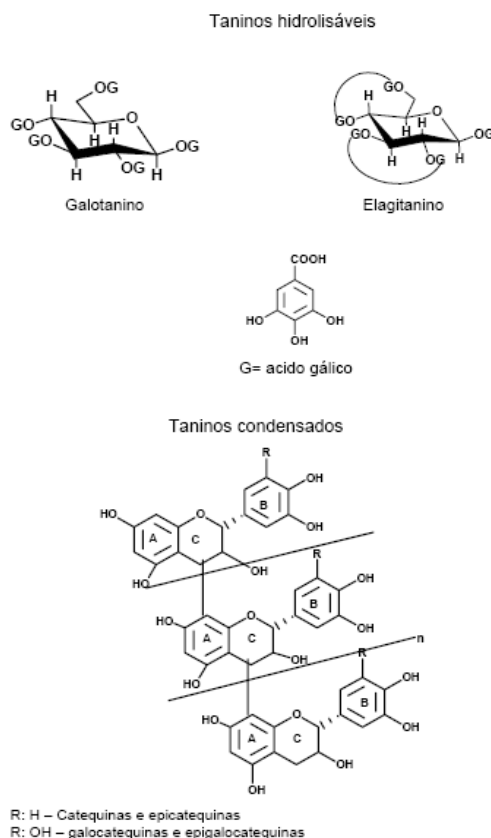


Figura 5 - Estrutura Química dos Taninos. Fonte: NEGRI, 2007.

### 3.3.2 Atividade biológica e utilização dos taninos

Na medicina tradicional plantas ricas em taninos são utilizadas no tratamento de diversas moléstias, tais como: diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais dentre outros (MELLO & SANTOS, 2001).

Os usos dos taninos são diversos, já foram identificadas atividades bactericidas, fungicidas, antiviral, moluscicida, inibição de enzimas, de peroxidação lipídica, sequestradora de radicais livres e antitumoral. Alguns taninos mostraram capacidade de inibir seletivamente a replicação do vírus HIV (NEGRI, 2007). Na indústria os taninos são usados no curtimento de couro, produção de vários tipos de polímeros, preservação de madeiras, entre outros (MELLO & SANTOS, 2001).

As atividades farmacológicas dos taninos são atribuídas a três ações (MELLO & SANTOS, 2001): Complexação com íons metálicos, Atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e complexação com macromoléculas: proteínas e polissacarídeos. Sendo que, a maioria das propriedades farmacológica destes polifenóis está relacionada à capacidade de formarem complexos com proteínas. Neste contexto, os taninos têm sido amplamente

empregados como substâncias marcadoras para a avaliação da qualidade de diversas matérias-primas vegetais (VERZA, 2006).

As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarréico e anti-séptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Ademais, os taninos são hemostáticos e, como precipitam alcalóides, podem servir de antídoto em casos de intoxicações. (MONTEIRO et al, 2005). Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (MELLO & SANTOS, 2001).

Provavelmente, devido à habilidade de ligar-se às proteínas e outras macromoléculas, os taninos também apresentam atividades tóxicas. Verificou-se que a rápida mortalidade de insetos tratados com taninos condensados parece ser devido à atividade tóxica destes compostos e não pela inibição da digestibilidade. Outro mecanismo de toxicidade, que pode envolver os taninos, deve-se ao fato desses complexarem-se com facilidade a íons metálicos. Sistemas biológicos, incluindo microrganismos, necessitam de íons metálicos como cofatores enzimáticos. Por ex., ratos tratados com bebidas ricas em compostos fenólicos tiveram redução da absorção de ferro (MONTEIRO et al, 2005).

Os taninos são considerados nutricionalmente indesejáveis porque precipitam proteínas, inibem enzimas digestivas e afetam a utilização de vitaminas e minerais podendo, ainda, em alta concentração, desenvolver câncer de bochecha e esôfago. Contraditoriamente, a atividade anticarcinogênica é evidenciada nos japoneses que consomem chá verde, rico em ácido tânico e outros polifenóis, em grandes quantidades o risco de câncer gástrico mostra-se baixo (MONTEIRO et al, 2005).

Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (MELLO & SANTOS, 2001). Sugere-se que os taninos parecem ter duplo efeito, por um lado, beneficiam a saúde devido a seu efeito quimiopreventivo contra carcinogênese ou atividades antimicrobianas, por outro lado, estão envolvidos possivelmente na formação de cânceres, hepatotoxicidade ou efeitos antinutricionais (MONTEIRO et al, 2005).

As propriedades antimicrobianas dos taninos são bem conhecidas e documentadas. Moléculas de taninos estão sendo testadas com a intenção de se descobrir uma droga eficiente

contra o HIV. Kilkuskie e colaboradores (1992) observaram que galotaninos mostraram 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. Concluíram que a atividade anti-HIV exibida por taninos é devida à inibição da transcriptase reversa, dificultando assim a replicação viral (MONTEIRO et al, 2005).

Os taninos em combinação com a soda cáustica, podem controlar a viscosidade de líquidos no interior de canalizações, impedindo a obstrução das mesmas. Podem ser utilizados como componentes importantes (fenóis naturais) para fabricação de adesivos (taninos - formaldeídos) para a madeira e derivados. Podem agir ainda como flocculantes de certos minerais e também como um produto de purificadores da gasolina, por sua ação comprovada de eliminação das mercaptanas (impurezas da gasolina) (TRUGILLHO et al, 1997).

### 3.3.3 Métodos de identificação e quantificação de taninos

Vários são os métodos de determinação do teor de taninos que têm sido empregados, tanto quantitativa quanto qualitativamente, como precipitação de metais ou proteínas e por métodos colorimétricos, sendo esses últimos mais comuns. Os métodos mais apropriados para determinação de taninos são os ensaios com precipitação de proteínas (MONTEIRO et al, 2005).

Entre os métodos tradicionalmente utilizados na determinação do teor de taninos, destaca-se o método da hemoanálise de BATE-SMITH (1973) e o método com pó de pele. O primeiro baseia-se na formação de um complexo tanino-hemoglobina, medindo colorimetricamente a hemoglobina não combinada. O segundo método, com pó de pele, fundamenta-se na capacidade dos taninos de se ligarem às proteínas da pele (SOLON, 2006).

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. Para a quantificação colorimétrica de taninos hidrolisáveis se destacam os métodos que empregam o iodato de potássio e rodanina (VERZA, 2006).

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 polivinilpirrolidona (PVPP) para a quantificação de ácido tânico.



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. No caso de taninos condensados podem ser utilizados na determinação de polímeros com até 7 ou 8 unidades (VERZA, 2006).

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 (VERZA, 2006).

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 (VERZA, 2006).

### **3.3.3.1 Métodos colorimétricos para polifenóis totais**

O método de Folin-Denis baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. O método de Folin-Denis, no entanto, não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados. Para evitar esta desvantagem, os taninos são precipitados ou adsorvidos da solução extrativa por técnicas apropriadas (gelatina, preparado de eritrócitos, etc.) (SOLON, 2006; ANGELO & JORGE, 2007).

O complexo colorido tanino-reagente de Folin-Denis que se forma, no entanto, é extremamente instável, constituindo-se esta uma das principais limitações do método. Este inconveniente pode ser minimizado através da padronização do tempo de leitura da absorvância. A cor azul formada é tanto mais instável quanto mais forte for o álcali adicionado. A base que apresenta os melhores resultados para este propósito é o carbonato de sódio (SOLON, 2006).

Um aspecto importante a ser considerado neste método é a escolha do padrão. Os mais utilizados têm sido o ácido tânico e a catequina, entretanto, estes compostos apresentam reatividades diferentes frente ao reagente de Folin-Denis (ANGELO & JORGE, 2007).

Muitas vezes o reagente de Folin-Denis é substituído pelo de Folin-Ciocalteu. Este último é mais sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação. As principais diferenças entre estes dois reagentes é o uso de sulfato de lítio, a presença de ácido

hidroclorídrico e o longo tempo de aquecimento para a preparação do reagente de Folin-Ciocalteu. (ANGELO & JORGE, 2007).

Ambos os métodos 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 (VERZA, 2006).

Para ambos os testes, o número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para os ânions molibdo e tungstofosfato produzirem a oxidação. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas. Estas últimas se decompõem vagarosamente em pH alcalino, o qual é necessário para a manutenção do fenol na forma de fenolato (ANGELO & JORGE, 2007).

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 (VERZA, 2006).

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 (VERZA, 2006).

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 (VERZA, 2006).

Além desses, o método Azul de Prússia, é provavelmente o mais popular método para quantificação de polifenóis totais, pois é um método simples, rápido e com pouca interferência por componentes não-fenólicos (SOLON, 2006). É um método fundamentado na

redução do íon férrico a íon ferroso pelas hidroxilas fenólicas, seguido pela formação de um complexo de ferrocianeto ferroso, conhecido como azul da Prússia, que apresenta um máximo de absorção a 720 nm. A habilidade dos compostos fenólicos reduzirem o íon férrico depende da hidroxilação e do grau de polimerização destes compostos (ANGELO & JORGE, 2007).

### **3.3.3.2 Métodos baseados na precipitação de proteínas**

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 (VERZA, 2006).

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, ponto isoelétrico, conteúdo de prolina, glicosilação da proteína, tamanho da molécula, flexibilidade conformacional, solubilidade em água do polifenol e posição dos grupos periféricos (VERZA, 2006).

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 (VERZA, 2006).

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 (VERZA, 2006).

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 (VERZA, 2006).

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 (VERZA, 2006).

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) (VERZA, 2006).

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. De modo global, a importância de tais fatores resulta em limitações, do ponto de vista analítico, para a quantificação de taninos (VERZA, 2006).

A precipitação por pó de pele, seguido por absorciometria, é o método de quantificação de taninos mais preconizado por códigos oficiais. Entretanto, em virtude de limitações relacionadas ao custo e a variabilidade de procedência do pó de pele, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidação do fenômeno da sua complexação e avaliação de agentes quelantes alternativos, especialmente de natureza protéica tais como, hemoglobina, gelatina, albumina bovina e caseína (SOARES et al, 2006).

#### **3.3.3.2.1 Método direto por precipitação de proteínas**

Este método também é fundamentado na precipitação dos taninos com proteínas, após complexação em meio aquoso. No entanto, a determinação de taninos é feita sem adição de nenhum reagente específico, medindo-se no ultravioleta as frações de polifenóis totais e fração não-tanante (obtida após separação dos taninos precipitados, por filtração). O teor de taninos totais é calculado de forma indireta, subtraindo-se o teor de polifenóis não precipitados pela caseína do teor de polifenóis totais (SOLON, 2006).

