

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

***PATRÍCIA DE ABREU MARQUES COENTRÃO***

***AVALIAÇÃO DE TRÊS TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE  
POLIFENÓIS: aplicação em amostras de chocolate meio amargo***

***Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal  
Fluminense, como requisito  
parcial para obtenção do Grau de  
Mestre. Área de Concentração:  
Química Analítica.***

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> ANA MARIA R. TEIXEIRA**

***Niterói***

***2005***

**PATRÍCIA DE ABREU MARQUES COENTRÃO**

**AVALIAÇÃO DE TRÊS TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE  
POLIFENÓIS: aplicação em amostras de chocolate meio amargo**

*Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal Fluminense,  
como requisito parcial para  
obtenção do Grau de Mestre. Área  
de Concentração: Química Analítica.*

**Aprovada em Janeiro de 2005**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marta Regina Verruma Bernardi  
Faculdade de Nutrição/UFF lotada na  
Universidade Federal de São Carlos**

---

**Prof<sup>a</sup>. Heloísa Helena Rosmaninho Mantovani  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal Fluminense**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Maria R. de F. Teixeira  
Instituto de Química  
Universidade Federal Fluminense**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ricardo Erthal Santelli  
Instituto de Química  
Universidade Federal Fluminense**

**Niterói  
2005**

---

Coentrão, Patrícia de Abreu Marques

Avaliação de três técnicas de isolamento de polifenóis: aplicação em amostras de chocolate meio amargo/Patrícia de Abreu Marques Coentrão. – Niterói:[s.n.], 2005.

110 f.,30 cm.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Fluminense, 2005.

Bibliografia: f. 106 -109.

1. Isolamento de Polifenóis. I. Título.

---

## ***Meus Sinceros Agradecimentos***

- Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder vida e saúde para a realização deste trabalho;
- Aos meus queridos pais, José Marques e Neiva, por todo amor, dedicação e paciência. As minhas irmãs, pela amizade;
- Ao meu querido marido, Léo, por todo apoio, carinho, compreensão e ajuda nos momentos mais difíceis. Aos meus sogrinhos, Cláudio e Jane por estarem sempre presentes em todos os momentos;
- Aos grandes amigos: Renata, Rosanna, Liliane, Alessandra, Fernando, Jaílton e Ana, e a todos os companheiros do Mestrado em Química;
- Ao pessoal dos laboratórios 410, ex-física e 201/202, pelos preciosos momentos de descontração;
- À Capes, pelo apoio financeiro;
- À Frederico Guilherme, pela amizade e ajuda essencial na percolação das colunas cromatográficas de isolamento;
- À amiga Rosanna, pela ajuda na leitura das soluções do padrão através da espectrofotometria no ultravioleta;
- Ao bolsista de graduação em Farmácia, Leandro, pelo essencial treinamento do uso do equipamento HPLC;
- À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria, pelo auxílio e colaboração;
- À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Albino da Faculdade de Farmácia, pela informação sobre o mestrado;
- Aos meus professores Antônio Silva (UFRJ), Santelli, Sílvia e Denise; pelo fundamental auxílio técnico e fornecimento de insumos necessários à realização deste trabalho;
- Ao pessoal da Sinc (Marcus, Rogério, Sidney e Gustavo) e ao Ciro da Tédia; pelo rápido e importante apoio técnico;
- À Marcos Pereira Rosa, pelo belíssimo trabalho desempenhado no laboratório de Hialotecnica da UFF;
- Enfim, à todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho de pesquisa.

***“Let food be the medicine and medicine be the food”***

*“Faça do alimento o seu medicamento”*

Hipócrates (2500 anos atrás)

## RESUMO

Os polifenóis são componentes intrínsecos do cacau, e assim, produtos derivados do cacau, como o chocolate, podem ser considerados como alimento funcional por conferirem efeitos benéficos à saúde do consumidor, como é sugerido para o vinho tinto e o chá verde ou preto. Devido à evidência de que os polifenóis podem agir como potenciais antioxidantes, desempenhar uma importante função na redução do risco ou retardo do desenvolvimento de doenças, como as cardiovasculares, câncer e outras relacionadas à idade; e ainda, modular processos biológicos essenciais em mamíferos *in vivo*; as áreas de nutrição e medicina têm tido um especial interesse nestes compostos. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar novas fases estacionárias para isolamento de polifenóis, através do uso da espuma de poliuretano e de resina polimérica (XAD-16) e determinar a fase de maior eficiência, comparando-se os dados obtidos com aqueles descritos na literatura (C18). O monitoramento da eficiência do processo foi feito por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cujos dados permitiram estabelecer um índice que mede a relação P/C, como sendo a relação entre o maior pico do polifenol e o maior pico do carboidrato, expressos através de suas alturas ou absorbâncias (mAU). A resina XAD-16 se mostrou como a fase de maior eficiência e foi usada para isolar os polifenóis presentes em amostras de chocolate. Foi alcançada uma significativa separação dos polifenóis com reprodutibilidade comprovada através dos experimentos em triplicata. Nesta fase estacionária, a água se apresentou como um eluente adequado para carboidratos, enquanto o metanol foi eficaz na eluição dos polifenóis, pois foram obtidas frações cujos cromatogramas permitiram calcular razões P/C muito maiores que 100%, mesmo diante de teores muito pequenos de polifenóis.

Palavras-chaves: polifenóis, chocolate, cromatografia, coluna C18, resina XAD-16 e espuma de poliuretano.

## ABSTRACT

Polyphenols were intrinsic components of the cocoa; therefore, derivative products of cocoa, like chocolate, can be considered functional food, bringing beneficial effects to costumer's health, as it is suggested for red wine and green or black tea. Nutrition and medicine areas have dedicated special attention to these components. That is due to evidences that polyphenols can act as potential antioxidants, and that they can carry out an important function in the reduction of the risk or delay of the development of diseases, like the cardiovascular ones, cancer and other ones related to aging; and yet, that they can modulate essential biological processes mammals *in vivo*. The first objective of this work was to evaluate novel stationary phases for the isolation of polyphenols, by the use of polyurethane foam and of a polymeric resin (XAD-16). Therefrom, to determine the best phase by comparison of performance with the one of a phase previously described in literature (C18), by high-performance liquid chromatography (HPLC). Once the phase is chosen, the second objective is to isolate polyphenols from chocolate samples. An index was established to monitor the performance by the ratio P/C, the ratio of heights or absorbances (mAU) of the largest peak among the ones attributed to polyphenols and the largest peak among the ones attributed to carbohydrates. The chosen column was XAD-16, given the observed separation of the polyphenols and reproductibility of elutions, which was confirmed by triplicate procedures. The polymeric resin XAD-16 was shown as a quite effective way to isolate polyphenols from carbohydrates because the latter are eluted with water while the polyphenols are retained. Subsequent methanol elution was considered quite appropriate for the recovery of polyphenols, because the chromatograms of the fractions obtained yielded P/C ratios much higher than 100%, even considering very small contents of polyphenols.

Key-Words: polyphenols, chocolate, chromatography, column C18, resin XAD-16 and polyurethane foam.

# SUMÁRIO

<u>1 - Introdução</u> .....	13
<u>1.1 - Importância dos polifenóis</u> .....	15
<u>1.2 - Justificativa</u> .....	16
<u>2 - Objetivos</u> .....	18
<u>2.1 - Objetivo Geral</u> .....	18
<u>2.2 - Objetivos Específicos</u> .....	18
<u>3 - Revisão de Literatura</u> .....	20
<u>3.1 - Química dos polifenóis</u> .....	20
<u>3.2 - Ocorrência dos polifenóis</u> .....	27
<u>3.3 - Biodisponibilidade dos polifenóis</u> .....	29
<u>3.4 - Atividade antioxidante dos polifenóis em alimentos</u> .....	32
<u>4 - Metodologia disponível para análise, isolamento, purificação e identificação</u> ....	38
<u>4.1 - Isolamento de polifenóis em coluna de sílica modificada com C18</u> .....	39
<u>4.2 - Isolamento de polifenóis em espumas de poliuretano</u> .....	44
<u>4.2.1 - Definição, estrutura e síntese da espuma de poliuretano</u> .....	46
<u>4.3 - Isolamento de polifenóis por meio de resina polimérica</u> .....	51
<u>5 - Análise quantitativa dos flavonóides</u> .....	54
<u>5.1 - Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</u> .....	55
<u>6 - Materiais e Métodos</u> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>6.1 – Preparo de solução padrão estoque de polifenóis</u> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>6.1.1- Medidas da estabilidade da solução padrão de polifenóis usando espectrofotometria</u>	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido.</b>	
<u>6.1.2 – Medida de estabilidade das soluções padrão de polifenóis usando HPLC</u>	<b>Erro! Indicador</b>
<b>não definido.</b>	
<u>6.1.3 - Procedimento de Extração em Fase Sólida usando coluna empacotada com C18</u>	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido.</b>	
<u>6.1.4 - Otimização da Extração em Fase Sólida com a coluna XAD-16</u>	<b>Erro! Indicador não</b>
<b>definido.</b>	



[6.1.5 - Otimização da Extração em Fase Sólida com a coluna de espuma de poliuretano](#) Erro!

**Indicador não definido.**

[6.2 - Estudo com amostras de chocolate](#) ..... **Erro! Indicador não definido.**

[6.2.1 - Procedimento experimental aplicado as amostras](#) ..... **Erro! Indicador não definido.**

[6.2.2 - Pré-tratamento das amostras](#) ..... **Erro! Indicador não definido.**

[6.2.3 - Percolação da amostra por uma coluna de resina XAD- 16](#) . **Erro! Indicador não definido.**

[6.3 - Caracterização dos Polifenóis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência\(HPLC\)](#)

..... **Erro! Indicador não definido.**

[7 - Resultados e Discussão](#) ..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.1 - Estudo com padrão](#) ..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.1.1 - Avaliação das medidas da estabilidade da solução padrão de polifenóis usando espectrofotometria](#)..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.1.2 - Avaliação da estabilidade do padrão através do sistema de HPLC](#) Erro! Indicador não definido.

[7.1.3 - Condições de Contorno do Padrão para as colunas C18, XAD-16 e Espuma](#) Erro!

**Indicador não definido.**

[7.1.4 - Avaliação da coluna C18](#)..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.1.5 - Avaliação da coluna XAD-16](#)..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.1.6 - Avaliação da coluna de espuma de poliuretano](#)..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.1.7 - Seleção da melhor coluna de extração em fase sólida](#) ..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.2 - Estudo com amostras de chocolate](#) ..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.2.1 - Condições de Contorno das Amostras na Coluna XAD-16](#).. **Erro! Indicador não definido.**

[7.2.2 - Avaliação da marca A](#)..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.2.3 - Avaliação da marca B](#)..... **Erro! Indicador não definido.**

[7.2.4 - Comparação entre as marcas A e B](#) ..... **Erro! Indicador não definido.**

[9 - Referências Bibliográficas](#) ..... **Erro! Indicador não definido.**

## Lista de Figuras

<u>Figura 1 - Estruturas de polifenóis comuns encontrados no chocolate.<sup>8</sup></u> .....	21
<u>Figura 2 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários <sup>29</sup></u> .....	22
<u>Figura 3 - Estrutura básica e sistema de numeração dos Flavonóides</u> .....	25
<u>Figura 4 - Possíveis rotas dos polifenóis ingeridos por humanos</u> .....	31
<u>Figura 5 - Estrutura da quercetina, mostrando as características estruturais relacionadas à capacidade antioxidante</u> .....	35
<u>Figura 6 - Perfil do procedimento geral de trabalho para análise, quantificação, isolamento e elucidação da estrutura dos polifenóis em alimentos.<sup>12, 66, 67, 68, 69</sup></u> .....	38
<u>Figura 7 - Superfície em escova da fase ligada alquil na sílica gel</u> .....	42
<u>Figura 8 - Reações comumente empregadas na preparação da EPU</u> .....	48
<u>Figura 9 - Reações paralelas que ocorrem durante a preparação das EPU: formação das ligações cruzadas e das ramificações</u> .....	49
<u>Figura 10 - Estrutura química da resina XAD-16 (estireno-divinilbenzeno)</u> .....	52
<u>Figura 11 – Coluna C18</u> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 12 - Coluna XAD-16</u> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 13 – Coluna de Espuma de Poliuretano</u> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 14 - Espectro de absorção para o padrão Polyphenon 60</u> . <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
<u>Figura 15 – Variação da absorbância em função da concentração obtida na faixa do visível (<math>\lambda=440\text{nm}</math>)</u> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 16 - Comparação entre as absorbâncias de soluções recolhidas da coluna C18 (cartucho) provenientes da percolação do Padrão 1 (<math>\lambda=440\text{nm}</math>)</u> . <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
<u>Figura 17 - Curva de calibração para as soluções preparadas a partir do Padrão 1 (<math>\lambda=280\text{ nm}</math>)</u> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 18 - Curva de calibração para as soluções preparadas a partir do Padrão 2 (<math>\lambda=280\text{ nm}</math>)</u> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 19 - Curva de calibração para soluções preparadas a partir do Padrão 2 (<math>\lambda=280\text{ nm}</math>)</u> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 20 - Acompanhamento da estabilidade ao longo do tempo, apenas para a solução de 6,40 ppm em água, originada do padrão 2, no comprimento de onda igual a 280 nm</u> . <b>Erro! Indicador não definido.</b>	

Figura 21 - Acompanhamento da estabilidade ao longo do tempo, apenas para a solução de 25,50 ppm em água, originada do padrão 2, no comprimento de onda igual a 280 nm.**Erro!**

**Indicador não definido.**

Figura 22 - Comparação da estabilidade para uma solução de 510 ppm, originada do padrão 3; usando-se a mistura de acetona, ácido acético e água como solvente, no comprimento de onda igual a 280 nm...... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23 - Cromatograma do padrão de chá verde Polyphenon 60**Erro! Indicador não definido.**

Figura 24 - Acompanhamento da estabilidade do padrão de chá verde em água ao longo do tempo, através de seus analitos: carboidrato 1 (CH1), carboidrato 2 (CH2), polifenol 1 (Pf1) e polifenol 2 (Pf2)...... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25 - Comparação da estabilidade entre os carboidratos e polifenóis contidos no P1 e no P2, do primeiro dia de análise e dezesseis dias depois...... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26 - Acompanhamento da estabilidade do padrão de chá verde em meio não aquoso, ao longo do tempo: carboidrato 1 (CH1), carboidrato 2 (CH2), polifenol 1 (Pf1) e polifenol 2 (Pf2)...... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 27 - Cromatograma do Padrão Polyphenon 60 após ter sido adicionado a coluna XAD-16...... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 28 - Cromatograma do Padrão Polyphenon 60 após ter sido adicionado a coluna XAD-16 (duplicata)...... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 29 - Cromatograma do Padrão Polyphenon 60 após ter sido adicionado a coluna XAD-16 (triplicata)...... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 30 - Cromatograma do Padrão Polyphenon 60 após ter sido adicionado a coluna XAD-16 (Zoom do Carboidrato 1 e do Polifenol 1)...... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 31 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca A1.**Erro!**

**Indicador não definido.**

Figura 32 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca A2.**Erro!**

**Indicador não definido.**

Figura 33 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca A3.**Erro!**

**Indicador não definido.**

Figura 34 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca B1.**Erro!**

**Indicador não definido.**

Figura 35 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca B2.**Erro!**

**Indicador não definido.**

Figura 36 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca B3.**Erro!**

**Indicador não definido.**

<u>Figura 37 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca A1, sem os carboidratos.....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 38 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca A2, sem os carboidratos.....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 39 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca A3, sem os carboidratos.....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 40 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca B1, sem os carboidratos.....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 41 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca B2, sem os carboidratos.....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Figura 42 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca B3, sem os carboidratos.....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## Lista de Tabelas

<u>Tabela 1- Estruturas das Catequinas e Procianidinas.....</u>	21
<u>Tabela 2 - Principais classes de compostos polifenólicos <sup>28</sup> .....</u>	23
<u>Tabela 3 - Classificação dos principais flavonóides em alimentos <sup>30</sup> .....</u>	24
<u>Tabela 4 - Coeficientes de distribuição e capacidade de absorção do fenol em espuma de poliuretano. <sup>84</sup> .....</u>	51
<u>Tabela 5 - Composição das soluções-estoque P1, P2 e P3 ....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Tabela 6 - Experimentos realizados na Coluna C18 .....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Tabela 7 - Experimentos realizados na Coluna XAD-16 .....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Tabela 8 - Experimentos realizados na Coluna de Espuma de Poliuretano</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Tabela 9 - Volume do extrato das amostras A e B de chocolate, percolado pela resina XAD-16 e volume de eluente usado.....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Tabela 10 - Valores de Absorbâncias medidos para soluções recolhidas a partir do Padrão 1, após percolarem a coluna C18 cartucho. (<math>\lambda=280</math> nm).....</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Tabela 11 - Valores de Absorbância medidos para as soluções preparadas a partir do Padrão 3 (padrão em meio de acetona, água e ácido acético)- <math>\lambda=280</math> nm.</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<u>Tabela 12 - Resultados relevantes encontrados para a coluna C18</u>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

Tabela 13 - Resultados relevantes encontrados para a coluna XAD-16**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 14 - Resultados relevantes encontrados para a coluna de espuma**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 15 - Relação P/C das amostras de referência das marcas A e B equivalentes a 100%.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 16 - Resultados relevantes encontrados para a amostra A**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 17 - Resultados relevantes encontrados para a amostra B**Erro! Indicador não definido.**

## 1 - Introdução

O cacau é fruto do cacaueiro (*Theobroma cacao*) e significa, em grego, “alimento dos deuses”. O cacau cresce nas regiões quentes do mundo e suas sementes não podem ser ingeridas diretamente da árvore, sem serem submetidas a um tratamento prévio. Elas têm primeiramente que ser fermentadas e secas.

