



20º Congresso de Iniciação Científica

DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS EM PRODUTOS FITOTERÁPICOS (PARTE II)

Autor(es)

TATIANA ALVES FUINI

Orientador(es)

CARLOS OTÁVIO MARIANO

Apoio Financeiro

FAPIC/UNIMEP

1. Introdução

Taninos são compostos fenólicos capazes de se complexar com proteínas, propriedade muito importante na manufatura do couro, bem como no controle de insetos, fungos e bactérias nas plantas. (SIMÕES et al., 2002) Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional como remédios para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996). São encontrados em uma vasta quantidade de plantas das quais foram selecionadas para o projeto, a espinheira-santa e o barbatimão contendo índices de taninos entre 2 e 8% de taninos respectivamente, apresentadas pela literatura como ricas em taninos e fornecidas pela Farmácia Valter Acorssi. De acordo com Simões (2002) os taninos são substâncias fenólicas tradicionalmente classificadas segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos condensados em geral estão amplamente distribuídos em plantas lenhosas. Já os taninos hidrolisáveis ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, porém dentro de limites taxonômicos bem definidos. A metodologia empregada para quantificação dos taninos baseia-se na análise espectrofotométrica que para esses compostos ocorrem na região do ultravioleta-visível.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRINCÍPIOS ATIVOS

Os princípios ativos são substâncias presentes nas plantas responsáveis pelo seu efeito terapêutico, sendo assim, a qualidade das plantas medicinais está relacionada ao seu teor de princípio ativo e, portanto, a sua eficiência terapêutica (MENDES et al., 2005). Os princípios ativos dos vegetais estão relacionados ao seu metabolismo secundário, que compreende funções de adaptação ao meio, como variações climáticas e composição do solo, funções de competição com outros vegetais e de defesa contra parasitas. A determinação do teor de princípio ativo se faz muito importante, uma vez que a quantidade de substâncias ativas presentes em uma determinada planta varia de acordo com as características climáticas a que esta se expõe no seu local de cultivo (habitat, regime de chuvas, insolação, tipo de solo, sazonalidade, etc.), além da idade da espécie, época da colheita e condições de estocagem.

2.2. LEI DE LAMBERT-BEER *

A espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de sua robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações (POZZI, 2007). As técnicas espectrofotométricas estão fundamentadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas, que depende tanto da concentração quanto da estrutura das mesmas; podendo ser utilizada como técnica de identificação e quantificação de substâncias (BRASIL, 2010). *Texto adquirido de DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA 9 QUANTIFICAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS EM PRODUTOS FITOTERÁPICOS (PARTE I)

2.3. DETERMINAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

O principal objetivo da análise quantitativa é determinar o quanto uma espécie está presente na amostra analisada. Na prática, a concentração de uma substância na amostra pode ser obtida através da

construção de uma curva analítica. A determinação de princípios ativos por Espectrofotometria em Ultra Violeta-Visível (UV-VIS) só é possível quando estes possuem grupos cromóforos (grupo insaturado covalente responsável pela absorção da radiação eletromagnética) na sua estrutura molecular (SOBRINHO et al., 2008). É uma técnica simples, rápida e de baixo custo, ideal para trabalhos de rotina, portanto, quando se pensa em controle de qualidade, a determinação de substâncias ativas por espectrofotometria UV-VIS se enquadra bem nesse contexto, concluem Chabariberi et al. (2008) e Marcucci et al. (1998).

2.4. DEFINIÇÃO DE TANINOS

Taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular e ocorrem em uma ampla variedade de vegetais, podendo ser encontrado nas cascas, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. O teor e a espécie de tanino variam, não só de um vegetal para o outro, mas também entre uma parte e outra da planta, dependem da idade e do tamanho do vegetal, da parte coletada, da época ou, ainda, do local de coleta. Características químicas dos 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. Propriedades Gerais

- Solúveis em água e em solventes orgânicos polares (acetona, álcool, glicerina). A solubilidade depende do grau de polimerização;
- São precipitados por sais de metais pesados (cobre, mercúrio, chumbo, estanho, zinco etc.);
- É insolúvel no éter puro, clorofórmio e Insolúveis em solventes orgânicos apolares (éter, clorofórmio benzeno);
- Se oxidam com facilidade, principalmente em meio ácido, podendo atuar como agentes antioxidantes.