#### **3.3.3.2.2 Complexação com derivados da povidona**

A literatura tem demonstrado que o emprego de agentes complexantes de natureza não-protéica podem permitir a obtenção de complexos estáveis e providos de maior especificidade. Neste contexto, a polivinilpirrolidona (povidona) tem se destacado devido a sua reconhecida capacidade de ligação com polifenóis. Ao contrário da maioria dos derivados protéicos, os complexos formados entre polifenóis e povidona são normalmente mais estáveis (SOARES et al, 2006).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a povidona apresenta maior eficiência na formação de complexos com polifenóis, em especial com taninos, do que outras substâncias, tais como caseína, gelatina e albumina sérica bovina (SOARES et al, 2006).

### 3.4 Espectrofotometria UV-Vis

A espectrofotometria é um processo de medida que, basicamente, emprega as propriedades dos átomos e moléculas de absorver e/ou emitir energia eletromagnética em uma região do espectro eletromagnético. As regiões de maior interesse para análises químicas são as compreendidas entre 200-380 nm (ultravioleta), 380-780 nm (visível) e 2-16  $\mu$  (infravermelho) (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

A absorção molecular na região do UV e do visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado. Para muitas estruturas eletrônicas esta absorção ocorre em uma porção pouco acessível do ultravioleta. A seletividade da absorção no UV é uma vantagem, entretanto, uma vez que se pode reconhecer grupos característicos em moléculas de complexidade variável (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

O conhecimento da constituição química das plantas usadas na medicina popular envolve um sistema complexo e combinatório de diferentes ferramentas capazes de elucidar estruturalmente as inúmeras classes e/ou moléculas que podem vir a constituir uma única planta. A espectrometria na faixa do ultravioleta e visível (UV-VIS) é uma técnica consolidada e amplamente utilizada nos últimos 50 anos. A espectrometria UV-VIS permite análises qualitativas e quantitativas de misturas moleculares, pois possibilita a visualização dos perfis espectrais que indicam a presença dos constituintes de uma mistura (DE CARVALHO et al, 2008).

A análise espectrofotométrica na região do ultravioleta/visível, onde a maioria dos taninos que são flavonóides absorvem fortemente na região da luz visível, no comprimento de onda de 390-780 nm. É considerado um método rápido e eficiente (SANTOS, 2008).

### 3.5 Validação de metodologia analítica

A necessidade de se comprovar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada de validação (RIBANI *et al.*, 2004).

Validação do método analítico é a confirmação, por exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são

atendidos. A validação do método analítico permite demonstrar que o método é "adequado ao uso" pretendido (BARROS, 2002).

O objetivo principal da validação é garantir que os resultados de uma análise sejam confiáveis. Isso se dá por meio de análises experimentais do método em um ambiente onde os equipamentos e materiais estejam devidamente calibrados e os analistas sejam adequadamente qualificados. Não é possível estabelecer, no entanto, um sistema universal de validação. Isso devido à grande variedade de substâncias, métodos e suas complexidades. Assim, torna-se importante um bom planejamento em que sejam avaliados os requerimentos legais e o método analítico escolhido (CHASIN *et al.*, 1998).

É extremamente importante o uso de ferramentas estatísticas adequadas, tais como, teste  $t$  de Student e  $F$  de Fisher, análise de variância, regressão linear, entre outras; necessários para demonstração de evidência objetiva da validade do método analítico (BARROS, 2002).

Vários artigos e revisões têm sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos, os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação (RIBANI *et al.*, 2004).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003, "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 (RIBANI *et al.*, 2004).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente, algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através da ICH (*International Conference on Harmonization*), na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos (RIBANI *et al.*, 2004).

A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) também redigiu um documento técnico que define um guia para validação de métodos analíticos que tem sido utilizado pela ISO10. A norma internacional ISO/IEC 17025, que é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração, apresenta a "validação de métodos" como um dos

requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação. O US-FDA (*United States Food and Drug Administration*) também tem proposto guias sobre validação de métodos (RIBANI *et al.*, 2004).

Assim, órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (RIBANI *et al.*, 2004).

### **3.5.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos**

A Resolução Específica (R.E.) nº 899, de 29 de maio de 2003, "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" (Brasil, 2003) da ANVISA e a norma Q2(R1), "Validation of analytical procedures: text and methodology" do *International Conference on Harmonisation* (ICH, 1996), determinam que para validar uma metodologia, faz-se necessário avaliar os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, robustez, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão. Por tanto, a validação de metodologias analíticas necessita ser específica, robusta, sensível, precisa e exata, constituindo fundamental importância para o controle de qualidade dos produtos e sendo parte das normas de Boas Práticas de Fabricação e Controle (SOBRINHO *et al.*, 2008).

Tanto a USP (*The United States Pharmacopoea*) quanto ICH reconhecem que não existe necessidade de avaliar todos os parâmetros de desempenho analítico. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados (OLIVEIRA, 2005).

#### **3.5.1.1 Especificidade**

Entende-se por especificidade a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). Isso corresponde à capacidade de um método de não apresentar resultados falso positivos, quando da identificação de uma substância (CORRER, 2004).

Os procedimentos para demonstrar a especificidade dependerão do objetivo do procedimento analítico, porém esse deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método (CORRER, 2004).

Para análises quantitativas (teor) e análises de impurezas, este parâmetro pode ser avaliado pela incorporação à matéria-prima ou produto acabado sob exame de níveis

apropriados de impureza ou excipientes, demonstrando-se que o resultado não é afetado pela presença destes compostos. Outra maneira é comparar os resultados do teste com os de um segundo método validado e bem caracterizado (ANVISA, 2003).

### 3.5.1.2 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (ANVISA, 2003). A idéia é que o método deve apresentar linearidade, exatidão e precisão quando as quantidades do analito encontrem-se dentro de um determinado intervalo, ou seja, faixa de trabalho. Dependendo do tipo de ensaio, diferentes intervalos podem ser especificados (ANVISA, 2003; ICH, 1996):

- Para a determinação quantitativa de matéria-prima ou produtos acabados: normalmente de 80% a 120% da concentração teórica do teste;
- Para determinação de impurezas: do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado;
- Para ensaio de uniformidade de conteúdo: de 70% a 130% da concentração teórica do teste;
- Para ensaios de dissolução: + 20% sobre o valor especificado no intervalo.

### 3.5.1.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, na qual se pode correlacionar o valor de uma variável dependente (medida) por meio de uma variável independente (concentração) (ANVISA, 2003; CHASIN *et al.*, 1998).

A linearidade pode ser avaliada pela inspeção visual de gráfico plotado pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, conforme intervalo especificado pelo tipo de ensaio. Se houver relação linear aparente, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, como a regressão linear pelo método de mínimos quadrados. As grandezas observadas podem ser o coeficiente de correlação, coeficiente de determinação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular e desvio padrão relativo (ICH, 1996; ANVISA, 2003).

A correlação entre o sinal medido (exemplo: absorbância) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações



conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por, no mínimo, cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (RIBANI *et al.*, 2004).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão  $a$  e  $b$ , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação  $r$ . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser igual a 0,99 (ANVISA, 2003).

#### **3.5.1.4 Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias de avaliação da exatidão estão disponíveis (BRASIL, 2003; ICH, 1996). O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA (RIBANI *et al.*, 2004).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão. A recuperação (ou fator de recuperação),  $R$ , é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004).

#### **3.5.1.5 Precisão**

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003).

A precisão pode ser considerada em três níveis (BRASIL, 2003; ICH, 1996):

- Repetibilidade (precisão intra-dia): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e instrumentação. Esta pode ser obtida pela avaliação de um mínimo de 9 (nove) determinações de um mínimo de 3 (três) níveis de concentrações, de acordo com o intervalo especificado (ex. 3 concentrações/3 replicatas cada) ou num mínimo de 6 determinações a 100% da concentração teste.
- Precisão Intermediária (Precisão inter-dia): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.
- Reprodutibilidade (Precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, não devendo ultrapassar 5% de variação.

Onde DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada (BRASIL, 2003).

#### **3.5.1.6 Robustez**

A robustez é a medida da capacidade do método em resistir e pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal (CORRER, 2004).

#### **3.5.1.7 Sensibilidade**

A sensibilidade é definida como a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de segurança, duas concentrações próximas. A sensibilidade é útil como um parâmetro comparativo entre dois métodos, em que o método de maior sensibilidade apresenta curva padrão com maior inclinação (CORRER, 2004).

#### **3.5.1.8 Limite de detecção**

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003).

### **3.5.1.9 Limite de quantificação**

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra (BRASIL, 2003).

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003).

## **4. Metodologia**

### **4.1 Material Vegetal**

O material vegetal, constituído de folhas de *Eugenia puniceifolia*, foi fornecido pela Embrapa Amazônia Ocidental. As plantas foram colhidas com, aproximadamente, um ano de idade e em fase reprodutiva.

### **4.2 Tratamento do material vegetal e obtenção da Matéria-Prima Vegetal (MPV)**

O material vegetal recebido foi selecionado manualmente, sendo separados folhas e ramos para tratamento individual. As partes morfológicas do vegetal, separadamente, foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante à temperatura de  $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , até estabilização da umidade residual. Após a secagem, as folhas foram moídas em moinho de facas. O material resultante foi misturado, constituindo a matéria-prima vegetal.

### **4.3 Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV)**

O material vegetal foi caracterizado através dos ensaios descritos abaixo.

#### **4.3.1. Determinação de perda por dessecação (F. Bras. IV, 1988)**

Cerca de 0,5 g da matéria-prima vegetal, exatamente pesados, foram colocados em pesa-filtro, previamente tarado, e levados para a estufa a  $105\text{ °C}$  por um período de 2 horas. Em seguida, os pesa-filtros foram resfriados em dessecador por 20 minutos e pesados. Este procedimento foi repetido até peso constante.

#### **4.3.2. Análise granulométrica por tamisação (VOIGT, 2000)**

Cerca de 50 g da matéria-prima vegetal foi submetida à passagem através de tamises com abertura de malha de 1,00; 0,800; 0,710; 0,600; 0,500; 0,400; 0,330 e 0,250 mm. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos. As frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas e os dados analisados por método gráfico. A partir das curvas

de retenção e passagem foi calculado o diâmetro médio de partícula e o histograma de distribuição granulométrica.