Desde os primórdios do século VI, os Maias tinham suas plantações de cacau na América Central. Neste tempo, o cacau tinha duas funções: era usado para preparar uma deliciosa bebida e também era utilizado como uma forma de pagamento.<sup>1</sup>

No século XVI, o chocolate foi levado para a Europa e então, em 1875, Daniel Peters fez o primeiro chocolate feito com leite e em 1880, Rodolphe Leindt fez um suave chocolate derretido pela adição de manteiga de cacau à massa de chocolate (*líquor*).<sup>1</sup>

A idéia que o chocolate ou o cacau podem conferir alguns benefícios à saúde não é necessariamente um conceito novo. Quando Cortez visitou a América Central, uma de suas primeiras observações foi à rotina do uso do chocolate, particularmente, pelo alto sacerdócio. O mais curioso foi referente ao chocolate primariamente como um medicamento e documentos históricos na Europa referem-se ao valor medicinal do chocolate.<sup>2</sup>

Entre 1600 e 1700, o chocolate e o cacau eram vistos não apenas como uma bebida de sabor agradável; mas, primariamente, como um alimento para tratar

alguns distúrbios, incluindo a angina e dores no coração. O conceito de que as bebidas do cacau poderiam prover benefícios à saúde foi amplamente aceito até por volta de 1850 e início de 1900. Somente nos últimos 30 a 40 anos, as percepções do chocolate mudaram de um alimento medicinal para apenas um doce, sem efeitos benéficos ou possíveis efeitos negativos para a saúde.<sup>2</sup>

A avaliação sensorial dos alimentos é uma característica primária do homem que desde a infância, aceita ou rejeita os alimentos, de acordo com a sensação que experimenta ao ingerí-los. Assim, o chocolate, por suas propriedades de sabor, goza de uma aceitação quase universal.<sup>1</sup>

O chocolate é um alimento de grande valor nutritivo e energético (cerca de 523,8 Kcal por 100g) que permite uma rápida metabolização por parte do organismo humano. Seus três ingredientes: cacau, leite e açúcar levam-no a ser considerado como um dos alimentos melhor balanceados que existem, devido ao teor de proteínas, carboidratos, lipídios, sais minerais e vitaminas.<sup>1</sup>

Os produtos do cacau e do chocolate têm sido iguarias por centenas de anos. Só ultimamente, eles têm sido reconhecidos como fontes significativas de fitoquímicos com efeitos desejáveis a saúde. Esses alimentos estão entre as fontes mais concentradas de flavonóides como as procianidinas, catequinas e epicatequinas.<sup>2</sup>

Os flavonóides são os polifenóis mais abundantes de nossa dieta e o consumo de polifenol como flavonóides tem sido alvo de interesse de consumidores e indústrias alimentícias por várias razões. Estudos epidemiológicos têm sugerido associações entre o consumo de bebidas ou alimentos ricos em polifenóis e a prevenção de doenças.<sup>3</sup>

Uma segunda razão está ligada à natureza química fundamental dos polifenóis. Os polifenóis são agentes redutores e junto com outros agentes redutores da dieta, como a vitamina C, vitamina E e carotenóides, eles protegem os tecidos corporais contra o estresse oxidativo.<sup>3</sup>

Estudos atuais têm mostrado que esses polifenóis (procianidinas, catequinas e epicatequinas) são absorvidos no intestino de animais e humanos, sendo a epicatequina absorvida muito mais que a catequina. Esses flavonóides têm potencial antioxidante e atividades anti-plaquetárias, através do consumo de cacau ou de chocolate. <sup>2</sup>

## 1.1 - Importância dos polifenóis

Por décadas, os polifenóis de plantas despertaram o interesse de cientistas, porque eles são essenciais a fisiologia da planta, pela contribuição em sua morfologia (pigmentação), envolvimento no crescimento e reprodução, e ainda, oferecendo resistência a patógenos e predadores. <sup>4-6</sup>

Os perfis de polifenóis de plantas diferem entre variedades da mesma espécie e, portanto, eram pesquisados com propósitos taxionômicos ou para determinar adulteração em produtos alimentícios. <sup>4-6</sup>

Os polifenóis possuem várias aplicações industriais, como na produção de tintas, papéis e cosméticos, como agentes taninos e como aditivos (corantes naturais e conservantes) na indústria de alimentos. Além disso, alguns compostos fenólicos, os flavonóides, têm aplicações como antibióticos e agentes antidiarréicos, antiúlceroativo e anti-inflamatório; bem como o tratamento de doenças como a hipertensão, fragilidade vascular, alergias, hipercolesterolemia e outras. <sup>4-6</sup>

Os compostos polifenólicos são onipresentes em órgãos de todas as plantas e são, portanto, parte integrante da dieta humana. Até bem pouco tempo atrás, a maior parte do interesse nutricional nos compostos polifenólicos era sobre os efeitos deletérios causados pela habilidade de certos polifenóis em se ligar e precipitar macromoléculas, como as proteínas dietéticas, carboidratos e enzimas digestivas; reduzindo, assim, sua digestibilidade. <sup>7</sup>

Os polifenóis têm recebido muita atenção, recentemente, devido a sua capacidade antioxidante (reagindo com radicais livres e quelando metais) e suas



possíveis implicações benéficas na saúde humana, como na prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias.<sup>8</sup>

A Associação Dietética Americana (ADA) especifica que as substâncias nos alimentos, por exemplo, os fitoquímicos que são componentes naturais e constituintes dos chamados alimentos funcionais, podem desempenhar uma importante função benéfica para a saúde como parte de uma dieta variada<sup>9</sup>. Dentre os fitoquímicos, os polifenóis constituem um dos grupos de substâncias mais numerosos e largamente distribuídos no Reino Vegetal, com mais de 8000 estruturas fenólicas conhecidas.<sup>7</sup>

## 1.2 - Justificativa

Os polifenóis existem como componentes intrínsecos do cacau, e assim, produtos derivados do cacau como o chocolate, podem ser considerados um alimento funcional para conferir efeitos benéficos à saúde do consumidor, como é sugerido para o vinho tinto e o chá verde ou preto.<sup>10</sup>

A manufatura do chocolate, em particular, em relação a mudanças na composição e no conteúdo de polifenóis não têm sido muito objeto de investigação, com exceção dos casos de aplicação de patente<sup>11</sup>. Além disso, é ainda muito limitado o conhecimento sobre o teor e a composição de polifenóis no chocolate, especialmente no chocolate ao leite; apesar de produtos do cacau serem largamente consumidos.<sup>12</sup>

Devido à evidência de que os polifenóis podem agir como potenciais antioxidantes, desempenhar uma importante função na redução do risco ou retardo do desenvolvimento de doenças, como as cardiovasculares, câncer e outras relacionadas à idade; e ainda, modular processos biológicos essenciais em mamíferos *in vivo*; as áreas de nutrição e medicina têm tido um especial interesse nestes compostos<sup>13-24</sup>. Cada vez mais, têm-se desenvolvido métodos de seleção e/ou processamento dos grãos de cacau, para produzir componentes do cacau ou do chocolate com níveis aumentados de polifenóis.<sup>12</sup>

O Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) de um alimento pode ser considerado como o conjunto de características ou atributos que o identificam ou qualificam, ou seja, o objetivo é fixar a identidade e as características mínimas de qualidade às quais o produto deverá obedecer <sup>25</sup>. De acordo com a expressão “Padrão de Identidade”, o chocolate amargo deve apresentar pelo menos 3600 µg (à até mais de 8000 µg) de polifenóis do cacau, por grama de chocolate, enquanto que para o chocolate ao leite encontra-se pelo menos 1000 µg (até mais de 5000 µg), por grama de chocolate ao leite <sup>12</sup>. O padrão de identidade do chocolate está intimamente relacionado com o teor de polifenóis.

Polifenóis isolados de carboidratos e de outras espécies, ou seja, o material puro pode ser necessário para atividades de mensuramento, por exemplo, atividade antioxidante ou anticarcinogênica, ou para estudos de biodisponibilidade em animais, humanos ou em cultura de células <sup>12</sup>. Técnicas usuais e atuais para separação de polifenóis fundamentam-se em colunas de sílica modificada com C18, para o caso de escala preparativa, e em coluna de sílica, num sistema de HPLC. A coluna C18 tem custo elevado e não tem uso viabilizado sob fluxo gravitacional.

O presente estudo visa contribuir com a proposta do uso de duas técnicas de isolamento de polifenóis, utilizando-se espumas de poliuretano-EPU e resina polimérica, tipo Amberlite XAD-16 que, ao contrário da coluna C18, são viáveis de uso sob fluxo gravitacional. A espuma de poliuretano é de baixo custo enquanto que a resina é de custo elevado, mas facilmente regenerável sendo, portanto, ambas convidativas para trabalho de rotina. Uma das técnicas avaliadas foi escolhida para isolamento de polifenóis presentes em amostras de chocolate; adquiridas em estabelecimento comercial de Niterói, no Estado do Rio de Janeiro.

Sendo assim, além da avaliação de novas possibilidades de isolamento de polifenóis, este trabalho também vem contribuir gerando dados sobre polifenóis que não estão disponíveis, na literatura, para o chocolate meio amargo produzido no Brasil.

## **2 - Objetivos**

### **2.1 - Objetivo Geral**

Avaliar novas técnicas de isolamento de polifenóis, através do uso de espuma de poliuretano e de resina polimérica (XAD-16) e determinar a melhor técnica através da comparação da eficiência de separação, com os dados descritos na literatura (C18). As técnicas foram monitoradas por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e, a mais eficiente, foi aplicada para isolamento de polifenóis presentes em amostras de chocolate meio amargo.

### **2.2 - Objetivos Específicos**

- Avaliar condições experimentais para isolamento dos polifenóis, segundo o procedimento descrito na literatura;
- Avaliar condições experimentais para isolamento dos polifenóis, através da percolação em espuma de poliuretano;
- Avaliar condições experimentais para o isolamento de polifenóis, utilizando-se coluna de resina (XAD-16);
- Comparar a eficiência do isolamento de polifenóis nas três técnicas citadas, em escala preparativa: aquela usualmente divulgada na literatura (C18), o uso de espuma de poliuretano e de coluna de resina;

- Isolamento dos polifenóis, em amostras de chocolate meio amargo, de acordo com a técnica avaliada como a mais eficiente e monitoramento por HPLC.

## 3 - Revisão de Literatura

### 3.1 - Química dos polifenóis

As plantas fornecem fontes alimentares aos animais que contém diversos tipos de compostos químicos comumente chamados de fitoquímicos. Os polifenóis são uma classe de fitoquímicos, com pelo menos 8.000 membros conhecidos.<sup>7</sup>

O cacau é rico em polifenóis particularmente em catequinas (flavan-3-ols ou sub-classe flavanol) e procianidinas (catequinas oligoméricas e poliméricas). O conteúdo de polifenol total do grão é cerca de 6-8% do peso do grão seco.<sup>10</sup>

As catequinas monoméricas predominantes no chocolate são (+)- catequina (C) e (-)- epicatequina (EC). As procianidinas são uma classe de compostos polifenólicos encontradas em várias espécies de plantas e podem estar presentes como monômeros individuais ou, em alguns casos, como unidades oligoméricas<sup>26</sup>. (Fig. 1)

As procianidinas são formadas pela associação de várias unidades monoméricas (catequinas e epicatequinas): 2-5 unidades, para catequinas oligoméricas; e acima de 5 unidades, para catequinas poliméricas. As procianidinas diferem na posição e na configuração de suas ligações monoméricas. As estruturas mais bem conhecidas são os dímeros de procianidinas B1, B2, B3 e B4 ; e os trímeros, C1 e C2 (Tab.1).<sup>27</sup>

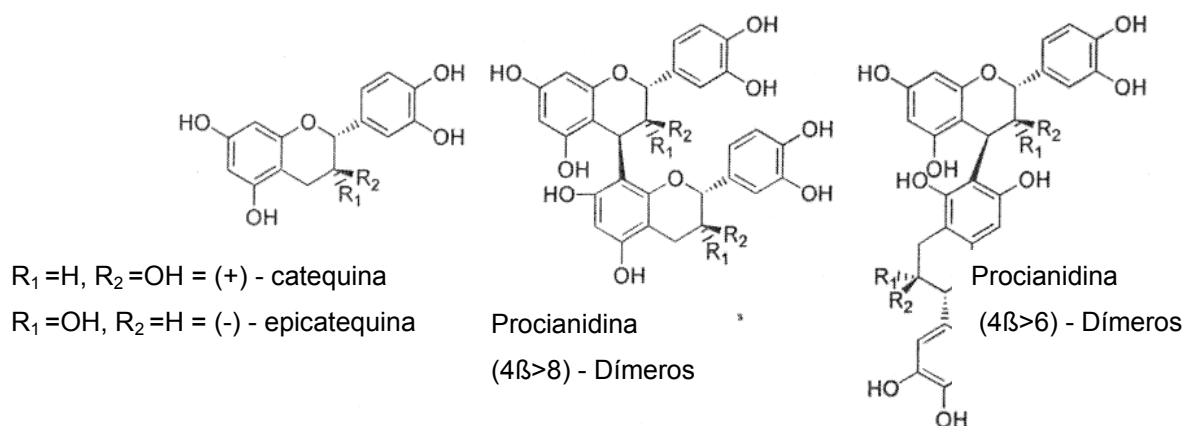


Figura 1 - Estruturas de polifenóis comuns encontrados no chocolate.<sup>8</sup>

Tabela 1 - Estruturas das Catequinas e Procianidinas.