Classificação dos taninos

Os taninos são classificados em hidrolisáveis e condensados.

2.5. OCORRÊNCIA EM PLANTAS

Os taninos podem estar presentes em todas as partes da planta (raiz, folhas, frutos, casca e madeira). As principais plantas que contêm taninos são: Quebracho, Acácia, Aroeira do sertão, Cajazeira, Nó-de-galha, Ratânia, Barbatimão, Hamamelis, Goiabeira, Espinheira-santa

2.6. AÇÃO TERAPÊUTICA DOS TANINOS

O uso de plantas pode representar uma alternativa de substituição aos anti-sépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana a estes compostos, uma vez que metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados (BARBOUR et al., 2004; MONTHANA; LINDEQUIST, 2005). Aplicações farmacológicas: Antimicrobianos, Antinutritivo, antioxidante, anti-séptico, adstringente, antídotos em intoxicações

2. Objetivos

Determinação de uma metodologia viável para quantificação de taninos totais em extratos secos.

3. Desenvolvimento

Procedimentos para a análise de taninos. Entre os métodos colorimétricos, o método de Folin-Denis é bem reconhecido e largamente usado.

1) Procedimento Pesar cerca de 500 mg da matéria-prima em um béquer de 100ml (anotar a massa exata pesada). Adicionar 50 ml de água osmose reversa e aquecer em banho-maria a 100C em refluxo com vidro de relógio por 1 hora. Resfriar em banho de água fria e filtrar em algodão para um balão volumétrico de 100 ml de água osmose reversa. Recolher o algodão no mesmo béquer, adicionar mais 50 ml de água osmose reversa e aquecer em banho-maria a 100C em vidro relógio por cerca de 30 minutos. Resfriar em banho de água fria e filtrar em algodão para o mesmo balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com água osmose reversa em quantidade suficiente para atingir o menisco. Com o auxílio de uma pipeta ou pipetador automático, transferir 0,5 ml da solução preparada para um balão volumétrico de 50 ml e adicionar 37,5 ml de água osmose reversa. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta ou pipetador automático, adicionar 0,5 ml de reativo de FOLIN-DENIS e 2,5 ml de solução saturada de carbonato de sódio. Após, completar o volume com água osmose reversa em quantidade suficiente para atingir o menisco, agitar levemente e guardar ao abrigo da luz, por aproximadamente, 30 minutos. Passado esse tempo de repouso, proceder a leitura espectrofotométrica da absorbância em (lâmbida= 630 nm), anotar o valor obtido e calcular a porcentagem de taninos de acordo com a seguinte equação: (5.1); onde absorbância medida = ABS massa=m (mg).

2) Procedimento Taninos totais Pesar, exatamente, cerca de 0,75 g da droga moída, transferir para balão de fundo redondo de 250 ml e adicionar 150 ml de água. Aquecer em banho-maria, sob refluxo, por 30 minutos à temperatura de 80 C - 90 C. Resfriar em água corrente, transferir a mistura para balão volumétrico e diluir a 250 ml com água. Deixar decantar o sedimento e filtrar através de papel de filtro. Desprezar os primeiros 50 ml do filtrado. O restante do filtrado constituirá a solução-mãe (SM).

Polifenóis totais: transferir 5 ml da SM para balão volumétrico 25 ml e completar o volume com água. Misturar 5 ml desta solução com 2 ml do reagente de Folin-Denis e diluir a 50 ml com solução de carbonato de sódio SR. Medir a absorvância da solução (A1) em 715 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água como branco. Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele: adicionar 0,2 g de pó-de-pele a 20 ml da SM e agitar mecanicamente por 60 minutos. Filtrar. Diluir 5 ml dessa solução para 25 ml com água. Misturar 5 ml desta solução com 2 ml do Reagente de Folin-Denis e diluir a 50 ml com solução de carbonato de sódio SR. Medir a absorvância da solução (A2) em 715 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água como branco.