### 4.3.3 Teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Cerca de 1g da matéria-prima vegetal, exatamente pesados, foi colocado em erlenmeyer adicionado de 100 ml de água destilada, pesado o conjunto, e submetido à extração por decocção durante 10 minutos. Após resfriamento, pesou-se novamente o conjunto reconstituindo-se a massa inicial com água destilada, filtrou-se desprezando os primeiros 20 ml do filtrado. Cerca de 20g do filtrado, foram pesados e colocados em pesa-filtro, previamente tarados, e evaporados à secura em banho-maria, com agitação ocasional. Após a evaporação, o pesa-filtro, contendo a amostra foi levado á estufa  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  até peso constante. O resultado foi expresso pela média de três determinações e o teor extrativo foi calculado segundo abaixo.

$$TE = \frac{g \times FD \times 100}{m - pd}$$

Onde; TE = teor extrativo (% , m/m); g = massa (g) do resíduo seco; FD = constante, igual a 5; m= massa da amostra inicial (g); pd = perda por dessecação da amostra (% , m/m).

## 4.4 Obtenção da solução extrativa e do extrato seco

A solução extrativa foi preparada, conforme utilização popular, através de infusão da droga vegetal (relação droga:solvente de 7,5:100 m/v) utilizando água destilada em ebulição por um período de 15 minutos.

A solução extrativa foi seca através de secagem por aspersão em equipamento Mini Spray Dryer modelo MSD 1,0 da Labmaq, utilizando o bico de secagem número 1 (0,7 mm), fluxo de alimentação de 8 ml/mim com temperatura de secagem de 120 °C.

### 4.4.1 Caracterização da solução extrativa

**- Determinação de resíduo seco (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)**

Foi realizado através de método gravimétrico, onde alíquota de 20,0 mL da solução extrativa foi exatamente pesada, diretamente, em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporada até secura em banho de água, sob agitação ocasional. Após evaporação da solução extrativa, o pesa-filtro contendo o resíduo foi levado à estufa  $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  até peso constante. A análise foi realizada em triplicata. O resultado foi expresso pela média e desvio-padrão de três determinações.

**- Determinação de densidade (F. Bras. IV,1988)**

Foi realizada em picnômetro de 25 mL, previamente calibrado através da aferição do mesmo vazio e contendo água. Em seguida, foi determinada a massa do picnômetro contendo a solução extrativa. A densidade está expressa pela média e desvio-padrão de três determinações e calculada segundo a equação abaixo.

$$d_{25}^{25} = \frac{m_{se}}{m_{H_2O}}$$

onde:  $d_{25}^{25}$  = densidade relativa;  $m_{se}$  = massa da solução extrativa;  $m_{H_2O}$  = massa da água

**- Determinação do pH (F. Bras. IV,1988)**

O pH foi determinado utilizando 10 mL da solução extrativa, em potenciômetro, previamente calibrado. O resultado está expresso pela média de três determinações.

## **4.5 Otimização de metodologia analítica para quantificação de taninos em *Eugenia punicifolia***

### **4.5.1 Doseamento Espectrofotométrico**

O doseamento espectrofotométrico se deu após a complexação dos taninos com proteínas e polímeros de alto peso molecular seguido análise por:

- Medição direta (Soares, 2002) e
- Após complexação com o reagente de Folin-Denis (BOHME & HARTKE, 1976 modificado por MARTINS, 1998).

## **4.5.2 Seleção do comprimento de onda de leitura ideal**

### **4.5.2.1 Medição direta**

Foram obtidos espectros de varredura da solução extrativa e comparação com espectro de varredura da substância de referência (ácido gálico), na região do ultravioleta ( $\lambda = 190$  a  $340$  nm). O comprimento ideal após varredura encontrado foi de  $270$  nm.

### **4.5.2.2 Medição após complexação com Folin-Denis**

Foram obtidos espectros de varredura da solução extrativa de concentração  $320$   $\mu\text{g/mL}$  e comparação com espectro de varredura da substância de referência (ácido gálico) com diferentes proporções dos reativos de complexação:  $1,0$ ;  $2,0$  e  $3,0$  mL de reagente de Folin-Denis, com  $17,0$ ;  $16,0$  e  $15,0$  mL de carbonato de sódio a  $20\%$ , respectivamente, na região de comprimento de onda de  $350$  a  $900$  nm, a fim de determinar o melhor comprimento de onda e proporção de reativos. O comprimento de onda encontrado após varredura foi de  $750$  nm e a proporção de reativos foi de  $2,0$  mL do reagente de Folin-Denis, com  $16,0$  mL de carbonato de sódio a  $20\%$  e  $2,0$  mL da solução extrativa de  $320$   $\mu\text{g/mL}$ .

## **4.5.3 Obtenção de curva de calibração do padrão Ácido Gálico**

### **4.5.3.1 Medição direta**

A curva de calibração foi obtida através da realização da análise de soluções aquosas de ácido gálico nas concentrações  $4$ ,  $8$ ,  $12$ ,  $16$  e  $20$   $\mu\text{g/mL}$  no comprimento de onda de  $270$  nm. As absorbâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco. Os resultados correspondem à média de três leituras para cada concentração.

### **4.5.3.2 Medição após complexação com Folin-Denis**

A curva de calibração foi obtida através da realização da análise de soluções aquosas de ácido gálico nas concentrações  $16$ ,  $20$ ,  $28$ ,  $32$ ,  $40$  e  $60$   $\mu\text{g/mL}$  no comprimento de onda de  $750$  nm, após complexação com  $2,0$  mL do reagente de Folin-Denis e  $16$  mL do carbonato de sódio a  $20\%$ , conforme descrito para os polifenóis totais. As absorbâncias foram determinadas

utilizando água destilada como branco. Os resultados correspondem à média de três leituras para cada concentração.

#### 4.5.3.3 Determinação do coeficiente de extinção molar ( $A_{1cm}^{1\%}$ ) do padrão de ácido gálico

Foi determinado através de curva de calibração a partir de uma solução de ácido gálico 1% (m/v) tanto para a leitura direta como após a complexação com o reagente de Folin-Denis, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{A_p \times 10}{C}$$

onde:  $A_{1cm}^{1\%}$  = coeficiente de absorção específica do ácido gálico,  $A_p$  = absorvância da solução de ácido gálico,  $C$  = concentração do ácido gálico (mg/mL)

#### 4.5.4 Determinação do tipo e concentração do agente complexante

Foram avaliados quatro agentes complexantes com distintas concentrações (tabela 1). O tempo de complexação foi fixado em 1 hora. Os resultados foram expressos em percentual calculados como ácido gálico e a análise da amostra foi realizada através de medição direta em espectrofotômetro no comprimento de onda de 270 nm.

Tabela 1 - Tipo e concentração de agentes complexantes

Agente complexante			
Caseína	Gelatina	Celulose Microcristalina	Polivinilpirrolidona
Concentração (mg)			
	50	100	150



#### 4.5.5 Doseamento espectrofotométrico dos Taninos totais

O doseamento dos taninos totais se deu por meio de leitura direta e pela adição do reagente de Folin-Denis e comparação com espectro de varredura da substância de referência (ácido gálico), conforme esquema abaixo (Figura 6):

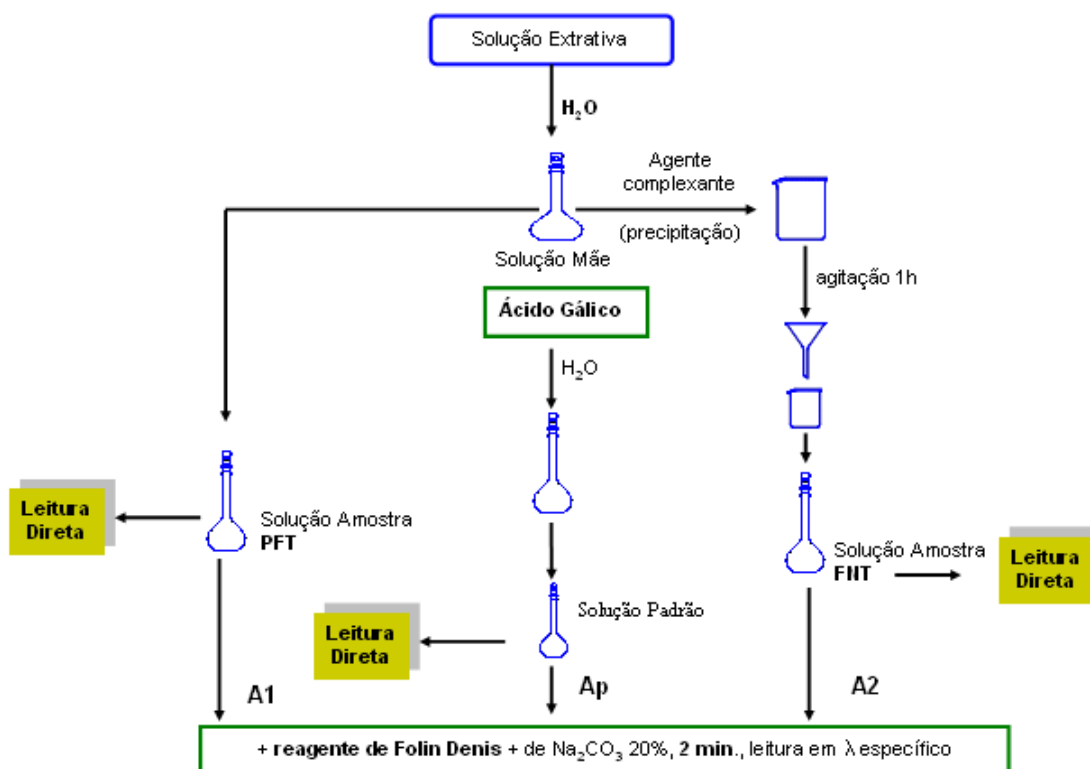


Figura 6 - Esquema do doseamento espectrofotométrico de taninos totais

##### 4.5.5.1 Doseamento espectrofotométrico de Polifenóis Totais e Fração não-tanante através de leitura de direta para determinação de Taninos totais

- **Doseamento de polifenóis totais (PT):** Determinou-se a absorbância da solução extrativa de 80 µg/mL no comprimento de onda de 270 nm.

- **Doseamento da fração não-tanante (FNT):** Pesou-se quantidade do agente complexante, conforme tabela 1 e adicionou-se a 10mL da solução extrativa de 80 µg/mL. Agitou-se a mistura em agitador magnético durante uma hora. Em seguida, filtrou-se a mistura com papel de filtro. O filtrado foi chamado de fração não tanante (FNT). Determinou-se a absorbância no comprimento de onda de 270 nm.