Nome	Estrutura
Procianidina B1	(-)-epicatequina-(4-8)-(+) - catequina
Procianidina B2	(-)-epicatequina-(4-8)-(-)-epicatequina
Procianidina B3	(+) - catequina-(4-8)-(+) - catequina
Procianidina B4	(+) - catequina-(4-8)-(-)-epicatequina
Procianidina C1	(-)-epicatequina-(4-8)-(-)-epicatequina-(4-8)-(-)-epicatequina
Procianidina C2	(-)-epicatequina-(4-8)-(-)-epicatequina-(4-8)-(+) - catequina

Polifenóis são um grupo de substâncias de plantas extremamente amplo e complexo<sup>7</sup>. Os polifenóis são produtos do metabolismo secundário de plantas. Eles surgem biogeneticamente por duas principais vias metabólicas sintéticas: “via do ácido chiquímico” e “via do acetato” (Fig. 2).<sup>28</sup>

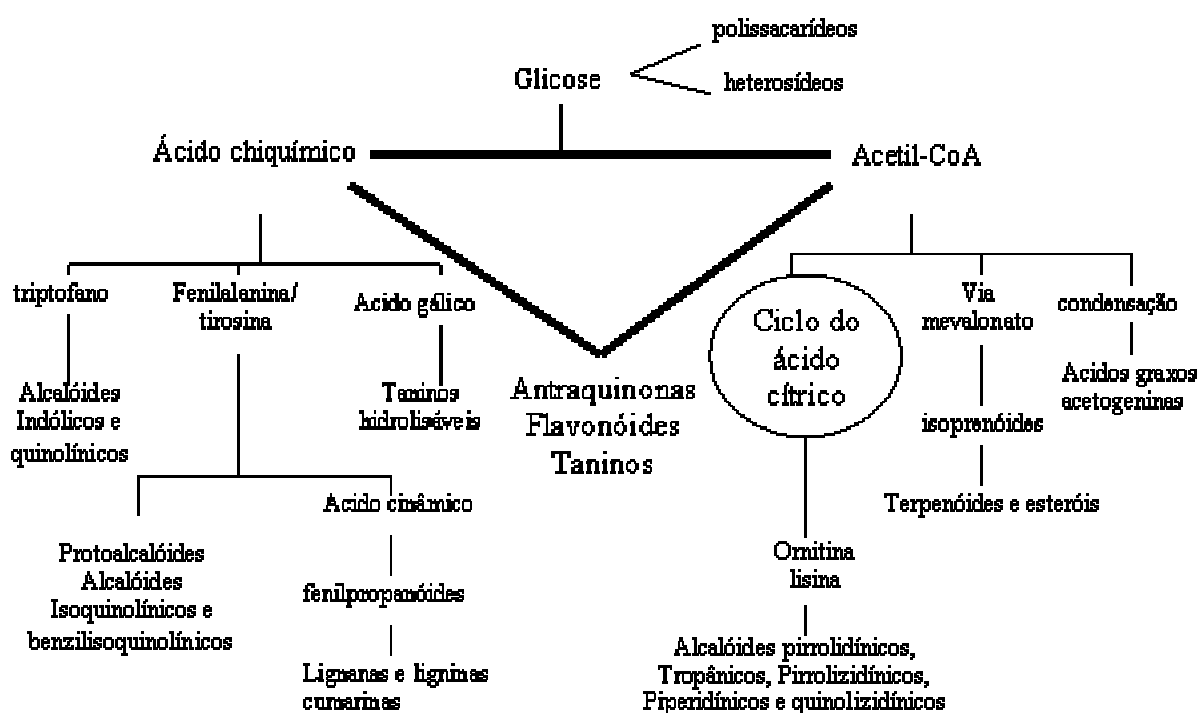
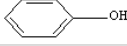

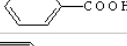
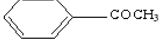
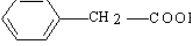
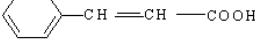
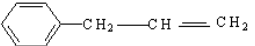
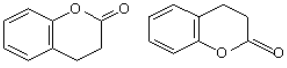
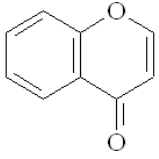
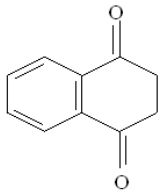
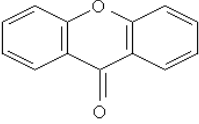
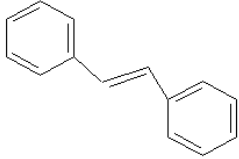
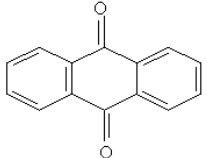


Figura 2 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários <sup>29</sup>

Os polifenóis naturais (Tab.2) podem abranger desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados, como os taninos. Eles ocorrem primariamente sob forma conjugada, com um ou mais resíduos de carboidratos ligados a grupos hidroxil, embora ligações diretas da unidade do carboidrato com um átomo de carbono aromático também existam. <sup>7</sup>

Os carboidratos associados podem estar presentes como monossacarídeos, dissacarídeos, ou mesmo como oligossacarídeos. A glicose é o resíduo de carboidrato mais comum, apesar da galactose, raminose, xilose e arabinose também serem encontradas, bem como os ácidos glicurônico e galacturônico e muitos outros. Associações com outros compostos, como os ácidos orgânicos, aminas e lipídios, e ligações com outros fenóis são também comuns. <sup>7</sup>

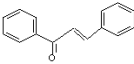
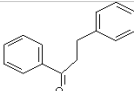
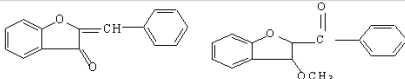
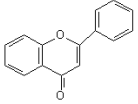
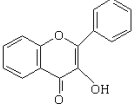
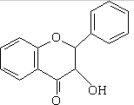
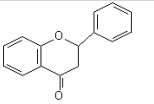
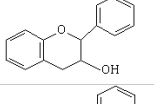
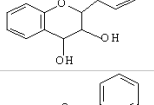
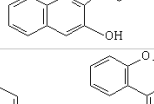

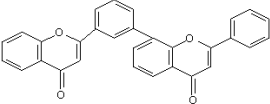
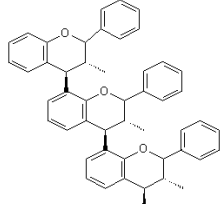
Tabela 2 - Principais classes de compostos polifenólicos <sup>28</sup>

Classes	Esqueleto básico	Estrutura básica
Fenóis simples	C <sub>6</sub>	
Benzoquinonas	C <sub>6</sub>	
Ácidos fenólicos	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
Acetofenonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Ácidos fenilacéticos	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Ácidos hidroxicinâmicos	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Fenilpropanos	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Cumarinas, Isocumarinas	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Cromonas	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Naftoquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	
Xantonas	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	
Stilbenes	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Antraquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Flavonóides	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	
Lignanas, Neolignanas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
Ligninas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	

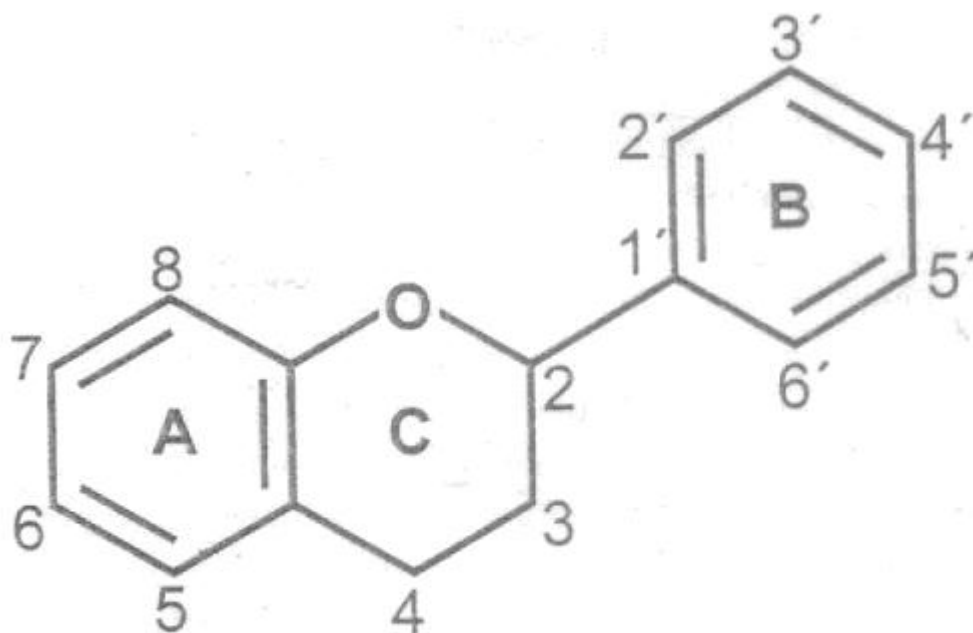


Os flavonóides, os quais constituem o grupo mais importante dos polifenóis, com mais de 5000 compostos descritos<sup>30</sup>, são ilustrados em suas principais classes fenólicas encontradas nos alimentos (Tab.3).

*Tabela 3 - Classificação dos principais flavonóides em alimentos<sup>30</sup>*

Flavonóides	Estrutura básica
Chalconas	
Dihidrochalconas	
Auronas	
Flavonas	
Flavonóis	
Dihidroflavonóis	
Flavanonas	
Flavanóis	
Flavandióis ou Leucoantocianidinas	
Antocianidinas	
Isoflavonóides	
Biflavonóides	
Proantocianidinas ou Taninos condensados	

A estrutura mais comum dos flavonóides é aquela do difenilpropano (C6-C3-C6) e consiste em dois anéis aromáticos ligados através de três carbonos que usualmente formam um anel heterocíclico oxigenado. A Figura 3 representa a estrutura básica e o sistema utilizado de numeração dos carbonos nos núcleos dos flavonóides. Biogeneticamente, o anel A, usualmente, é sintetizado pela “via do acetato”, já o anel B é derivado da “via do ácido chiquímico”.<sup>31</sup>



*Figura 3 - Estrutura básica e sistema de numeração dos Flavonóides.*

Os Flavonóides (ex: catequina, epicatequina, galocatequina) são os constituintes monoméricos dos taninos condensados, embora eles sejam também muito comuns como monômeros livres.<sup>32</sup>

Os Fenóis simples e flavonóides representam a vasta maioria dos fenóis em plantas. A maioria desses compostos possui pesos moleculares relativamente baixos e são solúveis de acordo com sua polaridade e estrutura química (grau de hidroxilação, glicosilação, acilação - conversão de fenol em ésteres e etc.) Alguns deles, entretanto, podem se ligar aos componentes da parede celular

(polissacarídios, lignina). Devido à natureza das ligações éster, esses compostos podem ser solubilizados em condições alcalinas ou são em contrapartida retidos na matriz da fibra.<sup>7</sup>

Os taninos são compostos de peso molecular médio a alto, significativamente hidroxilados e podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. Os taninos nas plantas são responsáveis pela adstringência dos alimentos, por causa da precipitação das proteínas salivares. O termo “tanino” vem da capacidade destes compostos em tratar peles de animais; para obtenção do couro, pela formação de complexos estáveis tanino-proteína com o colágeno da pele.<sup>7</sup>

Taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de alto peso molecular. A unidade monomérica é um flavan-3-ol (catequina, epicatequina, etc.), com um flavan-3,4-diol ou uma molécula de leucoantocianidina como seu precursor. Condensações oxidativas ocorrem entre o carbono C-4 do anel heterocíclico e carbonos C-6 ou C-8 das unidades adjacentes.<sup>33</sup>

A literatura sobre o conteúdo dos taninos condensados de diferentes plantas refere-se apenas as proantocianidinas oligoméricas (dímeros, trímeros, tetrâmeros), por causa da dificuldade em analisar moléculas de alta polimerização. Proantocianidinas, entretanto, podem ocorrer como polímeros com níveis de polimerização de 50 ou mais.<sup>34</sup>

Polimerização autooxidativa ou enzimática das unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol têm sido sugeridas como um processo que leva a formação dos taninos condensados. As ligações interflavonóides são ácido lábeis e produzem antocianidinas durante a hidrólise ácida em soluções alcoólicas. Esta reação é usada para determinação de moléculas de proantocianidinas.<sup>5</sup>

Proantocianidinas oligoméricas e taninos hidrolisáveis de baixo peso molecular são solúveis em diferentes solventes aquosos e orgânicos, como a acetona, metanol e água. Entretanto, taninos condensados de alto peso molecular são insolúveis. Além disso, quando os taninos formam complexos com proteína ou polissacarídios da parede celular, eles permanecem insolúveis.<sup>7</sup>

Esta insolubilidade dos taninos é responsável por erros significativos na quantificação do conteúdo dos polifenóis de plantas, porque os polifenóis geralmente são analisados em extratos, frequentemente omitindo a quantificação dos taninos insolúveis e que não são extraídos desta maneira.<sup>7</sup>

### 3.2 - Ocorrência dos polifenóis

Os membros da classe dos compostos polifenólicos podem ser encontrados em vários alimentos comumente consumidos na dieta, incluindo chocolates, maçãs, amêndoa, cevada, uvas, chá, milho, canela, cacau, amendoim, vinho, morangos, dentre outros.<sup>35</sup>

Os polifenóis são quase onipresentes em alimentos vegetais (hortaliças, cereais, leguminosas, frutas, nozes, etc.) e bebidas (vinho, sidra, cerveja, chá, cacau, etc.). Seus níveis variam grandemente mesmo entre cultivos da mesma espécie. Por exemplo, a formação dos glicosídeos flavona e flavonol depende muito da incidência da luz. Portanto, as maiores concentrações desses compostos são encontradas geralmente em folhas e em partes externas da planta, com apenas quantidades traços em partes subterrâneas da planta.<sup>35</sup>

A presença de polifenóis em alimentos vegetais é largamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais. Outros fatores, como germinação, nível de maturidade, variedade, processamento e armazenamento, também influenciam o conteúdo de compostos fenólicos em plantas.<sup>5,32,33,35,36</sup>

O melhor modo de como produzir chocolate ou componentes do cacau com altos conteúdos de polifenóis é pela conservação através: da escolha dos grãos de cacau ricos em polifenóis, utilizando grãos sub-fermentados e reduzindo o tempo e/ou temperatura de tratamento térmico. Por exemplo, a torrefação ou tratamento térmico do *liquor* de cacau. Entretanto, o conteúdo mais alto de polifenol é tipicamente associado com um sabor amargo e adstringente.<sup>11</sup>

Vários métodos são realizados para reduzir o amargor e a sensação de adstringência, como os aditivos de *flavour*, leite em pó em uma quantidade maior que 12% do peso para chocolates ao leite e algumas variações no processamento do chocolate.<sup>11</sup>

Dois *liquores* de chocolate com vários níveis de polifenóis de cacau foram obtidos e patenteados. Àqueles com conteúdos mais baixos em polifenol foram submetidos a altas temperaturas, ao passo que os de conteúdos mais altos em polifenol encontravam-se em temperaturas mais baixas, necessárias para conservar o maior conteúdo de polifenóis. Posteriormente, os dois *liquores* foram combinados por processamento em um produto final de chocolate.<sup>11</sup>

Polifenóis são parcialmente responsáveis pelas qualidades sensoriais e nutricionais dos alimentos vegetais. A adstringência e o amargor dos alimentos e bebidas dependem do conteúdo dos compostos polifenólicos. A oxidação dos polifenóis durante o processamento ou armazenamento resultará em características benéficas ou indesejáveis nos produtos alimentícios.<sup>37,38</sup>

Por exemplo, mudanças oxidativas, como o escurecimento do cacau durante o processamento ou a polimerização oxidativa dos polifenóis do chá durante a manufatura do chá preto, resultam no desenvolvimento de propriedades sensoriais distintas e desejáveis. Reciprocamente, a reação de escurecimento enzimático dos compostos fenólicos (catalisadas pela polifenol oxidase) e reações de escurecimento não enzimáticas são responsáveis pela formação de coloração e *flavour* indesejáveis em frutas e hortaliças.<sup>37,38</sup>

Há uma vasta literatura sobre a composição e o conteúdo dos polifenóis nos alimentos vegetais e bebidas. Devido à complexidade desse imenso grupo de metabólitos de plantas, entretanto, muitos polifenóis permanecem sem identificação.<sup>7</sup>

Além disso, é difícil comparar dados experimentais dentro da literatura, devido à falta de um consenso a respeito de um método apropriado para extrair e determinar os diferentes tipos ou famílias de compostos polifenólicos. Como

resultado, a informação na literatura sobre o conteúdo e a composição de polifenóis em alimentos vegetais não é apenas incompleta; mas, algumas vezes também contraditória e de difícil comparação.<sup>7</sup>

### **3.3 - Biodisponibilidade dos polifenóis**

É importante para um nutricionista conhecer não apenas a ingestão diária dos polifenóis da dieta de um indivíduo; mas também, a biodisponibilidade daqueles polifenóis ingeridos, já que seu significado nutricional e seus efeitos sistêmicos potenciais irão depender de seu comportamento no trato digestivo.<sup>7</sup>

A absorção e o metabolismo dos constituintes dos alimentos que contêm grupos fenólicos são determinados primariamente pela sua estrutura química, a qual depende de fatores como grau de glicosilação/acilação, sua estrutura básica (ex. benzênicos ou derivados da flavona), conjugação com outros grupamentos fenólicos, tamanho molecular, grau de polimerização e solubilidade. A enorme variabilidade desse grupo de substâncias, bem como sua ocorrência em materiais vegetais como uma mistura complexa de compostos fenólicos, criam grandes dificuldades no estudo de sua biodisponibilidade, sua fisiologia e efeitos nutricionais.<sup>7</sup>

As catequinas e procianidinas podem ser apenas encontradas como agliconas em plantas e em produtos alimentícios derivados de plantas e, desta maneira, o tamanho molecular e a solubilidade podem ser propriedades determinantes para a absorção.<sup>8</sup>

Propriedades biológicas dos polifenóis dependem de sua biodisponibilidade. Evidências indiretas de sua absorção através da barreira intestinal estão no aumento da capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos em polifenol.<sup>3</sup>

Alguns autores como Bravo *et al.*, 1994<sup>39</sup>, têm sugerido uma classificação dos polifenóis para propósitos nutricionais em polifenóis capazes de serem extraídos

- “Extractable polyphenols” (EPP) e em polifenóis que não formam extratos – “non-extractable polyphenols” (NEPP).