Solução referência: dissolver 50mg de pirogalol em água e diluir a 100 ml. Diluir 5 ml desta solução a 100 ml com água. Misturar 5 ml desta solução com 2 ml do Reagente de Folin-Denis e diluir a 50 ml com solução de carbonato de sódio SR. Medir a absorvância da solução (A3) em 715 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente e dentro de 15 minutos contados da dissolução do pirogalol, utilizando água como branco. Calcular o teor de taninos pela expressão: (5.2) em que: TT = taninos totais; A1 = absorbância medida para polifenóis totais; A2 = absorbância medida para polifenóis não-adsorvidos; A3 = absorbância medida para a substância referência; m = massa da droga, em gramas, considerando a

determinação de água. 3) Procedimento Taninos totais Pesar, exatamente, cerca de 0,75 g da droga moída, transferir para balão de fundo redondo de 250 ml e adicionar 100 ml de água. Aquecer em banho-maria, sob refluxo, por 30 minutos. Resfriar em água corrente, transferir a mistura para balão volumétrico e diluir a 250 ml com água. Deixar decantar o sedimento e filtrar através de papel filtro. Desprezar os primeiros 20 ml do filtrado. O restante do filtrado constituirá a solução mãe (SM). Taninos totais: transferir 5 ml da SM para balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com água. Transferir 2 ml dessa solução, 2 ml do reagente de Folin-Denis e 16 ml de carbonato de sódio a 20% (p/V) para béquer de 50 ml. Medir a absorvância dessa solução (A1) em 750 nm, exatamente 2 minutos após a adição do último reagente. Utilizar água como branco. Fração não-tanante: adicionar 0,15 g de caseína a 10 ml da SM e agitar mecanicamente por 60 minutos. Filtrar. Diluir 5 ml dessa solução para 25 ml com água. Transferir 2 ml dessa solução, 2 ml do reagente de Folin-Denis e 16 ml de carbonato de sódio a 20% (p/V) para béquer de 50 ml. Medir a absorvância dessa solução (A2) em 750 nm, exatamente 2 minutos após a adição do último reagente. Utilizar água como branco. Solução de referência: dissolver 50 mg de pirogalol em água e diluir a 100 ml. Diluir 5 ml desta solução a 100 ml com água. Aguardar 30 minutos. Transferir 2 ml dessa solução, 2 ml do reagente de Folin-Denis e 16 ml de carbonato de sódio a 20% (p/V) para béquer de 50 ml. Medir a absorvância dessa solução (A3) em 750 nm, exatamente 2 minutos após a adição do último reagente. Utilizar água como branco. Calcular o teor de taninos totais, fração tanante e fração não tanante utilizando as expressões (5.4), (5.6) e (5.5) respectivamente: (5.3), (5.4), (5.5) e (5.6); em que $A\%$ = absorvância específica da solução de referência; A_3 = absorvância medida para a substância referência; c = concentração em mg/ml; TT = taninos totais em % (p/p); $FD = 12\ 500$ (fator de diluição) A_1 = absorvância medida para taninos totais; m = determinação de água; p = peso da droga (g); NT = fração não tanante em % (p/p); A_2 = absorvância medida para taninos não precipitáveis; FT = fração tanante em % (p/p). O resultado é fornecido em porcentagem (p/p). 4.1. Materiais Soluções e reagentes: • Carbonato de sódio: Dissolver 10,6 g de carbonato de sódio em 100 ml de água. • Reagente de Folin-Denis: A 75 ml de água adicionar 10 g de tungstato de sódio, 2 g de ácido fosfomolibdico e 5 ml de ácido fosfórico. Manter a mistura em refluxo por 2 horas, resfriar e diluir a 100 ml com água. A solução apresenta coloração esverdeada. • Carbonato de sódio 20% (p/v): Dissolver 200 g de carbonato de sódio anidro em 1000 ml de água a 60 C. • Gelatina: Adicionar 0,2 g de gelatina á 20 ml da SM e agitar mecanicamente por 1 h. • Caseína: Adicionar 0,15 g de caseína á 10 ml da SM e agitar mecanicamente por 1 h. Instrumentos • Espectrofotômetro Ultravioleta-visível Femto 800 XI- localizado no laboratório de alimentos da UNIMEP. • Mini incubadora com agitação orbital MA 410 - localizado no laboratório de alimentos da UNIMEP. • Balança analítica GTR Sartorius- localizado no laboratório de alimentos da UNIMEP. • Manta térmica MA 553/500- localizado no laboratório de alimentos da UNIMEP. • Dessecador- localizado no laboratório de alimentos da UNIMEP. • Condensador de bolas- localizado no laboratório de química da UNIMEP. 4.2. Características do material vegetal Material vegetal O material vegetal constitui a droga moída e seca pronta para ser utilizada como produto fitoterápico, sendo eles barbatimão e espinheira-santa, contendo aproximadamente 8% de taninos totais e 2% respectivamente, segundo a literatura.