#### 4.5.5.2 Doseamento espectrofotométrico de Polifenóis Totais e Fração não-tanante através de reação com reagente Folin-Denis para determinação de Taninos totais

- **Doseamento de polifenóis totais (PT):** Em um béquer de 20mL, adicionou-se uma alíquota de 2 mL da solução extrativa de 80 µg/mL, 2 mL do reagente de Folin-Denis e 16 mL da solução de carbonato de sódio a 20% (m/V). Determinou-se a absorbância no comprimento de onda de 750 nm, exatamente 2 minutos após adição do último reagente, utilizando água destilada como solução de compensação.

- **Doseamento da fração não-tanante (FNT):** Pesou-se 150 mg do agente complexante polivinilpirrolidona e adicionou-se a 10mL da solução extrativa de 80 µg/mL. Agitou-se a mistura em agitador magnético durante uma hora. Em seguida, filtrou-se a mistura com papel de filtro. O filtrado foi chamado de fração não tanante (FNT). Em um béquer de 20mL, adicionou-se uma alíquota de 2 mL da fração não-tanante (FNT), 2 mL do reagente de Folin-Denis e 16 mL da solução de carbonato de sódio a 20% (m/V). Determinou-se a absorbância no comprimento de onda de 750 nm, exatamente 2 minutos após adição do último reagente, utilizando água destilada como solução de compensação.

- *Preparação dos reativos Folin-Denis:* Adicionou-se a 75mL de água destilada, 10,0g de tungstato de sódio, 2,0g de ácido fosfomolibdico e 5,0mL de ácido fosfórico. Ferveu-se a mistura sob refluxo por 2 horas, resfriar e diluir a 100mL com água destilada.

- *Solução de carbonato de sódio 20% (m/V):* Dissolveu-se 200g de carbonato de sódio anidro em 1000mL de água destilada a aproximadamente 70°C. Filtrou-se a solução após 24 horas.

#### 4.5.5.3 Determinação do teor de taninos totais (TT)

O teor de taninos totais foi calculado através da diferença entre o teor de polifenóis totais e da fração não-tanante, através das equações 1,2 e 3.

$$PFT = \frac{A1 \cdot FD}{(m - p) \cdot A_{1cm}^{\%}} \text{ (Equação 1)} \quad FNT = \frac{A2 \cdot FD}{(m - p) \cdot A_{1cm}^{\%}} \text{ (Equação 2)}$$

$$TT = PFT - FNT \text{ (Equação 3)}$$

onde: PFT = polifenóis totais (g%); FNT = fração não-tanante (g%); TT = taninos totais; A1 = absorvância de polifenóis totais; A2 = absorvância da fração não-tanante; FD = fator de diluição; m = massa de matéria-prima vegetal (g); p = perda por dessecação de matéria-prima vegetal (g);  $A1^{1\%}$  = coeficiente de absorção específica do ácido gálico.

#### **4.5.6 Otimização de doseamento espectrofotométrico através de reação com reagente Folin-Denis**

##### **4.5.6.1 Influência da concentração do reagente sobre a absorvância no doseamento de polifenóis totais**

A influência da concentração do reagente Folin-Denis sobre a absorvância de polifenóis totais foi determinada partindo-se da reação de 2,0 mL de solução extrativa com concentração de 320 µg/mL. Foram utilizadas alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mL de Folin-Denis, 2,0 mL de solução extrativa, completando-se com a solução de carbonato de sódio 20%, para um volume final de 20,0 mL. A absorvância foi lida, exatamente, 2 minutos após a adição do ultimo reagente, em comprimento de onda de 750 nm.

##### **4.5.6.2 Influência do tempo de leitura**

Foi determinada a absorvância dos polifenóis totais nos tempos 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de reação com 2,0 mL de solução extrativa com concentração de 320 µg/mL, 2 mL de reagente de Folin-Denis e 16 mL de Carbonato de sódio 20%.

#### **4.5.7 Validação de metodologias analíticas**

Ambas as metodologias de quantificação, leitura direta e por reação com adição do reagente de Folin-Denis, foram validadas seguindo os parâmetros descritos abaixo (USP, 25; ICH, 1995).

##### **4.5.7.1 Linearidade**

A linearidade foi estabelecida pela média de três curvas calibração.

As curvas de calibração do padrão ácido gálico foram obtidas conforme demonstrado no item 4.6.3.

As curvas de calibração da solução extrativa foram obtidas conforme descrito abaixo:

#### ***Leitura por Medição direta***

A curva de calibração foi obtida através da realização da análise de soluções extrativa nas concentrações 20, 32, 40, 60, 80 e 88 µg/mL no comprimento de onda de 270 nm. As absorvâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco. Os resultados correspondem à média de três leituras para cada concentração.

#### ***Medição após complexação com Folin-Denis***

A curva de calibração foi obtida através da realização da análise de soluções extrativas nas concentrações 40, 80, 160, 240, 320 e 360 µg/mL, utilizando-se 2 mL de cada solução extrativa, 2,0 mL do reagente de Folin-Denis e 16 mL do carbonato de sódio a 20%, aguardando-se 2 minutos para realização da leitura no comprimento de onda de 750 nm. As absorvâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco. Os resultados correspondem à média de três leituras para cada concentração.

#### **4.5.7.3 Exatidão**

A exatidão foi realizada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da solução padrão adicionada à amostra. A amostra sem adição de padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado (concentração estimada) foram analisadas e a recuperação foi expressa em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada, conforme a equação da RE 899/2003:

$$\text{Exatidão} = (\text{concentração média experimental}/\text{concentração teórica}) \times 100$$

#### ***Exatidão por leitura direta***

Quantidades conhecidas de ácido gálico foram adicionadas em triplicata à solução extrativa (40 µg/ml) em três níveis de concentração baixo (4 µg/mL), médio (8 µg/mL) e alto

(12 µg/mL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 270 nm. As absorbâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco.

#### ***Exatidão por medição utilizando do reagente Folin-Denis***

Quantidades conhecidas de ácido gálico foram adicionadas em triplicata à solução extrativa (80 µg/ml) em três níveis de concentração baixo (20 µg/mL), médio (28 µg/mL) e alto (40 µg/mL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. As absorbâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco.

#### **4.5.7.3 Repetibilidade**

A repetibilidade foi determinada pela análise de nove amostras individuais, tanto do padrão como da solução extrativa, conforme descrito abaixo. A repetibilidade foi expressa através do coeficiente de variação (CV).

#### ***Repetibilidade por leitura direta***

Para o estudo da repetibilidade por leitura direta foi utilizada a análise de nove determinações a 100% da concentração testada, ou seja, 12 µg/mL para o padrão e 40 µg/mL para a solução extrativa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 270 nm. As absorbâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco.

#### ***Repetibilidade por medição utilizando do reagente Folin-Denis***

Para o estudo da repetibilidade após adição do reagente Folin-Denis foi utilizado a análise de nove determinações a 100% da concentração testada, ou seja, 28 µg/mL para o padrão e 80 µg/mL para a solução extrativa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm.

#### **4.5.8 Análise Estatística**

A análise estatística constou de análise de variância (ANOVA) e análise de regressão linear (MONGOMERY, 1991) utilizando o pacote de programa estatístico do Excel 2003.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV)

Na tabela 2 estão descritos os resultados dos ensaios de caracterização da Matéria-Prima Vegetal.

Tabela 2 - Caracterização da Matéria-Prima Vegetal

Ensaio	Resultados ( $X \pm s$ )
Perda por dessecação (%)	$14,29 \pm 0,39$
Diâmetro médio de partícula ( $\mu\text{m}$ )	610,3
Teor extrativo (g%)	$22,79 \pm 0,083$

Os ensaios realizados demonstraram que amostra apresentou perda por dessecação de 14,29%, indicando que a operação de secagem não foi eficiente em eliminar o conteúdo de umidade. Isso demonstra também, que a umidade residual está inapropriada para o armazenamento, ou seja, acima de 14%, com isso, pode-se induzir o desenvolvimento de microorganismo que possam comprometer a estabilidade e contaminar os produtos elaborados a partir da MPV (LIST e SCHMIDT, 1989). Sendo assim, a MPV foi imediatamente utilizada para obtenção de solução extrativa, a qual foi secada em *spray-dryer* para a obtenção do extrato seco, sendo este utilizado nos experimentos para quantificação de taninos.

A análise granulométrica por tamisação é um parâmetro importante para identificação da distribuição de tamanho de partícula da matéria-prima vegetal, uma vez que a granulometria da matéria prima-vegetal é um dos fatores de grande influência no processo extrativo, exigindo assim, uma padronização (LIST e SCMIDT, 1989; SIMÕES et al. 2003).

O histograma de distribuição das partículas da matéria-prima vegetal (Figura 7) mostra uma ampla faixa de distribuição granulométrica em 850-710 nm. Conforme a figura 8 observa-se que 50% das partículas estão situadas em 610,3  $\mu\text{m}$ .

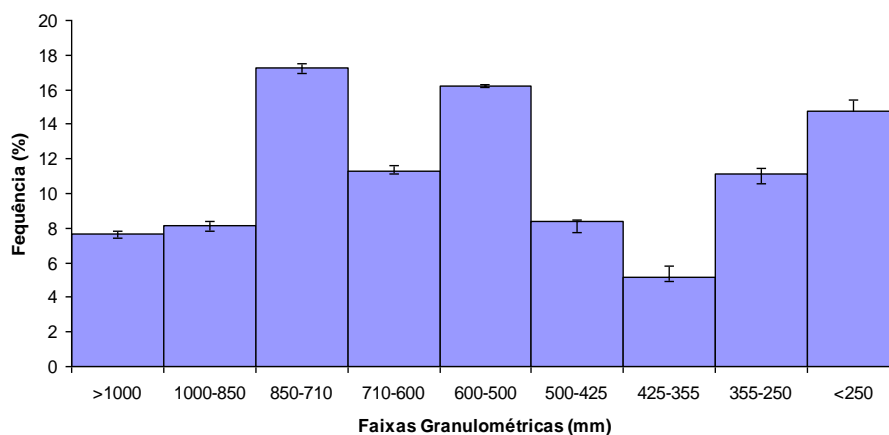


Figura 7 - Histograma de distribuição da matéria-prima vegetal *E. punicifolia*

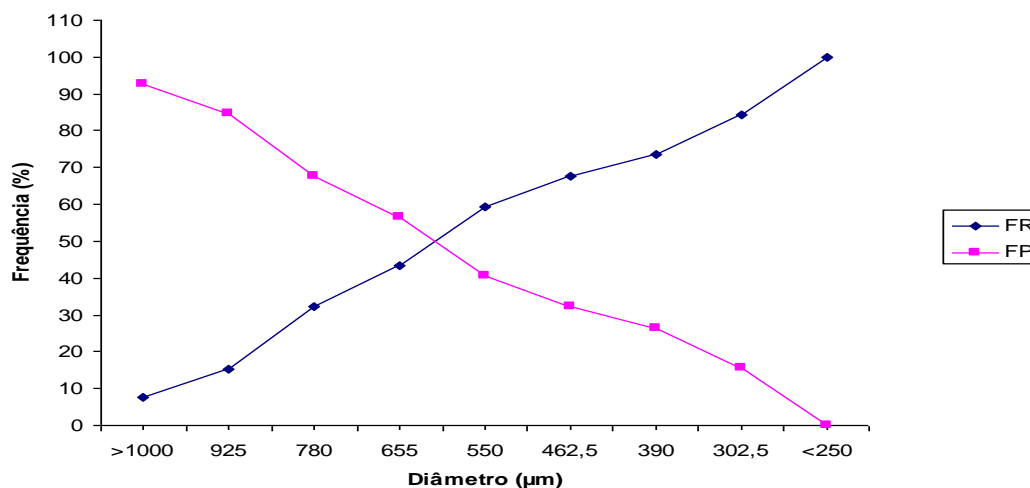


Figura 8 - Curva de retenção e passagem da matéria-prima vegetal *E. punicifolia*