Os EPP são compostos fenólicos de baixa ou intermediária massa molecular, incluindo alguns taninos hidrolisáveis e proantocianidinas que podem ser extraídas; utilizando diferentes solventes como água, etanol, metanol e, em alguns casos, acetona aquosa.<sup>39</sup>

Os NEPP são compostos ou ligações fenólicas de alto peso molecular de fibras da dieta ou proteínas que permanecem insolúveis em solventes usuais. Resultados de testes *in vitro* com enzimas digestivas e de estudos em animais sugerem a indisponibilidade de alguns compostos polifenólicos, principalmente NEPP.<sup>39</sup>

A estrutura química dos polifenóis determina a velocidade e a extensão da absorção intestinal e, ainda, a natureza dos metabólitos circulantes no plasma. Alguns estudos de biodisponibilidade em humanos mostram que as quantidades de polifenóis encontrados intactos na urina variam de um composto fenólico para o outro.<sup>3</sup>

A maior parte dos polifenóis ingeridos (75-99%) não é encontrada na urina. Isso implica que, ou eles não foram absorvidos através da barreira intestinal, foram absorvidos e excretados na bile ou, então, metabolizados pela microflora colônica ou pelos próprios tecidos.<sup>3</sup>

Os polifenóis que não são absorvidos no estômago ou no intestino delgado, serão carregados para o cólon (Fig. 4). Outra possibilidade ocorre quando, os polifenóis são absorvidos, metabolizados no fígado, excretados na bile e, diretamente, pelos enterócitos voltam ao intestino delgado, alcançando também o cólon; mas em uma forma química diferente, como um glicuronídeo.<sup>3</sup>

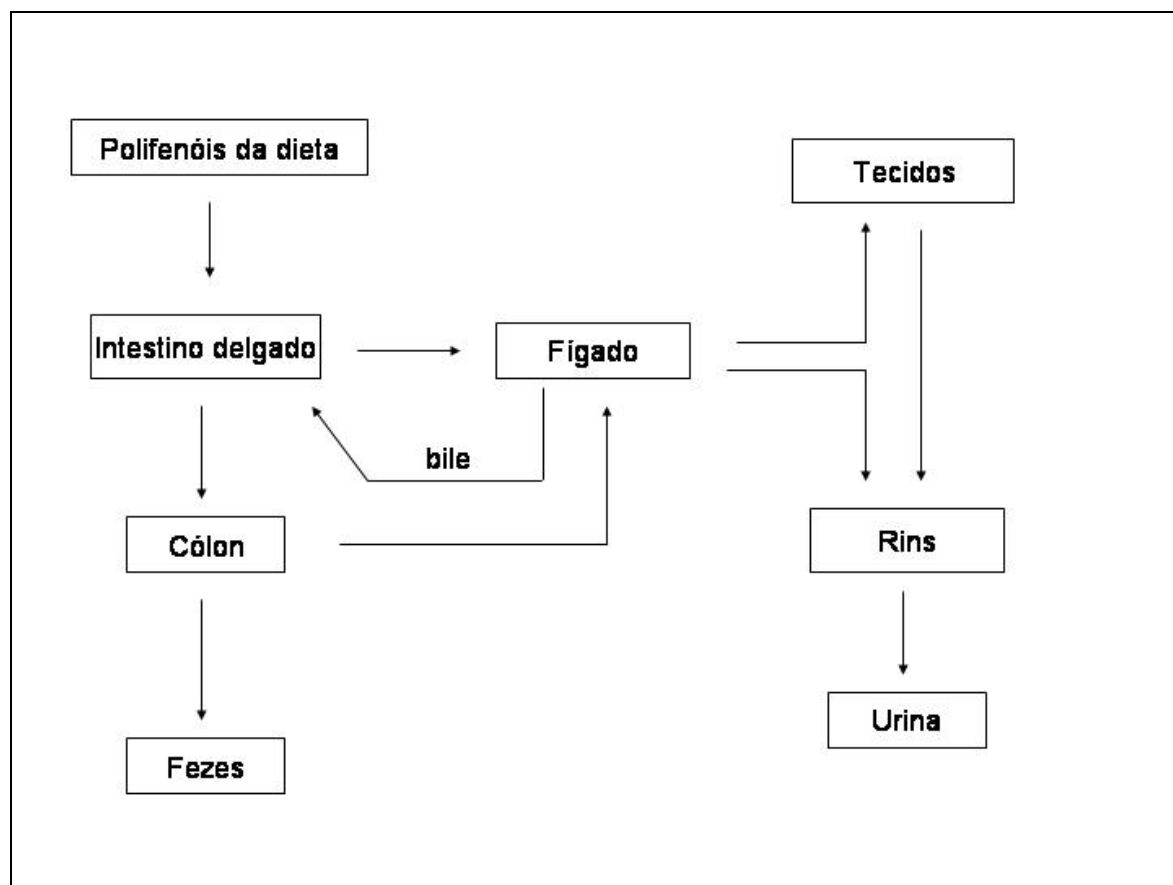


Figura 4 - Possíveis rotas dos polifenóis ingeridos por humanos.

No fígado, grupos hidroxil de moléculas intactas de compostos fenólicos são conjugados com o ácido glicurônico ou sulfato e uma metilação pode ocorrer. Os conjugados têm sido encontrados na urina, mas a excreção na bile de glicuronídeos e sulfatos parecem também ser de grande importância.<sup>8</sup>

O cólon contém cerca de  $10^{12}$  microrganismos/cm<sup>3</sup> e tem enorme potencial catalítico e hidrolítico<sup>3</sup>. Os microrganismos do cólon hidrolisam os conjugados e permitem a absorção das agliconas liberadas. Assim, os conjugados podem ser reabsorvidos e entram na circulação entero-hepática.<sup>8</sup>

Entretanto, esses microrganismos degradam também substancialmente o flavonóide invertido por clivagem do anel heterocíclico, produzindo diferentes ácidos fenólicos. No caso da catequina, diferentes  $\delta$ -fenilvalerolactonas têm sido encontradas, uma classe de metabólitos intermediários que não poderiam ser detectados como metabólitos de outros flavonóides.<sup>8</sup>



Os ácidos fenólicos são absorvidos e excretados na urina. Uma ampla faixa de espécies mamíferas tem mostrado variações consideráveis de substâncias neste metabolismo secundário. Embora haja evidências de que a absorção e metabolismo de polifenóis existem no intestino, pouco se sabe sobre a eficiência de cada captação e permanência dos compostos fenólicos ou seus conjugados e derivados no organismo.<sup>8</sup>

Recentemente, Richelle *et al.*, 1999<sup>40</sup>, estudou a cinética da epicatequina no plasma de homens após consumo de 40g e 80g de chocolate amargo. A epicatequina aumentou consideravelmente após o consumo de chocolate, alcançando o máximo entre 2 e 3 horas. A concentração máxima e a área abaixo da curva da cinética de permanência deste composto no plasma correlacionam-se muito bem com a dose do chocolate. Conclui-se que a epicatequina é absorvida do chocolate e é rapidamente eliminada do plasma. Os níveis plasmáticos obtidos foram de 0,7  $\mu\text{mol/L}$  (epicatequina livre e seus conjugados) de 80g de chocolate amargo, contendo 164 mg de epicatequina.

### **3.4 - Atividade antioxidante dos polifenóis em alimentos**

Tornou-se claro que existe uma relação entre os antioxidantes da dieta e as funções imunes. Foi sugerido que o chocolate contém grandes quantidades de polifenóis que possuem atividade antioxidante.<sup>41</sup>

As espécies de oxigênio reativas (ROS) desempenham uma importante função em muitos processos biológicos. Os ROS são produzidos durante reações de transferência de elétrons em células aeróbicas, especialmente pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.<sup>42</sup>

Os ROS incluem o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Os ROS estão envolvidos como mensageiros secundários em respostas fisiológicas, bem como em condições patológicas.<sup>43</sup>

A produção de ROS é bem controlada sob condições fisiológicas e os ROS exercem atividades microbicidas, sem acompanhar efeitos colaterais tóxicos. Os ROS danificam membranas celulares e moléculas biológicas, quando o ROS subjuga os sistemas endógenos antioxidantes. A maioria dos ROS são combatidos por sistemas defensivos como a superóxido desmutase (SOD), o sistema glutatona peroxidase/ glutatona, catalase e peroxidase. <sup>44</sup>

Entretanto, os ROS que são produzidos excessivamente ou os ROS que tenham escapado dos sistemas defensivos antioxidantes facilmente reagem com DNA, proteína e lipídio, levando ao desenvolvimento de muitas doenças, incluindo câncer, arteriosclerose e injúria da mucosa gástrica, bem como de processos de envelhecimento. <sup>42</sup>

Devido aos sistemas defensivos antioxidantes em humanos não serem completamente eficientes, é desejável a ingestão de antioxidantes exógenos para combater o excesso de ROS. Os antioxidantes da dieta como a vitamina C, vitamina E e os carotenóides reduzem o risco de desenvolvimento de certas doenças, porque eles combatem o excesso de ROS. <sup>44</sup>

A maioria dos antioxidantes da dieta são derivados da ingestão de vegetais, frutas, chá e vinho. Muitos flavonóides são conhecidos por serem antioxidantes e alguns deles, como a quercetina, catequina e morina têm mostrado inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) *in vitro* <sup>45</sup>. O cacau (*Theobroma cacao*), material do chocolate, contém vários polifenóis e a fração polifenol do chocolate inibe a oxidação do LDL. <sup>41</sup>

Muitos dos efeitos biológicos e dos benefícios dos polifenóis ocorrem hipoteticamente via proteção contra o dano oxidativo. Radicais livres são definidos como moléculas que possuem número de elétrons desemparelhados no último orbital.

A adição de um elétron livre ao  $O_2$  produz o radical superóxido  $O_2^-$ . A adição de um outro elétron e dois íons hidrogênios produz o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual combina-se com  $O_2^-$ , produzindo radicais hidroxila  $OH^\bullet$ . O radical hidroxila

rapidamente interage com macromoléculas do ambiente próximo e pode produzir enormes danos a proteínas, lipídios e DNA.<sup>46</sup>

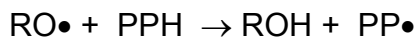
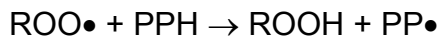
Ácidos graxos poliinsaturados são particularmente alvos oportunos dos radicais livres e reações em cadeia geram uma cascata de intermediários reativos. O oxigênio livre ( $^1\text{O}_2$ ) é também um reativo de alta energia e uma espécie de oxigênio de vida curta, formado em sistemas biológicos que podem reagir com biomoléculas. Várias fontes de oxidantes endógenos têm sido caracterizadas. A produção de moléculas de oxigênio parcialmente reduzidas durante a respiração aeróbica normal é inevitável.<sup>46</sup>

As células imunocompetentes liberam óxido nítrico (NO) e vários radicais de oxigênio durante a resposta imune crônica e perspicaz. Os peroxissomos envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e o citocromo P-450 microsomal da cadeia transportadora de elétrons são fontes adicionais de oxigênio reativo. Fontes exógenas incluem algumas drogas e toxinas ambientais, fumaça de cigarro, radiação ionizante, sol, choque térmico, e poluentes do ar como dióxido de nitrogênio e ozônio.<sup>46</sup>

Recentemente houve um Interesse crescente nos alimentos fenólicos devido às suas funções como antioxidantes, antimutagênico e destruidores dos radicais livres; além de sua implicação na prevenção de patologias como câncer e doença cardiovascular.<sup>7</sup>

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação entre um aumento no consumo de antioxidantes fenólicos e um risco reduzido de doença cardiovascular e certos tipos de câncer.<sup>7</sup>

Os antioxidantes fenólicos têm como função destruir radicais livres e quelantes de íons metálicos que são capazes de catalisar a peroxidação lipídica. Os antioxidantes fenólicos interferem com a oxidação de lipídios e outras moléculas por doação rápida de um átomo de hidrogênio para os radicais, como ilustrado nas seguintes reações:<sup>7</sup>



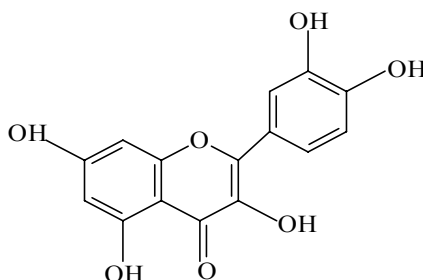
Desta maneira, os intermediários do radical fenóxi são relativamente estáveis; portanto, uma nova reação em cadeia não é facilmente iniciada. Os intermediários do radical fenóxi também agem como destruidores da rota de propagação pela reação com outros radicais livres.<sup>47</sup>



Entretanto, sob certas condições (altas concentrações de antioxidantes fenólicos, alto pH e presença de ferro), os antioxidantes fenólicos podem iniciar um processo de autooxidação e comportam-se como prooxidantes.<sup>47</sup>

A eficiência dos polifenóis como componentes antioxidantes depende imensamente da estrutura química. Os fenóis são inativos como antioxidante, mas difenóis orto- e para- possuem capacidade antioxidante, o qual aumenta com a substituição de átomos de hidrogênio por grupos etil ou n-butil.<sup>47</sup>

Os flavonóides estão entre os antioxidantes de planta mais potentes, porque eles tomam posse de um ou mais elementos estruturais seguintes envolvidos na atividade anti-radical (Fig. 5): (1) um grupo o-difenólico (de anel B), (2) uma dupla ligação conjugada 2-3 com a função 4-oxo e (3) grupos hidroxil em posições 3 e 5.<sup>48-50</sup>



*Figura 5 - Estrutura da quercetina, mostrando as características estruturais relacionadas à capacidade antioxidante.*

A quercetina é um flavonol que combina todas essas características, é um dos mais potentes antioxidantes naturais. Assim, a eficiência antioxidante dos flavonóides é diretamente correlacionada com seu grau de hidroxilação e diminui com a presença de açúcar invertido (glicosídeos não são antioxidantes, ao passo que suas agliconas correspondentes são antioxidantes).<sup>48</sup>

Os flavonóides são destruidores muito efetivos de radicais hidroxil e peroxil, embora sua eficiência como destruidor de ânion superóxido ainda não seja clara<sup>50</sup>. Os polifenóis são quelantes de metais e inibem as reações de Fenton e Haber-Weiss, os quais são importantes fontes de radicais oxigênio ativo<sup>51</sup>. Além disso, os flavonóides conservam sua capacidade de destruir radicais livres após formarem complexos com íons metálicos.<sup>52</sup>