4. Resultado e Discussão

A espectrofotometria é uma das principais metodologias empregadas para determinação do teor de taninos, formando um complexo de coloração azul com substratos protéicos ou poliméricos do qual se pode quantificar o princípio ativo por meio de espectrofotometria no visível. No procedimento 2 a gelatina era o agente complexante, os resultados não foram satisfatórios devido á grande complexação presente na solução em que seria realizada a leitura espectrofotométrica, mostrando-se um procedimento inadequado para a quantificação de taninos como mostrado na tabela 1, uma vez que houve substituição de pó-de-pele pela gelatina**. Considerando o tipo de polifenol analisado e a natureza do reagente envolvido foram determinados parâmetros como tempo de leitura, comprimento de onda e quantidade de reagente, fatores que determinam a cinética da reação após a adição do reagente de oxi-redução á solução extrativa diluída. O método de Folin-Denis é bem reconhecido e largamente usado, mas não faz distinção entre compostos fenólicos e outros materiais redutores ou antioxidantes, como o ácido ascórbico, formando precipitados que interferem na leitura espectrofotométrica. Tendo em vista que o processo de complexação esta relacionado com as proteínas e os polifenóis presentes no meio não é possível transcrever essa metodologia sem mais ensaios para outras drogas vegetais. ** pó-de-pele: material importado de alto custo e de fornecimento direto. Valores numéricos encontram-se na Tabela1 -Resultados em anexo.

5. Considerações Finais

Para o presente projeto foram propostos três procedimentos de quantificação de compostos farmacológicos denominados taninos, presentes em várias plantas e analisadas em duas espécies vegetais com diferentes teores tânicos, barbatimão e espinheira-santa, uma vez comprovadas e divulgadas as quantidades de taninos presentes nessas plantas, o projeto obteve êxito em dois dos três procedimentos considerados válidos para a quantificação de taninos totais.

Referências Bibliográficas

BATE-SMITH, E.C. Astringent tannins of Acer species Phitochemistry, v. 16, p. 1421-1426, 1977.

Brasil. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Plantas Medicinais e Fitoterapia. Disponível em Portal da Saúde. Acesso em 28 de fevereiro de 2012.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (vegetables tannins) as drugs: possible modes of action Journal of natural Products v.59, p. 205-215, 1996.

SANTOS, J. Taninos. 2010. Dissertação (Programa de Graduação Engenharia Agrícola e Ambiental) - Universidade Federal Rural de Pernambuco UFRPE Recife junho, 2010. Disponível em . Acesso em 27 de fev. 2012.

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. 4ª ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC; 2002..

TEIXEIRA, M. L.; SOARES, A. R., SCOLFORO, J. R. S Variação no teor de Tanino da casca de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em 10 locais de Minas Gerais. Ciência Prática, v.14, n.2, p.229-232, 1990.

Anexos

Tabela 1- Resultados

Metodologia de quantificação	Barbatimão	Espinheira-santa
<u>1</u>	4,6%	2,98%
<u>2</u>	19,69%	1,30%
<u>3</u>	7,66%	3,6%
Teor taninos na literatura	8%	2%