A análise do teor extrativo descreve a quantidade de sólidos solúvel presentes na matéria-prima vegetal e, também, a eficiência da água em extrair as substâncias presentes nas células vegetais (LIST e SCMIDT, 1989). O teor extrativo encontrado conforme a tabela 2 foi de 22,79 g%.

## 5.2 Caracterização da solução extrativa

Na tabela 3 estão descritos os resultados dos ensaios de caracterização da solução extrativa.

Tabela 3 - Caracterização da solução extrativa

Ensaio	Resultados ( $\bar{X} \pm s$ )
Resíduo Seco g%	1,41 $\pm$ 0,015
Densidade	1,01
pH	4,75

A quantidade de sólidos solúveis presentes na solução extrativa é determinada pelo teor de resíduo seco. Posteriormente, ele é utilizado para avaliação do rendimento operacional num processo de secagem da solução extrativa. O resíduo seco encontrado para essa solução foi de 1,41g%, isso significa que 100g da solução extrativa apresenta 1,41 g de substâncias sólidas solúveis.

A densidade apresentada pela solução extrativa foi de 1,01, mostrando-se próxima da densidade da água. O pH apresentado foi de 4,75, ou seja, um pH ácido que pode se mostrar eficaz no combate ao desenvolvimento microbiano e indicativo do alto teor de polifenóis presentes na solução.

### 5.3 Doseamento Espectrofotométrico

#### 5.3.1 Seleção do comprimento de onda de leitura ideal

##### 5.3.1.1 Medição direta

O espectro de varredura da solução extrativa e comparação com espectro de varredura da substância de referência ácido gálico (Figura 9) permitiu escolher-se o comprimento de onda ideal. Devido à semelhança no espectro de varredura, o ácido gálico foi escolhido como substância de referência e com isso permitiu selecionar o comprimento de onda ideal de 270 nm, que foi utilizada para a realização dos demais ensaios.



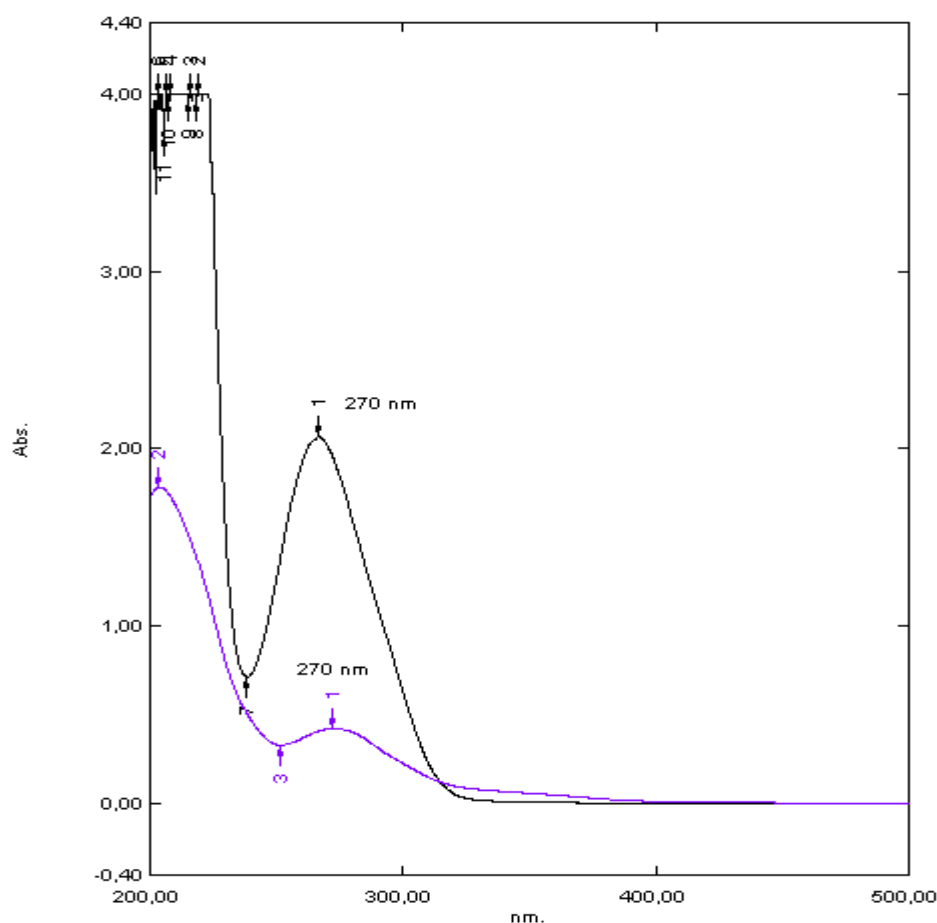


Figura 9 - Espectro de varredura da solução extrativa (em roxo) e do padrão ácido gálico (em preto) através de leitura direta.

### 5.3.1.2 Medição após reação com Folin-Denis

O espectro de varredura da solução extrativa e comparação com espectro de varredura da substância de referência ácido gálico (Figura 10) permitiu escolher o comprimento de onda ideal. Pode ser observado que 750 nm é o máximo de absorção do padrão de ácido gálico, no entanto, há um leve deslocamento para a solução extrativa (722nm). No entanto, considerando a semelhança nos espectros e que há um platô na faixa entre 720 e 750 nm da solução extrativa, este último comprimento de onda parece ser o ideal para realização dos experimentos.

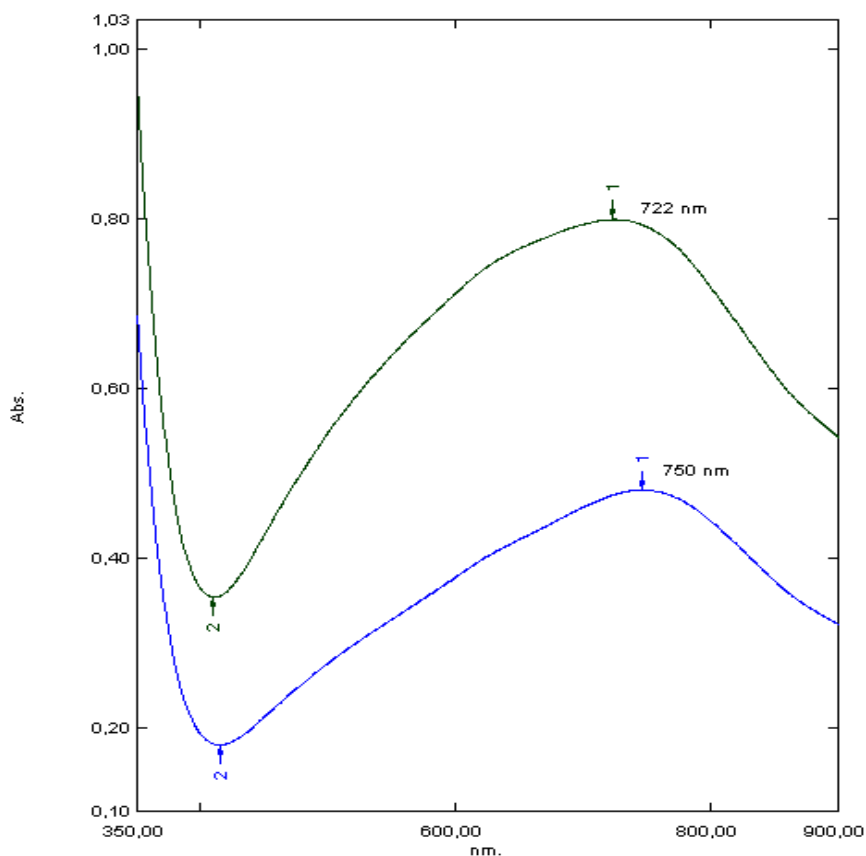


Figura 10 - Espectro de varredura da solução extrativa (em verde) e do padrão ácido gálico (em azul) após leitura utilizando o reagente de Folin-Denis.

### 5.3.2 Curva de calibração do padrão Ácido Gálico

#### 5.3.2.1 Medição direta

A curva de calibração, obtida a fim de verificar a viabilidade da utilização do ácido gálico como uma substância de referência para a quantificação dos taninos é mostrada na Figura 11. Os parâmetros de regressão estão descritos na tabela 4.