Embora, tradicionalmente, a atividade antioxidante tenha sido atribuída apenas a compostos fenólicos solúveis (extrato de polifenóis), um estudo recente sugere que polifenóis não extraídos (procianidinas poliméricas e taninos hidrolisáveis de alto peso molecular) são de 15 a 30 vezes mais efetivos para quelar radicais peroxil que os fenóis simples.<sup>53</sup>

Como esses compostos não são absorvidos, eles poderiam exercer sua atividade antioxidante dentro do trato digestivo e proteger lipídios, proteínas e carboidratos contra o dano oxidativo durante a digestão e tornar disponível os antioxidantes solúveis.<sup>7</sup>

A maioria dos estudos tem mostrado que a atividade antioxidante dos polifenóis emprega diferentes modelos *in vitro*<sup>48,52,53,54,55</sup> e, subsequentemente, os compostos fenólicos são classificados de acordo com sua capacidade antioxidante ou eficiência anti-radical<sup>49,56,57</sup>. A função dos polifenóis *in vivo* ainda não está esclarecida.<sup>7</sup>

A eficiência antioxidante dos polifenóis depende da extensão da absorção e metabolismo desses compostos, bem como a atividade das formas metoxiladas e conjugadas, circulantes no plasma.<sup>7</sup>

Apenas quantidades parciais de polifenóis em alimentos são absorvidas *in vivo*, e apenas níveis muito baixos de catequinas foram detectadas no plasma após ingestão de chá <sup>58,59</sup>. Todavia, essas baixas concentrações parecem suficientes para exercer uma potente ação antioxidante *in vivo*, como observada em estudos humanos e como sugerido por registros epidemiológicos. <sup>60</sup>

Os polifenóis antioxidantes, principalmente os flavonóides, são potentes inibidores da oxidação do LDL <sup>51,54,55,61</sup>. Vários mecanismos pelo qual os flavonóides exercem esse efeito protetor têm sido propostos: (1) redução da formação de radical livre, (2) proteção ao  $\alpha$ -tocoferol do LDL contra oxidação, (3) regeneração do  $\alpha$ -tocoferol oxidado e (4) quelação de íons metálicos. <sup>7</sup>

Através dessas ações antioxidantes, os polifenóis exercem seu efeito protetor contra doenças cardiovasculares. Além disso, os flavonóides possuem efeitos anti-trombóticos e vasoprotetores; bem como efeitos hipolipidêmicos. <sup>7</sup>

Diferentes tipos de polifenóis (ácidos fenólicos, taninos hidrolizáveis e flavonóides) também têm mostrado efeitos anticarcinogênicos <sup>62-64</sup>. Os polifenóis devem interferir em várias etapas que levam ao desenvolvimento de tumores malignos, portanto protegendo o DNA contra dano oxidativo, inativando carcinógenos, inibindo a expressão de genes mutantes, a atividade de enzimas envolvidas na ativação de pró-carcinógenos e ativação de sistemas enzimáticos envolvidos na detoxificação de xenobióticos. <sup>65</sup>

## 4 - Metodologia disponível para análise, isolamento, purificação e identificação

A metodologia aplicada ao estudo dos flavonóides depende, em uma certa extensão, ao propósito da investigação; podendo ser: (1) para examinar a presença de flavonóides em um certo vegetal; (2) isolar flavonóides de uma planta que contém esse tipo de substância; (3) determinar a concentração de um certo flavonóide em um vegetal em particular; ou (4) identificar um flavonóide isolado e purificado.<sup>66</sup>

Geralmente, trabalha-se seguindo os seguintes passos:

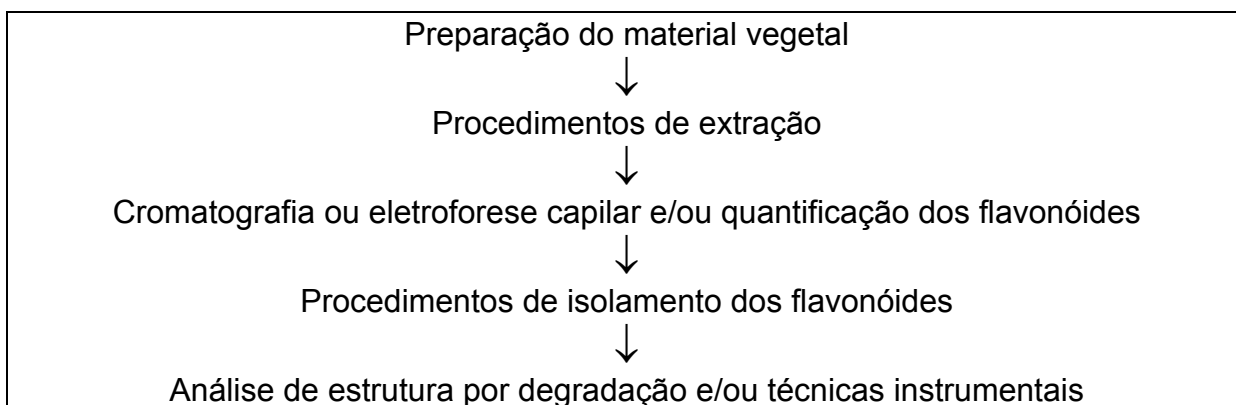


Figura 6 - Perfil do procedimento geral de trabalho para análise, quantificação, isolamento e elucidação da estrutura dos polifenóis em alimentos.<sup>12, 66, 67, 68, 69</sup>

Como alguns flavonóides são instáveis, como no caso dos polifenóis antocianinas e procianidina, é necessário cuidado durante o armazenamento e o preparo da amostra. Se o objetivo é a análise e a subsequente quantificação, o congelamento e, mais freqüentemente, o congelamento em nitrogênio líquido, é aconselhado.<sup>66</sup>

Como muitos polifenóis ocorrem na forma de ligações com glicosídeos ou ésteres, a preparação da amostra deve incluir hidrólise alcalina ou ácida para liberar ligações fenólicas, antes ou após a etapa de extração com solventes.<sup>66, 67, 69</sup>

Os carboidratos e os polissacarídeos são constituintes comuns em alimentos e bebidas. Estas substâncias são sempre removidas por extração em água ou com soluções de tampões ácidos ou básicos. O chocolate, o qual possui um alto conteúdo de lipídio, necessita de extração prévia com hexano ou cloreto de metileno para remover gordura; então, um solvente aquoso ou um solvente polar, como o metanol, deve ser usado para extrair o carboidrato ou o polissacarídeo.<sup>70</sup>

O isolamento e a purificação dos flavonóides individuais é sempre requerido, porque as estruturas são desconhecidas ou, como no caso do padrão de procianidinas do cacau, não estão comercialmente disponíveis. O material puro pode ser também necessário para atividades de mensuramento, por exemplo, atividade antioxidante ou anticarcinogênica, ou para estudos de biodisponibilidade em animais, humanos ou em cultura de células.<sup>12</sup>

#### **4.1 - Isolamento de polifenóis em coluna de sílica modificada com C18.**

A extração em fase sólida é uma técnica utilizada nos processos de pré-concentração e separação de espécies químicas inorgânicas e orgânicas presentes em solução aquosa, utilizando um material sólido extrator. Também pode ser utilizada para a extração de vapores orgânicos ou outras substâncias de amostras gasosas.<sup>71</sup>

Os primeiros materiais a serem utilizados como extratores sólidos, como o carvão ativado e resinas trocadoras iônicas, eram pouco seletivos. Entre os materiais mais utilizados como fase sólida destacam-se: resinas poliméricas trocadoras de íons ou não, celulose, sílica-gel, espumas de poliuretano, alumina, naftaleno, etc.<sup>71</sup>



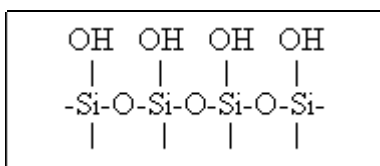
Sílicas modificadas têm sido sintetizadas e estudadas e suas propriedades são resultado da presença de grupo funcional covalente ligado ao substrato da sílica, e são produzidas pela reação de organosilanos com sílica ativada. O produto é um sorvente com o grupo funcional do organosilano. Sílicas modificadas são estáveis em um intervalo de pH de aproximadamente 2,0 a 7,5 e acima de 7,5 o substrato de sílica é suscetível à dissolução em soluções aquosas. Abaixo de pH 2,0 a ligação éter é lábil, e o grupo funcional começará a se romper, perdendo as suas propriedades sortivas. Apesar disso, na prática, sílica modificada pode ser usada para extração no intervalo de pH de 1,0 a 14,0, já que a degradação do sorvente é um processo lento e este é tipicamente exposto à solventes somente por períodos de tempo curtos. A sílica modificada é quimicamente estável em todos os solventes orgânicos, são materiais rígidos, de partículas de 15 a 100 microns, não encolhem ou incham sob a ação de diferentes solventes, permitem rápido fluxo de solvente sob condições mínimas de pressão (10 a 15 psi). A solvatação do sorvente é sempre necessária sendo o metanol um bom agente solvatador, porque ele pode interagir tanto com os grupos silanóis sobre a sílica, quanto com os átomos de carbono do grupo funcional ligado. Em adição ao metanol, outros solventes como acetonitrila e isopropanol podem ser usados para solvatação. A capacidade de retenção do sorvente é definida como a massa total de analito retido por massa de sorvente e, geralmente está em torno de 1 à 5%.<sup>72</sup>

Pelo pré-condicionamento do cartucho C18, seqüencialmente com solventes ácidos ou neutros, fracionam-se os grupamentos fenólicos em grupos ácidos e neutros; bem como pode ser encontrada a separação dos grupos fenólicos, pela modificação por eluição seqüenciada, utilizando-se diferentes eluentes.<sup>66, 67</sup>

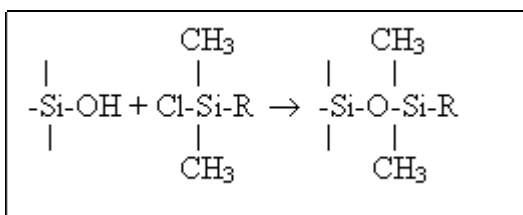
A Waters introduziu o cartucho Sep-pak para enriquecimento de traços de solutos por fase reversa C18 em 1978. Tipicamente, o sorvente consiste de sílica gel 40-60  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula de sílica na qual a fase líquida é quimicamente ligada. A sílica gel não pode ser usada diretamente com misturas de solventes aquosos, porque a água desativa a sílica em um grau de extensão em que ela passa a apresentar apenas interações fracas com a maioria das substâncias, durante o processo de isolamento. Tão fraco que não há essencialmente retenção,

dessa maneira, é necessário que a superfície da sílica apresente natureza hidrofóbica; para tornar-se funcional com solventes aquosos.<sup>70</sup>

A superfície de sílica completamente hidrolisada (por aquecimento com HCl 0,1 M por um dia ou dois) é constituída de grupos silanóis quimicamente reativos<sup>73</sup>, isto é, superfícies típicas de sílica contendo 8  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  de grupos OH.



Os recobrimentos mais usados de fase ligada são siloxanos formados por reação da superfície hidrolisada com um organoclorossilano. Por exemplo, onde R é um grupamento alquil ou um alquil-substituído. Em muitos casos, o alquil é tanto uma cadeia  $\text{C}_8$  (n-octil) ou uma cadeia  $\text{C}_{18}$  (n-decaoctil).<sup>104</sup>



A fase estacionária organossilano tem sido denominada como fase em escova. Ela consiste na reação de uma superfície de sílica com o dimetiloctilsilano-clorosilano a elevadas temperaturas, o qual causa a ligação do grupo dimetiloctilsilano na superfície (Fig. 7). Como resultado, o produto é uma superfície coberta com cadeias de dimetiloctilsilano, como cerdas de uma escova. Assim, o termo fase em escova, às vezes, é usado. A derivatização é monofuncional em que apenas uma ligação Si-O-Si existe entre a partícula de sílica e a fase ligada alquil.<sup>70</sup>

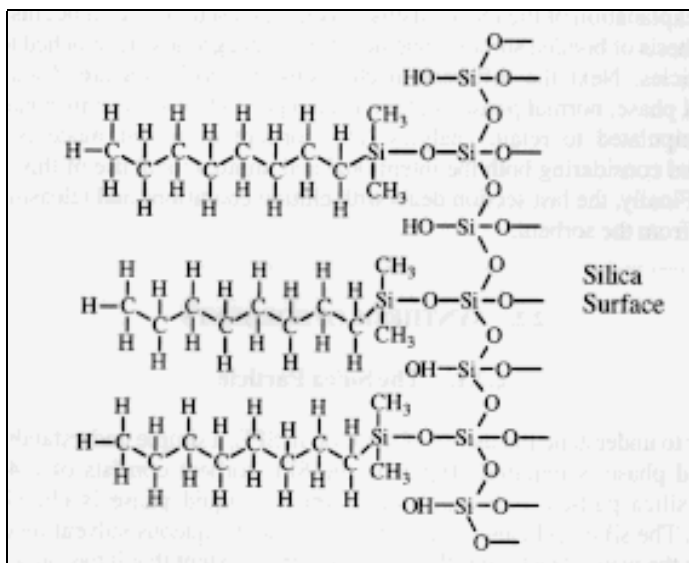


Figura 7 - Superfície em escova da fase ligada alquil na sílica gel.

Uma área de superfície específica de sílica deve variar de  $\sim 100$  à  $850 \text{ m}^2/\text{g}$ , com uma margem típica para SPE de  $200$  à  $600 \text{ m}^2/\text{g}$ . Geralmente, as partículas são irregulares em tamanho com um diâmetro de partícula aproximado de  $40 \text{ }\mu\text{m}$ , um tamanho de poro aproximado de  $60 \text{ \AA}$  e uma área de superfície média de aproximadamente  $500 \text{ m}^2/\text{g}$ <sup>74</sup>. O diâmetro do poro afeta a fase ligada pelo controle da densidade da cobertura da fase ligada alquil e a migração dos analitos dentro e fora dos poros durante a sorção<sup>70</sup>. Geralmente, os poros com largura menores que  $2 \text{ \AA}$  são considerados microporos. Poros de  $2$  a  $50 \text{ \AA}$  são chamados de mesoporos e estes são os poros onde a maior parte das retenções ocorre<sup>75</sup>. Poros com diâmetros maiores que  $50 \text{ \AA}$  são classificados como macroporos e são importantes na cromatografia de exclusão por tamanho. Tipicamente, um tamanho de poro de  $50 \text{ \AA}$  mostrará alguma exclusão de moléculas com pesos moleculares maiores que  $2000$ <sup>76</sup>. Assim, se o isolamento de moléculas maiores é necessário, sorventes especiais devem ser obtidos com tamanhos de poros maiores que  $300 \text{ \AA}$ .<sup>70</sup>

Um grande número de partículas sólidas tem sido utilizado para SPE de compostos orgânicos de amostras predominantemente aquosas. As partículas de sílica de fase ligada, especialmente sílica ODS (sílica octildecil silano), são frequentemente o tipo mais comum. Entretanto, umas amplas variedades de poros para resinas poliméricas têm sido usadas.<sup>77</sup>

SPE em fase reversa: O mecanismo envolve a partição de solutos orgânicos de uma fase móvel polar, como a água, em uma fase apolar, como o sorvente C-18. O mecanismo de isolamento é uma interação apolar, chamada Van der Waals, forças dispersivas ou partição (partitioning). A eluição de analitos por sorventes de fase reversa é um processo bem simples e consiste na escolha de um solvente polar para romper as forças de Van der Waals que retêm o analito. A partição envolve a interação do soluto dentro das cadeias da fase estacionária, o qual pode ser um hidrocarboneto C-18 ou C-8, ou ainda, um sorvente polimérico (como o estireno-divinilbenzeno). O mecanismo de partição é um processo de baixa energia (5 vs. 80 Kcal/mol para troca iônica) e é análogo a uma molécula sendo removida pela água em uma extração líquido-líquido. A diferença está na fase orgânica ligada quimicamente à sílica. O mecanismo é chamado de fase reversa porque ela é oposta ao estudo original (cromatografia em fase normal), onde a fase estacionária era polar e a fase móvel era apolar<sup>70</sup>. Na fase reversa, a função é isolar analitos relativamente apolares de amostras polares como a água. Esse tipo de aplicação requer o uso de adsorventes com partículas relativamente hidrofóbicas, como a sílica com grupos octildecilsilanos ligados ou um polímero orgânico com anéis benzenos. As substâncias extraídas são eluídas por um volume pequeno de solvente orgânico.<sup>77</sup>