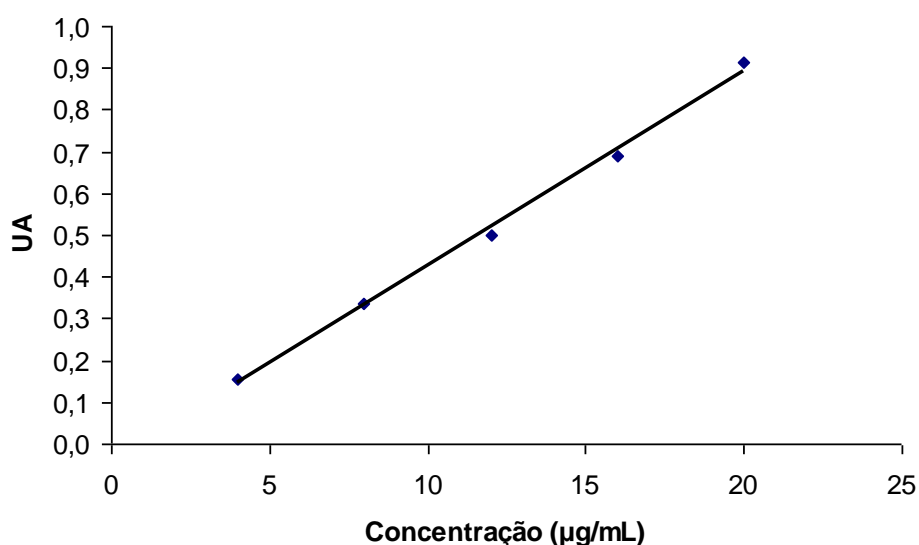


Figura 11 - Curva de Calibração para o ácido gálico após leitura direta

Tabela 4 - Parâmetros de regressão da curva de Calibração para o ácido gálico após leitura direta

Parâmetros da regressão	$\lambda = 270 \text{ nm}$
Interseção	-0,04257
Inclinação	0,046808
$R^2$	0,996607
$A_{1cm}^{1\%}$	422,52

Pode ser observado um coeficiente de regressão significativo acima de 0,99, indicando regressão linear e que a faixa de trabalho selecionada está apropriada para os experimentos. A partir da curva também foi calculado o coeficiente de extinção molar  $A_{1cm}^{1\%}$ .

### 5.3.2.2 Medição após reação com Folin-Denis

Na figura 12 e tabela 5 pode ser observada a curva de calibração do padrão de ácido gálico após complexação com o reagente de Folin-Denis. Pode ser verificado um coeficiente de regressão significativo acima de 0,99 indicando regressão linear.

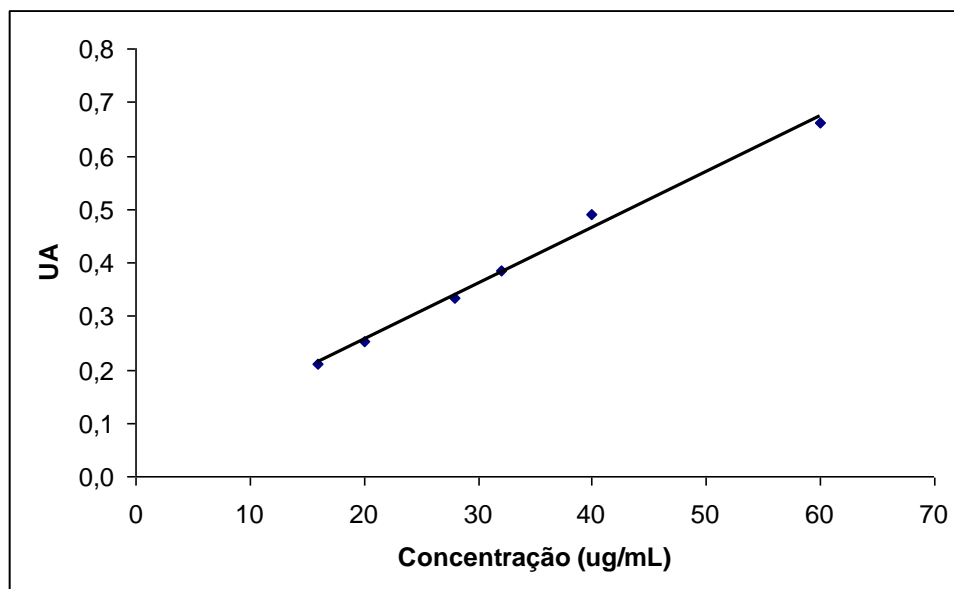


Figura 12 - Curva de Calibração para o ácido gálico após reação com Folin-Denis

Tabela 5 - Parâmetros de regressão da curva de Calibração para o ácido gálico após reação com Folin-Denis

Parâmetros da regressão	$\lambda = 270 \text{ nm}$
Interseção	0,0479
Inclinação	0,0104
$R^2$	0,99388
$A_{1cm}^{1\%}$	121,64

### 5.3.3 Seleção de tipo e concentração de agente complexante para determinação de taninos totais

O teor de taninos totais é mostrado na figura 13. Como se pode observar, com relação ao tipo de agente complexante houve influência significativa sobre o teor de taninos, no entanto, a variação da concentração de caseína e celulose, como agente complexante, não afetou o teor de taninos, os quais foram de  $13,68 \pm 0,18 \text{ g\%}$  e  $11,88 \pm 0,07 \text{ g\%}$ , respectivamente. Por outro lado, as diferentes concentrações de polivinilpirrolidona (PVP) influenciaram, significativamente, o teor de taninos, sendo de  $15,5 \pm 0,2 \text{ g\%}$ ;  $17,46 \pm 0,09 \text{ g\%}$  e  $18,24 \pm 0,02 \text{ g\%}$

para 50, 100 e 150 mg de PVP, respectivamente. Sendo assim, o melhor agente complexante e a concentração ideal é de PVP 150 mg.

Pode-se observar também que a gelatina, proposta inicialmente como agente complexante, não consta no gráfico, pois não foi possível fazer a sua determinação devido a sua solubilização com a solução extrativa e, desta forma, inviabilizando sua utilização para determinação do teor de taninos totais.

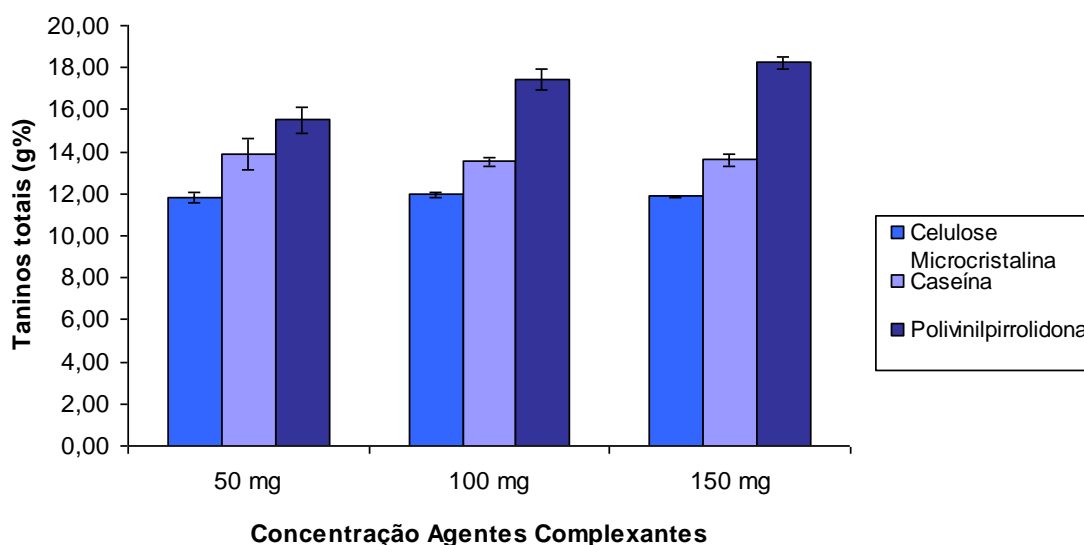


Figura 13 – Gráfico da determinação do teor de taninos totais (TT) por leitura direta

#### 5.4 Otimização de metodologia analítica para quantificação de taninos em *Eugenia punicifolia* utilizando o reagente de Folin-Denis

##### 5.4.1 Influência da concentração do reagente sobre a absorbância no doseamento e polifenóis totais

Na figura 14 está demonstrado a variação das absorbâncias dos polifenóis totais de acordo com diferentes concentrações do reagente de Folin-Denis e carbonato de sódio. Pode ser observado que há um aumento significativo nas absorbâncias à medida que se aumenta o reagente Folin-Denis e diminui o carbonato de sódio.

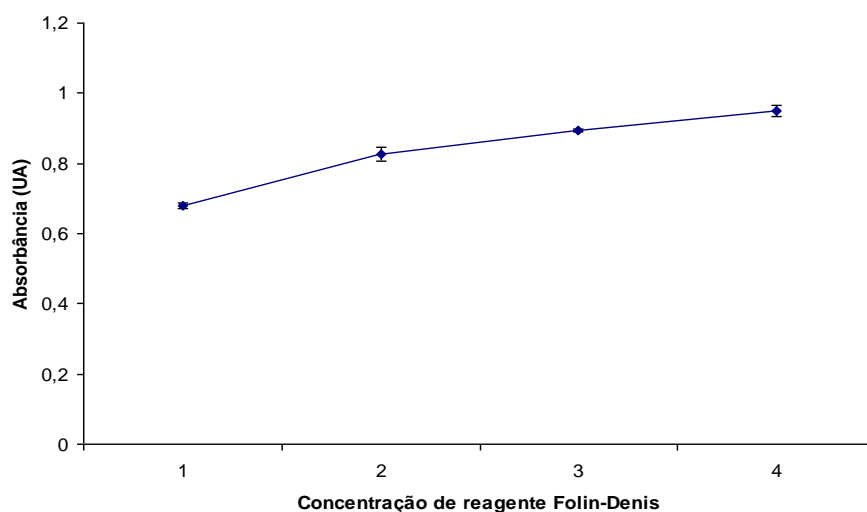


Figura 14 - Influência da concentração do reagente de Folin-Denis sobre a absorvância de polifenóis totais.

#### 5.4.2 Influência do tempo de leitura

Os resultados encontrados (figura 15) mostram que as absorvâncias permaneceram estáveis, sem diferença significativa até 20 min de tempo de leitura, ocorrendo em seguida um aumento significativo até os 60 min. Isso se deve ao fato da formação do complexo colorido tanino-reagente de Folin-Denis ser extremamente instável, constituindo-se esta uma das principais limitações do método. Isto pode ser minimizado através da padronização do tempo de leitura da absorvância (SOLON, 2006).

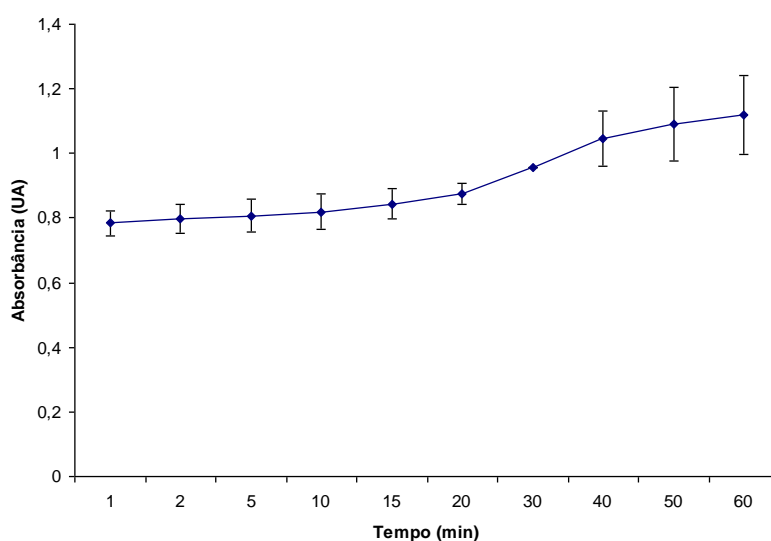


Figura 15 - Influência do tempo de leitura sobre a absorvância dos polifenóis após reação com o reagente de Folin-Denis

### 5.4.3 Determinação do teor de taninos totais (TT) após reação com Folin-Denis

Conforme resultado encontrado (tabela 6) por leitura direta, utilizou-se o agente complexante polivinilpirrolidona na concentração de 150 mg para verificar se houve diferença significativa no teor de taninos totais após a adição do reagente Folin-Denis.

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa ( $p = 0,1347$ ), no teor de taninos totais presentes no extrato seco de *E. puniceifolia*, de acordo com o método espectrofotométrico utilizado, ou seja, ambos os métodos originam o mesmo resultado, cerca de 18 g% de taninos totais.

Tabela 6 - Teor de taninos totais em extrato seco de *E. puniceifolia* após reação com Folin-Denis e por leitura direta

ensaio	Teor de Taninos Totais g%
	$X \pm s$
Leitura direta	$18,25 \pm 0,03$
Reação com Folin-Denis	$17,81 \pm 0,41$

Dessa forma, considerando que a leitura direta é um método mais prático para utilização de doseamento, seria mais indicado para este tipo de análise. No entanto, a metodologia utilizando o reagente de Folin-Denis, também, ainda é bastante difundida. Assim, optou-se por analisar os parâmetros de validação para ambos os métodos.

## 5.5 Validação de metodologias analíticas

### 5.5.1 Medição direta

A linearidade foi determinada através da construção de curvas de calibração para o padrão ácido gálico (figura 11) e para a solução extrativa (figura 16). Pode ser observado, que curva da solução extrativa apresenta coeficiente de regressão de 0,9996, demonstrando significância na linearidade. Na tabela 7 pode ser observado o grau de significância das curvas de calibração.

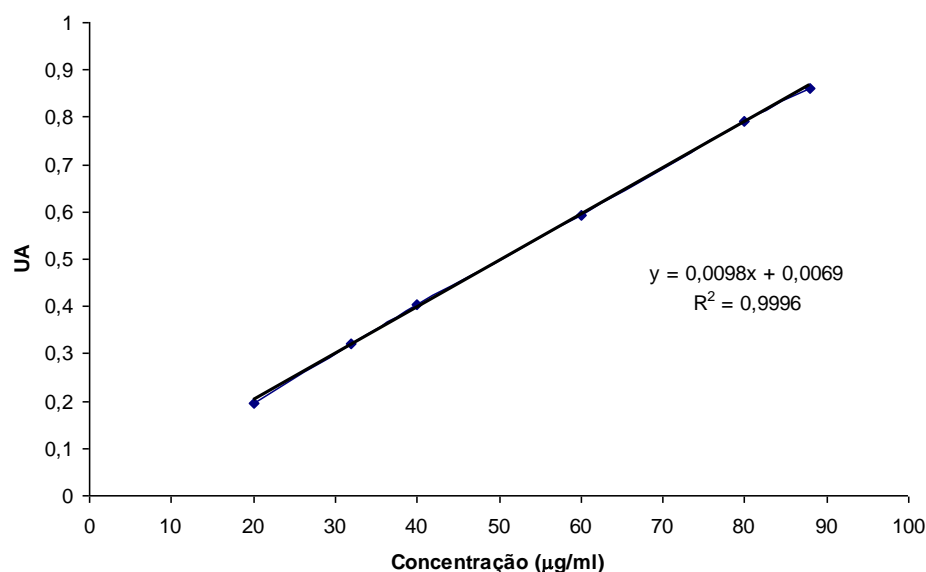


Figura 16 - Curva de calibração da solução extrativa após medição direta

Tabela 7 - Linearidade para o padrão ácido gálico e para a solução extrativa após medição direta

Amostra	R <sup>2</sup>	p-valor	a	b
Ácido gálico	0,996607	8,4 x 10 <sup>-5</sup>	-0,0426	0,0468
Solução extrativa	0,99964	4,8 x 10 <sup>-8</sup>	0,0069	0,0098

Ambas as amostras, padrão e solução extrativa, apresentaram valor de repetibilidade com coeficiente de variação abaixo de 0,5% o que demonstra a precisão do método analisado (tabela 8).

Tabela 8 - Repetibilidade do padrão ácido gálico e solução extrativa

Concentração	Ácido gálico (UA) X ± s (CV%)	Solução Extrativa (UA) X ± s (CV%)
12 µg/mL	0,501 ± 0,002 (0,48)	-
40 µg/mL	-	0,403 ± 0,001 (0,25)

Os valores de exatidão do método estão descritos na tabela 9, o qual é constatado através do ensaio de recuperação de ácido gálico após contaminação na solução extrativa. Pode ser observado que todas as concentrações estudadas demonstram uma recuperação acima de 90% com baixo coeficiente de correlação (< 2%), o que de acordo com a literatura indica que a exatidão do método (BRASIL, 2003).



Tabela 9 - Resultados do estudo de recuperação do ácido gálico pela solução extrativa de *E. punicifolia*

Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%) $X \pm s$ (CV%)
13,27	12,30	$93,88 \pm 1,67$ (1,78)
17,10	16,10	$94,030 \pm 0,18$ (0,19)
20,74	19,80	$95,99 \pm 0,73$ (0,76)

### 5.5.2 Medição após reação com o reagente de Folin-Denis

A curva de calibração da solução extrativa (figura 17) após reação com o reagente de Folin-Denis apresentou linearidade significativa com  $r^2$  de 0,9985 e, semelhante ao padrão ácido gálico, evidencia que o método apresenta faixa de trabalho adequado a quantificação dos taninos totais (tabela 10). No entanto, pode ser observado que os valores de regressão são menores que os apresentados pela leitura direta (tabela 7)

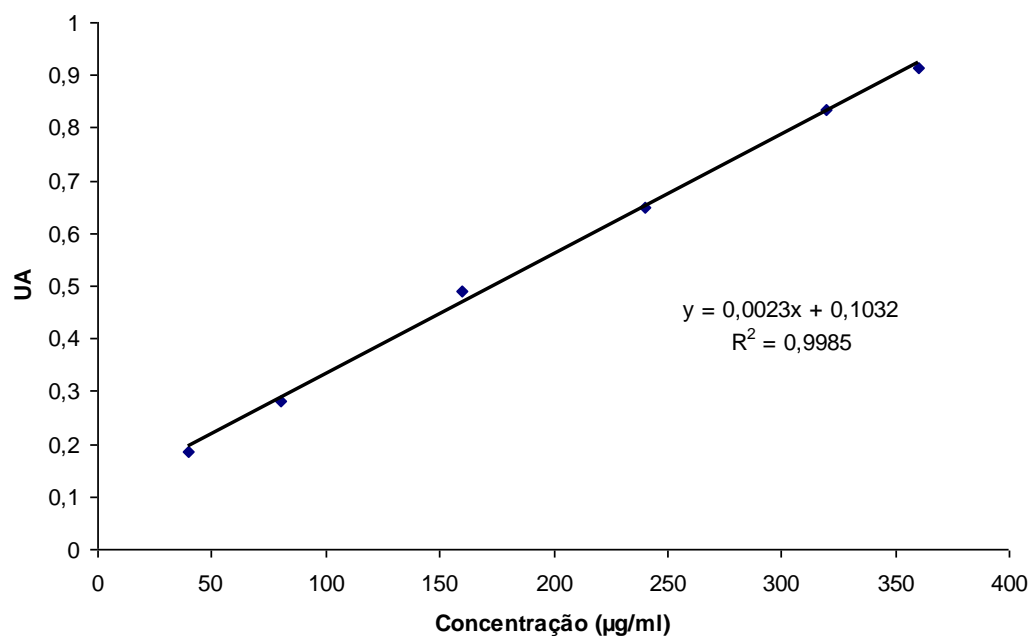


Figura 17 - Curva de calibração da solução extrativa após reação com o reagente de Folin-Denis

Tabela 10 - Linearidade para o padrão ácido gálico e para a solução extrativa após reação com o reagente de Folin-Denis

Amostra	R <sup>2</sup>	p-valor	a	b
Ácido gálico	0,99388	1,4 x 10 <sup>-5</sup>	0,047877	0,010432
Solução extrativa	0,9985	8,4 x 10 <sup>-7</sup>	0,103239	0,002279

Os valores de repetibilidade para as medições após reação com do reagente de Folin-Denis (tabela 11), apresentaram resultados discrepantes entre a solução extrativa com baixo coeficiente de correlação (0,40%) e do padrão ácido gálico com alto coeficiente de correlação (5,86%), indicando a falta de precisão do método, principalmente para o padrão ácido gálico.

Tabela 11 - Repetibilidade do padrão ácido gálico e solução extrativa após reação com o reagente de Folin-Denis

Concentração	Ácido gálico (UA) X ± s (CV%)	Solução Extrativa (UA) X ± s (CV%)
28 µg/mL	0,346 ± 0,020 (5,86)	-
80 µg/mL	-	0,260 ± 0,001 (0,40)

De acordo com os baixos resultados de recuperação (tabela 12), também, não foi possível comprovar a exatidão da metodologia de quantificação utilizando o reagente de Folin-Denis, uma vez que todos os valores foram abaixo de 90%. Tal fato pode ser justificado pelo vários fatores interferentes na metodologia como concentração do agente e tempo de reação que mesmo após, cuidadosa monitorização, segundo o ensaio de validação fica evidente que não é suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados.

Tabela 12 - Resultados do estudo de recuperação do ácido gálico pela solução extrativa de *E. punicifolia* após reação com o reagente de Folin-Denis

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Recuperação (%) X ± s (CV%)
45,65	39,25	85,97 ± 0,79 (0,92)
52,46	45,43	86,61 ± 3,40 (3,93)
62,33	55,37	88,83 ± 1,85 (2,08)

## 6. Conclusão

Um dos parâmetros de controle de qualidade da matéria prima vegetal é a sua caracterização. Sendo assim, a perda por dessecação de *Eugenia punicifolia* indicou resultado inapropriado, acima de 14%, demonstrando que maior tempo deverá ser dado em uma posterior operação de secagem para que a umidade residual esteja de acordo com os limites exigidos.