Para esse propósito, o extrato é dissolvido em água (ou no solvente orgânico removido por evaporação rotatória) e passado através da coluna. Os carboidratos não são adsorvidos e são totalmente lavados (eluídos) da coluna com água adicional.<sup>66</sup>

Os componentes menos polares retidos, incluindo os flavonóides, são então eluídos da coluna com álcool aquoso ou puro. Se desejado, algumas separações podem ser obtidas, neste estágio, pelo aumento das etapas do conteúdo de metanol.<sup>66</sup>

Para polifenóis do cacau, 70-80% de metanol aquoso ou 70% de acetona aquosa ou combinações entre eles são os solventes ou sistemas de solvente mais comumente utilizados para extração. Água e etanol têm sido usados também,

entretanto, procianidinas oligoméricas são extraídas apenas parcialmente e polímeros de alto peso molecular não são extraídos totalmente.<sup>67</sup>

No processo de isolamento de polifenóis para uma futura caracterização torna-se necessário remover potenciais interferentes como a teobromina e cafeína, no caso do cacau. A remoção de interferentes poderá ser obtida por meio de um fracionamento líquido-líquido com um solvente não-miscível e uma coluna cromatográfica Sephadex LH-20, poliamida, Amberlite XAD-2 e utilizando-se cartuchos comercialmente disponíveis<sup>66</sup>. A remoção de teobromina e cafeína podem usualmente ser acompanhada pela extração com clorofórmio ou diclorometano, já que a maioria dos flavonóides tem uma solubilidade muito limitada nesses solventes.<sup>67</sup>

A coluna conhecida como Sephadex LH-20 foi utilizada com sucesso para purificação de flavonóides e para procedimentos preparativos de HPLC. Neste caso, uma coluna C18 em escala preparativa também pode ser aplicada.<sup>66, 67</sup>

A faixa larga de sílica baseada em fases estacionárias polar e apolar, em pequenos cartuchos, é comercialmente disponível e a extração em fase sólida feita com coluna C18 é a mais usada para isolamento de substâncias fenólicas, reproduzindo o uso da Sephadex para etapas de purificação.<sup>66, 67</sup>

## **4.2 - Isolamento de polifenóis em espumas de poliuretano**

Tem se observado nas duas últimas décadas um uso cada vez mais freqüente das espumas de poliuretano (EPU), como meio de separação entre espécies, devido principalmente ao seu baixo custo e facilidade de obtenção<sup>78</sup>. Além disto, a estrutura celular das EPU, constituída por membranas abertas de geometria quase esférica que permitem grande velocidade de difusão das espécies químicas, promove rapidez na retenção e na transferência de massa<sup>79</sup>. Suas propriedades físico-químicas (alta porosidade, flexibilidade e facilidade para acondicionar espécies orgânicas e inorgânicas) permitem uma maior variação nas modificações químicas e versatilidade nas aplicações analíticas. As diversas formas

de utilização das EPU (trituradas, em cubos, discos, etc.) se constituem em vantagem ao se comparar com outros sólidos porosos granulares <sup>78</sup>. Há cerca de 400 anos, uma esponja natural impregnada com óleo de oliva foi utilizada como suporte sólido para purificação de vapores de etanol <sup>80</sup>. Em 1962, Bayer <sup>81</sup> usou esta técnica para purificar alcoóis.

Uma das primeiras aplicações de EPU como suporte sólido foi publicada em 1965, por Bauman e colaboradores <sup>82</sup>. Os autores imobilizaram fisicamente uma enzima contida em gel de amido em poliuretano reticulado para monitorar poluentes inibidores enzimáticos, em água e ar. Em 1967, os estudos realizados por Van Venrooy <sup>83</sup> sobre a utilização de EPU como material suporte para cromatografia gasosa, deram origem a uma patente americana.

Em 1970, Bowen <sup>84</sup> utilizou pela primeira vez espumas de poliuretano para a sorção e recuperação de compostos orgânicos e inorgânicos de solução aquosa por processo em batelada. Seu trabalho apontou para a potencialidade e versatilidade das aplicações das espumas de poliuretano na química de separação, impulsionando a partir de então, a investigação e publicação de inúmeros trabalhos.

A utilização vantajosa de espumas de poliuretano como material suporte na cromatografia de extração foi vislumbrada por Braun e Farag. Suas primeiras investigações publicadas em 1972 <sup>85, 86</sup>, utilizavam o polímero carregado com fosfato de tributílica (TBP); para sorver vários complexos metálicos de soluções aquosas. A imobilização de reagentes orgânicos na espuma é baseada, principalmente, em seu caráter hidrofóbico. <sup>80</sup>

Braun, Navratil e Farag, 1984 <sup>87</sup> reuniram a literatura do período entre 1970 e 1985, em um livro sob forma de revisão, direcionado às diversas aplicações das espumas de poliuretano carregadas e não carregadas (do tipo poliéter ou poliéster). As EPU mostraram ser versáteis e adequadas para a separação, pré-concentração e recuperação de um amplo espectro de compostos inorgânicos e orgânicos de meio aquoso e gasoso. Suas propriedades físico-químicas e a natureza de sua membrana permitem rápidas cinéticas de sorção com taxas de fluxos elevadas em operações em colunas. Esta característica pode ser utilizada para pré-concentrar componentes

traços e/ou separar interferentes em sistemas em linha, melhorando a sensibilidade e diminuindo o limite de detecção de métodos analíticos instrumentais. É vantajoso e adequado também para a extração e determinação simultânea de elementos-traço em águas naturais <sup>88</sup>.

Assim, as espumas de poliuretano utilizadas em diferentes sistemas de separação de espécies químicas são constituídas de células com membranas abertas, apresentando alta porosidade e flexibilidade. Estas podem ser usadas sob a forma de discos, cubos, colunas com peças inteiras e trituradas, em processos em batelada ou coluna. Sua estrutura celular constituída por membranas abertas de geometria quase esférica possibilita grande velocidade de difusão de espécies químicas promovendo rapidez de sorção e transferência de massa, o que constitui uma vantagem única comparativamente à utilização de sólidos porosos granulares. Essa característica permite ainda, a sua utilização em procedimentos de separação em coluna com elevadas taxas de fluxo, sem prejuízo significativo da eficiência de separação. <sup>80</sup>

#### **4.2.1 - Definição, estrutura e síntese da espuma de poliuretano**

As espumas de poliuretano (EPU) podem ser definidas como uma classe de polímeros, onde a dispersão de um gás durante o processo de polimerização dá origem à formação de pequenos bulbos ou células interligadas em uma estrutura tridimensional. <sup>80</sup>

O desenvolvimento comercial dos poliuretanos começou na Alemanha no final da década de 1930, inicialmente com a fabricação de espumas rígidas, adesivos e tintas e têm sido utilizados há cerca de 60 anos em aplicações das mais diversificadas. Os poliuretanos são produzidos basicamente pela reação de poliadição de um isocianato (di ou polifuncional) com um polioliol e outros reagentes como: catalisadores, surfactantes, extensores de cadeia, etc. Sua estrutura pode ser celular (espumas flexíveis, semi-rígidas e rígidas, e elastômeros microcelulares) ou sólida (elastômeros, revestimentos, selantes, adesivos, etc.). <sup>80</sup>

A potencialidade de aplicação de EPU's como material para absorção e separação de espécies orgânicas e inorgânicas presentes em soluções aquosas foi pioneiramente observada por Bowen <sup>84</sup>, em 1970, ao investigar as propriedades químicas de algumas EPU comerciais, à base de tolueno diisocianato (DTI – o isocianato mais usado comercialmente) e óxido de propileno, com diferentes densidades.

Na área de espumas flexíveis os PU's se popularizaram nos segmentos de colchões, estofados e assentos automotivos; os semi-rígidos na indústria automotiva na forma de descanso-braços, painéis, pára-choques, etc; os microcelulares em calçados e os rígidos no isolamento térmico de geladeiras, "freezers" e caminhões frigoríficos, etc. <sup>80</sup>

A utilização de espumas de poliuretano como material adequado para a sorção de espécies químicas foi pioneiramente introduzida no Brasil à época do acidente radioativo com césio-137 em Goiânia (1987), visando a descontaminação de superfícies por pesquisadores do Instituto de Engenharia Nuclear (CNEN). Pesquisadores deste instituto, prosseguindo com os estudos com EPU, motivaram e divulgaram a utilização das EPU's por outros grupos de pesquisa na área de química analítica, tendo sido desenvolvido vários interessantes trabalhos e teses com aplicações das EPU's na química de separação <sup>89</sup>. Carvalho, 1992 <sup>90</sup> optou inicialmente em sua tese de doutorado, por utilizar espumas de poliuretano flexíveis do tipo poliéter, de fabricação nacional, usada em colchões; adotando como critério para seleção, entre espumas de diferentes especificações, a que apresentasse maior capacidade de sorção para o sistema ferro (similar ao gálio) em meio cloreto. Posteriormente, em um outro trabalho realizado por Jesus, 1999 <sup>91</sup> observou-se que algumas espumas de poliuretano utilizadas na lavagem doméstica de louças apresentavam o mesmo desempenho de sorção que a espuma para colchão anteriormente utilizada.

As EPU podem ser definidas também como materiais plásticos em que uma parte do sólido é substituído por gás, que dá origem ao que se chama de células. A fase gasosa pode ser contínua, gerando um material com células abertas, ou pode ser uma fase descontínua, gerando células fechadas, ditas não-comunicantes. Sob o



ponto de vista geométrico, se o gás ocupa uma fração menor do que 76% do volume total, células esféricas tendem a serem geradas. Por outro lado, se o gás ocupar uma proporção maior do que 76%, haverá uma tendência das células à distorção, originando poliedros, principalmente com a forma de dodecaedros pentagonais.<sup>92</sup>

Espumas de baixa densidade são dispersões de grandes volumes de gás em pequenos volumes de sólido, tendo por exemplo, uma densidade menor do que 0,1 g/cm<sup>3</sup>. Espumas médias são classificadas por terem densidade variando de 0,1 a 0,4 g/cm<sup>3</sup>. Espumas com densidade maior são ditas de alta densidade.<sup>79</sup>

A presença ou ausência de janelas na célula ou o número de janelas por célula é uma função da maneira como o material plástico é produzido<sup>79</sup>. As espumas de poliuretano podem ser preparadas nas formas rígidas ou flexível, sendo sintetizadas através da reação entre grupos hidroxílicos terminais de uma resina do tipo poliéster ou poliéter com um grupamento isocianato, ou ainda pela reação entre grupos isocianato e água.<sup>92</sup>

São duas as reações principais determinantes na formação das EPU (Fig. 8): (1) reação entre um isocianato (geralmente tolueno di-isocianato – TDI) com um composto hidroxilado (poliol, geralmente, poliéter ou poliéster). Essa reação é responsável pela formação do grupamento poliuretano; (2) reação entre o isocianato e a água, gerando ácido carbâmico, que se decompõe em amina e dióxido de carbono (agente formador das células da espuma).<sup>78</sup>

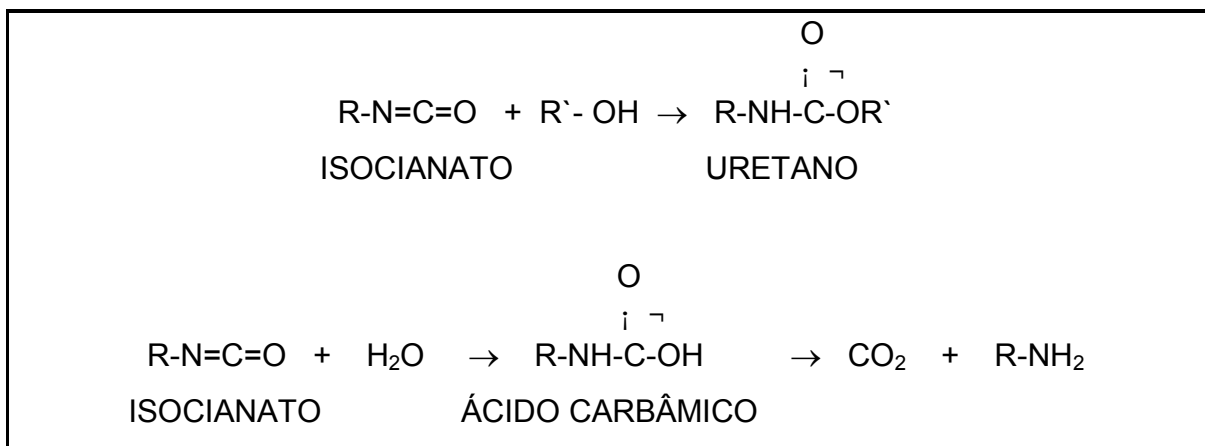
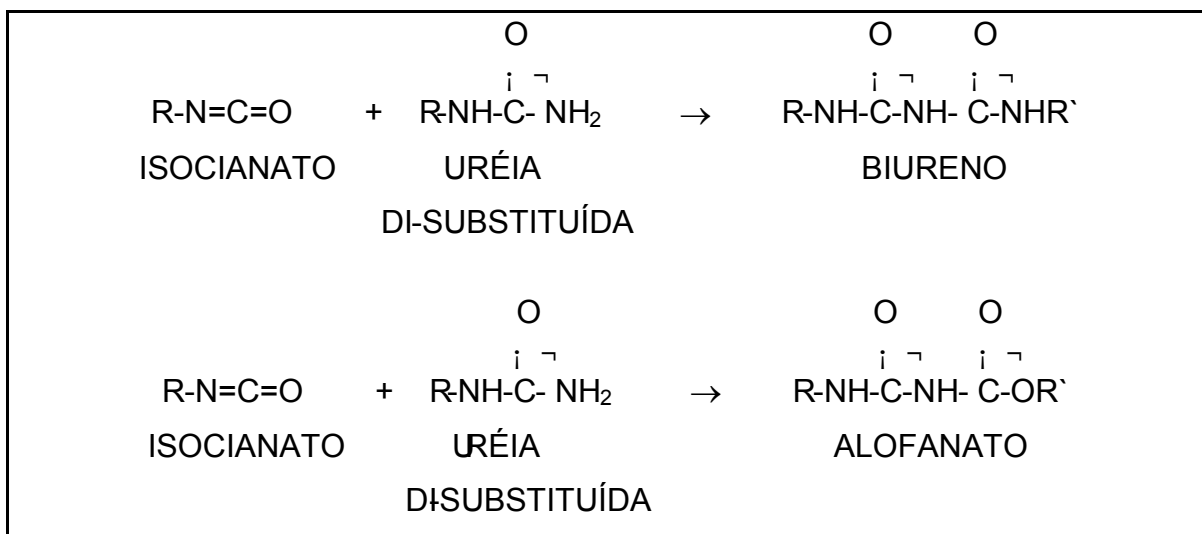


Figura 8 - Reações comumente empregadas na preparação da EPU.

Como sub-produtos das reações secundárias entre aminas e isocianato, dos produtos desta reação com o próprio isocianato (presente em excesso no processo de fabricação da EPU), e ainda da reação do isocianato e uretano surgem, em maior ou menor concentração, uréia dissubstituída, biureto e alofanato. Desses sub-produtos, o alofanato e o biureto (Fig. 9) constituem-se nos principais responsáveis pelas ramificações e ligações cruzadas das EPU. <sup>78</sup>



*Figura 9 - Reações paralelas que ocorrem durante a preparação das EPU: formação das ligações cruzadas e das ramificações.*

As características físicas das espumas de poliuretano dependem fundamentalmente da maneira como são preparadas. O rompimento ou não da célula ao final do processo de expansão da espuma é um fator determinante para a obtenção de espumas rígidas ou flexíveis. Espumas flexíveis são obtidas quando o material apresenta células abertas, e espumas rígidas são resultado de um material contendo células fechadas. Outros fatores que influenciam a rigidez da espuma são o grau de cruzamentos e o tipo de poliols utilizados durante o seu preparo. Espumas contendo baixa densidade de cruzamentos e preparadas com polióis de alto peso molecular dão origem a materiais flexíveis, enquanto que espumas com alta densidade de cruzamentos e sintetizadas a partir de polióis de baixo peso molecular geram materiais com alta rigidez. <sup>93</sup>

Os compostos hidroxilados utilizados na fabricação das EPU são os polióis. Geralmente, são poliéteres ou poliésteres e têm peso molecular médio entre 400 a

6000. Na indústria, as espumas flexíveis convencionais em geral são produzidas em bloco por processos a quente utilizando poliálcool poliéter. Os poliálcoois poliéteres mais usados comercialmente são trifuncionais, obtidos da reação do glicerol e óxido de propileno, possuindo mais de 90% de grupamentos hidroxilas secundários e peso molecular médio entre 3000 e 4000. São também muito utilizados poliálcoois poliéteres a base de óxido de propileno (PO) e óxido de etileno (EO). O teor de EO presente nos poliálcoois poliéteres varia entre 5% e 15% e o aumento do teor de EO resulta em maior hidrofiliabilidade do poliálcool, devido a sua maior solubilidade em água. É usado para diminuir a concentração de micelas de água na massa reagente e minimizar a formação de esferas de poliuretina que enrijecem a espuma.<sup>80</sup>

As espumas de poliuretano possuem boa resistência térmica, sendo degradadas a temperaturas que variam de 180 a 220°C, dependendo de sua estrutura. Em termos de solubilidade, a literatura relata que elas podem ser completamente solubilizadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, HNO<sub>3</sub> concentrado e soluções de KMnO<sub>4</sub> em meio alcalino. Sua estrutura permanece inalterada em H<sub>2</sub>O, em HCl com concentrações menores do que 6 mol/L, em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com concentrações menores do que 2 mol/L, em NH<sub>4</sub>OH com concentrações menores do que 2 mol/L e em NaOH com concentrações menores do que 2 mol/L. Da mesma forma, as espumas não se mostram solúveis nos solventes orgânicos mais comumente utilizados em laboratório tais como benzeno, tetracloreto de carbono, clorofórmio, acetona, metil-isobutil cetona, acetato de etila e quaisquer álcoois.<sup>79</sup>

Examinando a resistência química das EPU's conclui-se que elas são muito estáveis. Exceto por variações no grau de inchaço, permanecem inalteradas quando em contato com água, ácido clorídrico até 6 mol/L, ácido sulfúrico até 2 mol/L, ácido acético glacial, soluções de amônia e de hidróxido de sódio 2 mol/L. Não sofrem alteração em presença de vários solventes orgânicos como éteres, benzeno, tetracloreto de carbono, clorofórmio, acetona, metil-isobutil cetona, acetato de etila, acetato de isopentila e álcoois. Mostraram-se solúveis, entretanto, em cloreto de arsênio à quente, m-cresol, dimetilsulfóxido e dimetilacetamida. São oxidadas pelo permanganato de potássio em meio alcalino, degradadas por ácido sulfúrico e nítrico concentrado e também quando aquecidas entre 180 e 220°C. Observou-se que existiam duas classes de substâncias que eram fortemente

adsorvidas pelas EPU tipo poliéter: substâncias presentes como moléculas livres altamente polarizadas em soluções aquosas tais como iodo, compostos aromáticos e ditizonatos metálicos ou ânions univalentes como  $\text{FeCl}_4^-$ ,  $\text{TlCl}_4^-$ ,  $\text{AuCl}_4^-$ , etc...<sup>80</sup>

*Tabela 4 - Coeficientes de distribuição e capacidade de absorção do fenol em espuma de poliuretano.*<sup>84</sup>

Substância	Meio	D (L/Kg)	Capacidade de Absorção (mol/Kg)	Espécie
Fenol	água	45-410	$\geq 0,032$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$

### 4.3 - Isolamento de polifenóis por meio de resina polimérica

A resina Amberlite XAD-16 é um estireno/divinilbenzeno, baseado em um material que é não-iônico, hidrofóbico, sendo um polímero interconectado com a superfície de natureza aromática. As propriedades adsorptivas são originadas de sua estrutura macroporosa (macroporos), o qual contém tanto uma fase polimérica contínua como uma fase porosa contínua. O tamanho do poro compreende de 2 a 300 Å e a área de superfície é de 800 m<sup>2</sup>/g. A distribuição do tamanho do poro mostra sua aplicação para adsorção de compostos orgânicos de baixo a médio peso molecular. Os polifenóis são adsorvidos pela resina XAD-16 pelas forças de Van der Waals entre dois anéis aromáticos.<sup>94</sup>

A história da extração em fase sólida data em torno do ano de 1970, quando colunas empacotadas com partículas de resina XAD da Rohm and Haas foram utilizadas para concentrar quantidades muito pequenas de poluentes orgânicos de amostras de água.<sup>95</sup>

Os adsorventes constituídos por sílica não são muito estáveis acima de pH 8 ou em soluções altamente ácidas; o que torna vantajoso o uso de resinas poliméricas, pois são bem mais estáveis, em meios tanto básicos como ácidos.

As resinas poliméricas devem ter ligações cruzadas suficientemente para assegurar que elas não serão dissolvidas, nem alteradas em solventes orgânicos. As resinas não devem ser submetidas a mudanças grandes de volume devido à

inchação e ao encolhimento, quando em contato com líquidos de diferentes naturezas.<sup>77</sup>

O uso do poliestireno de ligação cruzada está aumentando quando se compara com o uso de sílica quimicamente ligada, usualmente, com grupos orgânicos C18 e C8. As resinas poliméricas são mais definidas e com pH estável, possuem área de superfície maior do que a maioria dos materiais baseados em sílica. As pesquisas têm consistentemente mostrado que o percentual recuperado para muitos tipos de analitos é significativamente maior com as resinas poliméricas do que com partículas de sílica.<sup>96</sup>

Na maioria dos casos, os analitos adsorvidos são facilmente e completamente eluídos de adsorventes poliméricos por um pequeno volume de solvente orgânico.<sup>77</sup>

Tipicamente, os sorventes de polímero orgânico como o estireno-divinilbenzeno (SDB) possui ampla área de superfície (600-1200 m<sup>2</sup>/g), maior capacidade do que as de fase ligada devido ao alto percentual de carbono e uma superfície mais hidrofóbica (Fig. 10). Sua maior aplicação é na área de SPE com fase reversa.<sup>70</sup>

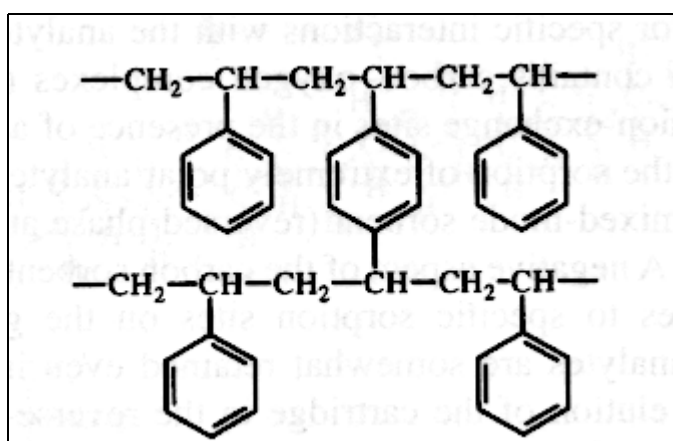


Figura 10 - Estrutura química da resina XAD-16 (estireno-divinilbenzeno)

Os sorventes poliméricos estão disponíveis por vários fabricantes e variam em área de superfície. Geralmente, quanto maior a área de superfície, maior a capacidade do sorvente para amostras de traços orgânicos. Além disso, os anéis

aromáticos em contato com a matriz permitem interações de doação de elétron entre o sorvente e as ligações  $\pi$  do soluto, os quais devem promover um aumento das interações analito-sorvente, aumentando a energia de sorção. Assim, os sorventes poliméricos retêm mais que os sorventes de fase reversa C-18.<sup>70</sup>

Os sorventes poliméricos possuem consideravelmente uma maior capacidade para substâncias polares. Por exemplo, Hennion e Pichon, 1994<sup>97</sup> reportaram capacidades de 20 a 40 vezes maiores para fases poliméricas do que para a maioria das fases C-18 hidrofóbicas, no isolamento de substâncias aromáticas polares da água. Esta capacidade aumentada é muito importante quando baixos limites de detecção são requeridos. Outra vantagem dos sorventes poliméricos sobre os sorventes baseados em sílica é sua tolerância à valores de pH altos e baixos. Esses sorventes poliméricos são estáveis em pH de 2.0 a 12.0.

## 5 - Análise quantitativa dos flavonóides

Numerosos métodos têm sido desenvolvidos para análise de rotina qualitativa de polifenóis. A quantificação bruta dos componentes puros ou misturas é possível utilizando-se técnicas colorimétricas e/ou espectrometria do UV/visível. Nos casos onde os componentes de uma mistura são do mesmo tipo, exemplo: todos os componentes são antocianidinas ou são flavanóis, esses métodos podem fornecer resultados razoáveis empregando-se curvas padronizadas com flavonóides comercialmente disponíveis <sup>12,66</sup>. No caso dos componentes do cacau, isto requer pelo menos o fracionamento das antocianinas e flavanóis.

A maior parte das propostas para fracionamento se baseiam em técnicas de cromatografia que tem demonstrado a capacidade em separar adequadamente os abundantes monômeros, dímeros e trímeros; mas, segundo a literatura, ainda são incapazes de resolver estruturas oligoméricas mais complexas, como os oligômeros de procianidina (tetrâmeros ou mais) <sup>98</sup>. Tradicionalmente, os oligômeros de procianidina são isolados minuciosamente com base no grau de polimerização, utilizando-se múltiplos passos através de várias colunas em gel permeável.

Apesar de pouco divulgada na literatura, a determinação quantitativa de polifenóis pode ser baseada no estudo de degradação de sua estrutura e a técnica mais importante se baseia numa reação química de hidrólise <sup>12,99</sup>. Gravimetricamente, os polifenóis podem ser determinados pelo “Método de Folin” que se baseia no cálculo de equivalentes em relação ao ácido gálico. É adequado quando para avaliar apenas os monômeros e poucos oligômeros <sup>11,100</sup>.

Alguns autores tem citado a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) como capaz de separar procianidinas monoméricas até procianidinas heptaméricas como classes oligoméricas distintas <sup>101,102</sup>. A literatura sobre aplicações de HPLC é muito vasta devido a sua alta resolução, alta eficiência, alta reprodutibilidade e tempo de análise relativamente curto e sem derivação. Além disto, o sistema é facilmente acoplado a uma variedade de detectores <sup>66,67</sup>.

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrofotometria de UV/visível é de ampla aplicação e pode ser usada para quantificação. O cromatograma obtido mostra todos os componentes que absorvem no comprimento de onda de interesse e a área do pico de cada componente. A área do pico é dependente do coeficiente de absorção daquele componente em um determinado comprimento de onda. Para quantificação, as áreas desses picos são então comparadas com aquelas das substâncias do padrão, as quais são ambos incluídos na amostra antes da injeção (padrão interno) ou cromatografados separadamente (padrão externo). <sup>12,66</sup>

## 5.1 - Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Na análise de polifenóis várias técnicas de cromatografia encontram aplicações que vão desde a simplicidade da cromatografia em camada fina (CCF) até a cromatografia de alta eficiência acoplada a poderosos detectores de massa. Para análises qualitativas e para examinar o conteúdo de flavonóides em extratos ou frações obtidas de outras separações cromatográficas, a CCF é particularmente usada. <sup>12,66</sup>

A cromatografia líquida de alta eficiência, conhecida como HPLC (em inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é indiscutivelmente a técnica cromatográfica mais usada nos estudos de polifenóis. A primeira abordagem, relacionada com a separação de polifenóis por HPLC, foi publicada em 1976, por Wulf e Nagel. Esses autores utilizaram misturas ternárias de metanol, água e ácido acético em uma coluna de fase reversa C18 para separar os flavonóides, agliconas e glicosídeos. <sup>103</sup>



O HPLC têm sido utilizado para separação de antocianidinas, xantonas, isoflavonas, procianidinas e taninos. Além disso, o HPLC é também usado para padronização de flavonóides em uso farmacêutico.<sup>103</sup>

Quando analisamos amostras complexas em que os componentes de interesse atingem uma ampla faixa de retenção, é necessário modificar as condições de eluição durante a análise; para assegurar uma resolução suficiente dos primeiros componentes que são eluídos e a manutenção do tempo de análise dentro de limites razoáveis. Isto geralmente é feito através da mudança na composição do eluente, aumentando a força eluotrópica com o tempo. Com a recente tendência do uso de três e, até mesmo, quatro componentes do eluente, isso não é uma questão experimental trivial. O ácido usado para acidificação da fase móvel deve ser o acético, fórmico, fosfórico ou perclórico. Fotômetros com comprimentos de onda fixados (280 nm) ou espectrofotômetros são utilizados para detecção.<sup>103</sup>

O HPLC pode ser usado para separação, determinação quantitativa e identificação de flavonóides. Na maioria dos casos, os sistemas para separações de grupos fenólicos e seus glicosídeos em alimentos são realizados pela cromatografia de fase reversa (RP), baseadas em colunas de sílica com fase ligada C18<sup>12,66,67,69</sup>. Uma escolha conveniente de fase estacionária C18 e uma apropriada concentração de ácido acético para a polaridade da fase móvel são particularmente importantes na análise do polifenol, para obtenção de picos definidos e seletividades desejadas de separação<sup>103</sup>.

A maioria dos sistemas de solventes usados para análise por HPLC inclui eluição de gradiente binária e, ocasionalmente, eluição isocrática. Eluição com gradiente ou isocrática; empregando solventes de ácido acético, ácido fórmico ou ácido fosfórico aquosos com metanol (MeOH) ou acetonitrila (ACN) como modificadores orgânicos é comum.<sup>12,66,67</sup>

O pH e a força iônica da fase móvel são conhecidos por influenciar a retenção de fenóis na coluna, dependendo da ocorrência de protonação, dissociação ou uma dissociação parcial. Uma mudança no pH que aumenta a ionização da amostra poderia reduzir a retenção na separação da fase reversa. Assim, pequenas

quantidades de ácido acético (2-5%), fosfórico ou ác. trifluoracético (TFA-0,1%) são incluídos no sistema de solvente para supressão da ionização dos fenóis e dos grupos carboxílicos e, com isso, aprimorar a resolução e a reprodutibilidade das corridas.<sup>66,67</sup>

Rigaud *et al.*,1993<sup>102</sup> desenvolveram um método por HPLC com coluna de sílica de fase normal e um gradiente de diclorometano em metanol, com uma mistura constante de 4% de ácido fórmico-água (1:1) como eluente, para separar procianidinas com base em sua massa molecular, sem derivação. Isso é repetidamente aplicado para análise de extrato de procianidina do cacau, bem como para HPLC semi-preparativo e preparativo no isolamento, purificação e, subsequente, análise estrutural<sup>11,12,104</sup>.