Os agentes complexantes, avaliados por leitura direta, a exceção da gelatina devido à mesma se solubilizar no extrato, apresentaram influência significativa sobre o teor de taninos, sendo que o melhor agente complexante e a sua concentração ideal foi polivinilpirrolidona (PVP) na concentração de 150 mg. Além disso, foi observado que não houve diferença significativa no teor de taninos totais quando quantificados por leitura direta ou reação com o reagente de Folin-Denis.

As condições ótimas para se quantificar taninos por leitura direta são: comprimento de onda de 270 nm e PVP com 150 mg de concentração.

A metodologia de análise por leitura direta apresentou boa linearidade com  $r = 0,9996$  (solução extrativa) e  $r = 0,9966$  (substância de referência), exatidão com variação de  $93,88 \pm 1,67$  a  $95,99 \pm 0,73\%$ , repetibilidade de 0,48% para o padrão ácido gálico e 0,25% para a solução extrativa. No entanto, a metodologia por adição do reagente Folin-Denis não foi possível de validação, apenas demonstrou linearidade com  $r = 0,99388$  e  $r = 0,9985$  para substância de referência e solução extrativa, respectivamente.

Assim, o método por leitura direta foi passível de validação, apresentando-se como método de escolha para a quantificação do teor de taninos em *Eugenia punicifolia*.

## 7. Referências Bibliográficas

ALVAREZ, A. da S.; POTIGUARA, R.C. de V.; DOS SANTOS, J.U.M. Arquitetura foliar de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae), da restinga de Algodual, Maiandeuá, Pará. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais, Belém, v. 1, n. 2, p. 29-36, Maio-ago. 2006.

ANGELO, P.M.; JORGE N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Rev Inst Adolfo Lutz, 66(1): 232-240, 2007.

BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. Biológico. v.64, n. 2, p. 175-177, 2002.

BELTRAME, F.L.; SARTORETTO, J.L.; BAZOTTE, R.B.; CUMAN, R.N.; CORTEZ, D.A.G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Quimica Nova*, v. 24: p. 783-785, 2001.

BOHME, H.; HARTKE, K. *Europaisches Arzneibuch, Band I und II, Kommentar*. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1976.

BORRÁS, M.R.L. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas? Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Manaus: Editora Valer/Governo de Estado do Amazonas, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos.

BRUNETTI, I.L.; VENDRAMINI, R.C.; JANUARIO, A.H.; et al. Effects and Toxicity of *Eugenia punicifolia* Extracts in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 44, No. 1, pp. 35–43, 2006.

BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBÄNDE (Hrsg.). *Deutscher Arzneimittel – Codex*. Frankfurt: Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986.

CHASIN, A.A.M. et al. Validação de métodos analíticos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. Rev Bras Toxicol, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

CIENFUEGOS, F.; VAISTMAN, D. Análise Instrumental. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

CORRER, C. J. Uso da calibração multivariada na determinação de ácido kójico em forma farmacêutica de uso tópico. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. 2004.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta e Ambiente*, V. 11, n.1, p. 47 - 52, ago./dez. 2004.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Estudo Comparativo do Perfil Químico e do Uso Popular de Espécies das Famílias Myrtaceae e Melastomataceae. In: XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 1 a 3 de dezembro de 2004.

DE CARVALHO, C.A.; DA SILVA, M.B.; DE OLIVEIRA, T.G.; LIMA, J. de M.; DA ROSA, M.B. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea* var. *Capitata*. *Rev. Bras. Farmacogn.*18(2): Abr./Jun. 2008.

DE OLIVEIRA, R.N.; DIAS, I.J.M; CÂMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. *Rev. Bras. de Farmacogn.* 15(1): 39-43, Jan./Mar. 2005.

DE OLIVEIRA, A.M.; HUMBERTO, M.M.S., DA SILVA, J.M., et al. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. *Rev. Bras. de Farmacogn.* 16(Supl.): 618-624, Dez. 2006.

DEUTSCHES Arzneibuch 8. Frankfurt: Govi-Deutscher Apotheker, 1976.

DEUTSCHES Arzneibuch 9. Frankfurt: Govi-Deutscher Apotheker, 1986.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4<sup>a</sup> ed., São Paulo: Andrei, 1988.

FRIGHETTO N.; WELENDORF R.M.; SILVA A.M.P.; NAKAMURA M.J.; SIANI, A.C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasilensis* Lam. *Rev. Bras. de Farmacogn.* 15: 338-343, 2005.

GARCIA, M.D.; SAENZ, M.T.; PUERTA, R.; QUILEZ, A.; FERNANDEZ, M.A. Antibacterial activity of *Agave intemixta* and *Cissus sicyoides*. *Fitoterapia.* 70:71-73, 1999.

GERHARDT, A.; GEHLEN, C., DIETRICH, F.; FREITAS, E.M. de; et al. Determinação de polifenóis totais e atividade antioxidante dos extratos hidroetanólico e aquoso de *Eugenia*

*pyrifomis* Cambess. In XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul). FURB, 13 a 15 de novembro de 2008.

GONZAGA, D.T.G.; ROCHA, D.R.; SOUZA, R.B.; BRAGA, T.L.; FERREIRA, V.F.; SANTOS, W.C. Atividade Antioxidante do Extrato hexânico de *Eugenia punicifolia* (pedra ume caá). In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Livro de Resumos - 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

GONZAGA, D.T.G.; POLESE, L.F.; MOHAMAD, S.; ROCHA, D.R.; ARAUJO, K.G. L.; FERREIRA, V.F.; SANTOS, W.C. Atividade antioxidante do extrato metanólico de *Eugenia punicifolia* (pedra-ume caá). In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

GRANGEIRO, M.S.; CALHEIROS-LIMA, A.P; MARTINS, M.F.; ARRUDA, L.F.; GARCEZ-DO-CARMO, L.; SANTOS, W.C. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology*, v.108, p. 26–30, 2006.

GRUNWALD, J. The European phytomedicines market: figures, trends, analysis. *HerbalGram*, v. 34, p. 60-65, 1995.

GUERRA, E. A. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicados à forma farmacêutica sólida de *Aesculus hippocastanum* L. (castanha da índia). Dissertação (mestrado) –Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2009.

HARTKE, K.; MUTSCHLER, E. *Deutsches Arzneibuch-9*. Ausgabe 1987. Kommentar. Stuttgart:wissenschaftliche, 1987.

HEBRICH, K. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists. 15 ed. Arlington:USA, AOAC, 1990.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology. Rockville: FDA, 1995.

ICH, International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 1996

JORGE, L.I.F.; AGUIAR, J.P.L. & SILVA, M.L. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia* - Myrtaceae. *Acta Amazonica* 30: 49-57, 2000.

LIST, P.H.; SCHIMDT, P.C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC, 1989.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 595-622, 2009.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. 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*. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2001. Cap. 24. p. 517 – 544.

MONTEIRO, J. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. de L. Taninos: uma Abordagem da Química à Ecologia. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 5, 892-896, 2005.

MONTGOMERY, D.C. *Diseño y análisis de experimentos*. México: Iberoamérica, 1991.

NEGRI, M. L. S. Secagem das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na atividade antioxidante e nos aspectos microbiológicos. Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2007.

OLIVEIRA, M. A. C. Fitoterápico: perfil fitoquímico, controle e validação da metodologia analítica. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. 2005.

PETROVICK, P.R.; SONAGLIO, D.; MELLO, J.C.P.; FRANCO, S.L.; CARDOSO, M.L. Eficácia terapêutica e padronização de fitoterápicos. IN: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10, 1988, São Paulo. Resumos. São Paulo: Departamento de Psicobiologia e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina, 1988. Painel 6/9, res.18.

REVILLA J. *Plantas da Amazônia – Oportunidades Econômicas e Sustentáveis*. 2. Ed., Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico/SEBRAE, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C.. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

ROMAGNOLO, M.B.; DE SOUZA, M.C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. *Acta bot. bras.* 20(3): 529-548. 2006.

SANTOS, A. S. dos. Caracterização química e tecnológica de taninos da casca das leguminosas florestais *Mora paraensis* Ducke e *Stryphnodendron guianense* (Aubl.) Benth. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) — Universidade Federal do Amazonas, 2008.

SILVA, A.L.G.; PINHEIRO M.C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). Acta bot. bras. 21(1): 235-247. 2007.

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*. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2005. Cap. 24. p. 517 – 544.

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*. Tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre. 2002.

SOARES L.A.L.; MAIA A.; OLIVEIRA A.L.; PETROVICK P.R. & GONZÁLEZ ORTEGA G. Avaliação de Complexos Formados por Catequina e Macromoléculas. Acta farmacéutica bonaerense - vol. 25 n° 1 - ano 2006.

SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.

SOLON, L. G. da S.. Determinação de taninos totais em solução extrativa de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). Trabalho de conclusão de curso em Farmácia na Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2006.

SOUZA, M. da C.; MORIM, M.P. Subtribos Eugeniinae O. Berg e Myrtinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. Acta bot. bras. 22(3): 652-683. 2008.

STICHER, O. Phenolische Verbindungen. In: HÄNSEL, R.; STICKER, O.; STEINEGGER, E. (Hrsgb.). *Pharmakognosie-Phytopharmazie*. 6. Auf. Berlin: Springer, 1999, Kap. 7, p. 771-934.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 25. rev. ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2003.



TRUGILLHO, P. F.; CAIXETA, R. P.; LIMA, J. T.; MENDES, L. M.. Avaliação do conteúdo em taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro. *Cerne*, Lavras, v. 3, n. 1, p. 1-13, 1997.

VERZA, S. G. 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. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

VIEIRA, R. F. & MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 3(1): 13-36. 2000.

VOIGT, R. *Pharmazentische Technologie*. 9. Uberarb. Aufe., Stuttgart: Wissenschaftliche, 2000.

WORLD Health Organization. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: WHO, 2006.

WORLD Health Organization. *WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. Geneva: WHO, 2002, 73 p.

ZIPCODEZOO. Disponível em: <[http://www.zipcodezoo.com/Plants/E/Eugenia\\_punicifolia](http://www.zipcodezoo.com/Plants/E/Eugenia_punicifolia)> . Acessado em: 10 de Dezembro de 2009.