Os grupos fenólicos absorvem bem na região do ultravioleta e não há um único comprimento de onda ideal para monitoramento de todas as classes de fenóis, já que eles apresentam absorbância máxima em diferentes comprimentos de onda. Para sensibilidade máxima, usualmente, um comprimento de onda próximo ao máximo é desejado. Entretanto, na prática, comprimentos de onda são escolhidos para obter-se a melhor detecção global de todos os componentes; a qual, no caso dos flavonóides, é na maioria das vezes, por volta de 280 nm.<sup>67,69</sup>

Os instrumentos modernos, multicanais, detecção rápida ou detectores com arranjo de fotodiodo, conhecido como PDA (*photo diode array*) têm se tornado norma. O PDA pode produzir dados em ambos os domínios de tempo e de espectro. Isso demonstra a utilidade da informação qualitativa na análise de fenóis baseados no espectro de absorção. O PDA tem três grandes vantagens para análise de HPLC: detecção de múltiplos comprimentos de onda, identificação dos picos e determinação da pureza do pico.<sup>12,66,67</sup>

Como o PDA pode registrar as características do espectro no ultravioleta para diferentes grupos fenólicos à medida que eles são eluídos da coluna, a caracterização e o provimento de informação sobre a pureza do pico podem ser facilitados através da comparação do espectro de frente, ápice e tamanho de cada pico. Além disso, o cálculo rápido dos coeficientes de absorbância é possível entre

diferentes comprimentos de onda. Comumente, a identificação das substâncias fenólicas na análise de HPLC foi sempre realizada por comparação entre os tempos de retenção e características espectrais de seus picos com aqueles dos padrões.<sup>12,66,67</sup>

Amostras padronizadas de agliconas e de alguns glicosídeos mais comuns são comercialmente disponíveis, entretanto, as procianidinas, especialmente os oligômeros com três ou mais unidades monoméricas, não são encontradas.<sup>12,66,67</sup>

Para comprovar a pureza do espectro; o “upslope”, o “dowslope” e o ápice do pico são comparados. Entretanto, para isômeros, a informação espectral no UV-Vis isolada não pode ser aproveitada para uma identificação positiva; porque isômeros de co-eluição podem criar um espectro, representando uma mistura de isômeros. Neste caso e para essas substâncias, das quais os padrões não são disponíveis, meios adicionais de identificação devem ser aplicados na interpretação da separação por HPLC; como a espectrometria de massa (MS), ressonância magnética nuclear (NMR) e o infra-vermelho com transformada de Fourier (FT-IR).<sup>66,67</sup>

Detectores de fluorescência são também usados para fenóis, mas não têm sido aplicados largamente para detecção de flavonóides. A detecção por fluorescência pode oferecer vantagens sobre a detecção pelo UV em termos de aumento na seletividade e maior sensibilidade. Além disso, acoplado com o ultravioleta, a detecção por fluorescência pode proporcionar melhor identificação e determinação da pureza do espectro.<sup>67</sup>

O acoplamento do sistema de HPLC com um espectrômetro de massa *on-line* (MS) utiliza uma câmara eletrospray de ionização a pressão atmosférica e tem mostrado ser uma ferramenta poderosa de análise qualitativa permitindo a identificação de procianidinas nos componentes do cacau e no chocolate.<sup>12,104</sup>

Combinando os dados de massa e tempo de retenção são suficientes para pré-definir ou confirmar a identidade das substâncias, sem isolamento prévio. A confirmação desse método como uma ferramenta quantitativa fidedigna para

determinação dos níveis de procianidina no cacau, chocolate e outros produtos alimentícios, está sendo correntemente investigada. Como este método não requer o isolamento de substâncias com o propósito de caracterizar seu tamanho, ele é mais rápido e pode, além disso, prover uma confirmação da fidedignidade da técnica baseada na hidrólise, para estimativa em média do grau de polimerização (DG) da procianidina.<sup>12,104</sup>

## **6 - Materiais e Métodos**

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando-se água Milli-Q. Em alguns experimentos, foi utilizado um solvente de composição 70% de acetona; 29,5% de água e 0,5% de ácido acético, que será denominado de mistura eluente <sup>104</sup>.

As colunas de leito de espuma, de resina e de C18 foram todas tratadas previamente com 100 mL de metanol, 100 mL de água e 100 mL de mistura eluente.

Após a percolação do padrão e da amostra, os carboidratos foram eluídos com água e os polifenóis com a mistura eluente. Mais tarde, essa mistura eluente foi substituída por metanol puro.

Para alcançar os objetivos propostos, as atividades foram desenvolvidas segundo as seguintes etapas:

### **6.1 – Preparo de solução padrão estoque de polifenóis**

Por não se dispor comercialmente de um padrão de polifenóis de chocolate foi utilizado, neste trabalho, um padrão de chá verde. Foi adquirido um padrão *Polyphenon 60* (mínimo de 60% de catequinas totais), desidratado, fabricado pela Sigma<sup>®</sup> e que foi estocado no escuro entre 2°C e 8°C.

A solução estoque aquosa de polifenóis foi preparada usando 4,25 g do padrão de *Polyphenon 60* em 25 mL. Esta concentração estava de acordo com a

proporção do extrato obtido da amostra antes de ser percolado em coluna, segundo Hammerstone *et al.*, 1999<sup>104</sup>. A solução estoque foi preparada sob agitação, filtrada em papel de filtro, recolhida num frasco de vidro escuro e congelada em refrigerador.

### **6.1.1- Medidas da estabilidade da solução padrão de polifenóis usando espectrofotometria**

Com o intuito de averiguar a degradação, oxidação ou qualquer outra alteração nas propriedades físico-químicas da solução padrão, realizou-se um estudo espectrofotométrico onde a variação de absorbância foi medida em nm e ao longo do tempo.

A espectrofotometria de UV/visível foi escolhida por ser uma técnica simples, de baixo custo e por ser utilizada na detecção de polifenóis por HPLC. A disponibilidade de uma técnica espectrofotométrica otimizada para avaliar a estabilidade e a concentração de polifenóis seria muito útil no monitoramento das frações obtidas nos processos de isolamento de polifenóis e, nas diferentes colunas de interesse deste trabalho e, portanto, investiu-se no estudo desta técnica.

A percolação de soluções-padrão em um cartucho C18, da marca P R COLA<sup>®</sup> (600 mg), foi necessária para auxiliar na avaliação da estabilidade das mesmas. Utilizou-se um espectrofotômetro na faixa do visível e outro no ultravioleta. As soluções preparadas a partir das soluções-estoque P1, P2 e P3 do padrão e àquelas que foram resultantes da percolação pela coluna foram mantidas sob refrigeração.

Uma bomba peristáltica foi utilizada para percolar as soluções por uma coluna contendo C18, por não se dispor de uma bomba de pressão, sendo que a maior dificuldade com esta coluna tipo cartucho residiu no fato de permitir uma vazão baixa, cerca de 0,3 mL/ min.

Neste estudo, foram utilizadas duas soluções padrão estoques idênticas P1 e P2; para avaliação da estabilidade, ao longo do tempo e durante as mesmas variações de concentração. Também verificou-se a influência do solvente na

estabilidade da solução padrão estoque; comparando-se as soluções-estoque P1 e P2 preparadas em água, com uma solução estoque preparada na mistura eluente (70% de acetona, 29,5% de água e 0,5% de ácido acético) denominada de P3.

*Tabela 5 – Composição das soluções-estoque P1, P2 e P3*

Soluções-estoque	Quantidade de padrão (g)	Volume final de eluente (mL)	Eluente
P1 e P2	4,25	25	H <sub>2</sub> O
P3			Mistura eluente (70% acetona, 29,5% água e 0,5% ácido acético)

### **6.1.2 – Medida de estabilidade das soluções padrão de polifenóis usando HPLC**

A estabilidade das soluções padrão foi verificada em um sistema de HPLC para que se conhecesse a estabilidade dos analitos, polifenóis e carboidratos, ao longo do tempo. Foram medidos os valores de absorvância em 280 nm e a altura do pico em função do tempo de análise. Nesta etapa, não houve fracionamento do padrão em coluna.

### **6.1.3 - Procedimento de Extração em Fase Sólida usando coluna empacotada com C18**

Algumas minicolunas (Fig.11) foram preparadas, utilizando-se sílica-gel modificada com grupos octadecil (C-18) fornecida pela Waters, sob a forma de cartuchos Sep-pak. Os cartuchos foram abertos e o seu conteúdo foi utilizado para empacotar as minicolunas confeccionadas com tubo de vidro de 5,6 cm de comprimento e 0,6 cm de diâmetro interno, cujo leito comportava cerca de 100 mg de sílica. As colunas foram previamente umedecidas com metanol e acondicionadas com água Milli-Q, de acordo com Hammerstone *et al.*, 1999<sup>104</sup>.



Figura 11 – Coluna C18

Tabela 6 - Experimentos realizados na Coluna C18

<b>No</b>	<b>Sol. Estoq (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Vazão (mL/min)</b>	<b>Vol. (mL)</b>	<b>Eluente</b>	<b>No Frações</b>	
<b>1</b>	100	1	20	H <sub>2</sub> O	1	
<b>2</b>			5	Mist	1	
<b>3</b>			35	H <sub>2</sub> O	7 x 5 mL	
<b>4</b>			5	Mist	1	
<b>5</b>			20	H <sub>2</sub> O	4 x 5 mL	
<b>6</b>	25		20	H <sub>2</sub> O	4 x 5 mL	
<b>7</b>	50		60	H <sub>2</sub> O	12 x 5 mL	
<b>8</b>			25	Mist	5 x 5 mL	
<b>9</b>			25	MeOH	5 x 5 mL	
<b>10</b>	400		20	H <sub>2</sub> O	1	
<b>11</b>			55	H <sub>2</sub> O	11 x 5 mL	
<b>12</b>			25	Mist	5 x 5 mL	
<b>13</b>			25	MeOH	5 x 5 mL	
<b>14</b>	100		0,5	80	H <sub>2</sub> O	8 x 10 mL
<b>15</b>			80	MeOH	8 x 10 mL	

- Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque do padrão *Polyphenon 60* foi percolada por uma das colunas preparadas como acima, sob vazão de 1 mL/min;



- Numa segunda coluna, adicionou-se 25 uL da solução estoque do padrão *Polyphenon 60*, sob vazão de 1 mL/min;
- Em uma terceira coluna, adicionou-se 50 uL da solução estoque, sob vazão de 1 mL/min;
- Na quarta coluna, uma alíquota de 400 uL da solução estoque foi percolada, sob vazão de 1 mL/min;
- Após os procedimentos anteriores, resolveu-se diminuir a vazão para 0,5 mL/min, na tentativa de que ocorresse uma melhor interação entre os analitos, polifenóis e carboidratos, com a sílica da coluna. Sendo assim, foi adicionado à coluna, uma alíquota de 100 uL da solução estoque.

#### **6.1.4 - Otimização da Extração em Fase Sólida com a coluna XAD-16**

Foram confeccionadas algumas colunas com tubo de vidro de 45 cm de comprimento e 0,65 cm de diâmetro interno, que foram empacotadas com resina do tipo XAD-16, sendo o volume de leito de 30 mL.



Figura 12 - Coluna XAD-16

Tabela 7 – Experimentos realizados na Coluna XAD-16

No	Sol. Estoq ( $\mu\text{L}$ )	Vazão (mL/min)	Vol. (mL)	Eluente	No Frações
1	1000	1	20	H <sub>2</sub> O	1
2			5	Mist	1
3			20	H <sub>2</sub> O	4 x 5 mL
4*	25	0,5	80	H <sub>2</sub> O	8 x 10 mL
5*			80	MeOH	8 x 10 mL
6	50		80	H <sub>2</sub> O	8 x 10 mL
7			80	MeOH	8 x 10 mL
8**	100		80	H <sub>2</sub> O	8 x 10 mL
9**			80	MeOH	8 x 10 mL

\* - Feitas em duplicata

\*\* - Feitas em triplicata

- Uma alíquota de 1 mL da solução estoque do padrão *Polyphenon 60* foi percolada por uma das colunas preparadas, sob vazão de 1 mL/min;
- Numa segunda coluna, adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  da solução estoque do padrão *Polyphenon 60*, sob vazão de 0,5 mL/min, em duplicata;
- Em uma terceira coluna, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução estoque, sob vazão de 0,5 mL/min;
- Finalmente, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque foi percolada em todas as colunas de XAD, sob vazão de 0,5 mL/min, em triplicata;
- Resolveu-se diminuir a vazão para 0,5 mL/min, na tentativa de que ocorresse uma melhor interação entre os analitos, polifenóis e carboidratos, com a resina da coluna.

### **6.1.5 - Otimização da Extração em Fase Sólida com a coluna de espuma de poliuretano**

Foram utilizadas para o procedimento três esponjas para lavagem doméstica, ou seja, pedaços de espumas de poliuretano (EPU) comercial de células abertas do tipo poliéter, marca Scotch-Brite™ da 3 M. A referida esponja é constituída de duas faces: uma de cor amarela lisa e outra de cor verde e áspera. Primeiramente, retirou-se completamente a face verde da esponja. A face amarela foi picotada em pequenos tabletes, com auxílio de uma tesoura.

Os tabletes de espuma, então, foram tratados com ácido clorídrico 1 M, por 24 horas; para remover possíveis contaminantes inorgânicos e lavado com água de pureza Milli-Q até a retirada completa do ácido. Estes foram, em seguida, extraídos com acetona no sistema soxhlet, por 6 horas; para remover contaminantes orgânicos; finalmente, secos em estufa a 60°C e armazenados em frascos de vidro.<sup>15</sup>

Em seguida, empacotou-se uma bureta de 50 mL, com diâmetro interno de 1,1 cm; sendo o volume de leite igual a 32 mL, preenchidos com os tabletes de espuma purificados.



Figura 13 – Coluna de Espuma de Poliuretano

Tabela 8 - Experimentos realizados na Coluna de Espuma de Poliuretano

No	Sol. Estoq ( $\mu\text{L}$ )	Vazão (mL/min)	Vol. (mL)	Eluente	No Frações
1	250	1	20	H <sub>2</sub> O	1
2			5	Mist	1
3			20	H <sub>2</sub> O	4 x 5 mL
4*	100	0,5	80	H <sub>2</sub> O	8 x 10 mL
5*			80	MeOH	8 x 10 mL

\* - Feitas em triplicata

- Uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  da solução estoque do padrão *Polyphenon 60* foi percolada por uma das colunas preparadas, sob vazão de 1 mL/min;
- Após recuperação, nesta mesma coluna, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque do padrão *Polyphenon 60*, sob vazão de 0,5 mL/min, em triplicata;
- Resolveu-se diminuir a vazão para 0,5 mL/min, na tentativa de que ocorresse uma melhor interação entre os analitos, polifenóis e carboidratos, com a espuma da coluna.

## 6.2 - Estudo com amostras de chocolate

Foram adquiridas no mercado, na cidade de Niterói, RJ, duas amostras de chocolate, em barra, do tipo meio amargo, de duas marcas de grande aceitação. As amostras sofreram um pré-tratamento de acordo com o procedimento descrito por Hammerstone *et al.*, 1999<sup>104</sup>, com modificações.

### 6.2.1 - Procedimento experimental aplicado as amostras

Hammerstone *et al.*, 1999<sup>104</sup> previa um tratamento inicial com a finalidade de pré-concentrar a amostra, isto é, pré-concentrar os constituintes da amostra, isto é, pré-concentrar o extrato obtido, numa determinada etapa do processo, por meio de uma evaporação em rotavapor. A evaporação deveria ser feita à temperatura máxima de 40<sup>o</sup> C para evitar a degradação dos polifenóis.

A formação de azeótropo pelos componentes da mistura utilizada como extrator inviabilizou qualquer tentativa de evaporação dos solventes; sem contar com a degradação e oxidação totais dos polifenóis, devido ao longo tempo de exposição ao calor, mesmo em temperatura adequada. Além disto, as condições experimentais disponíveis para a realização deste trabalho estavam muito aquém daquelas reportadas na literatura. Era necessária uma bomba de vácuo mais apropriada e algumas adaptações no condensador do rotavapor, de modo a ser resfriado a 5<sup>o</sup>C, sendo o sistema submerso em nitrogênio líquido. Desta forma, não foi possível introduzir a evaporação rotativa para evitar a excessiva diluição dos polifenóis, frente aos carboidratos.

Além disso, houve modificação no tipo de solvente utilizado para eluição dos polifenóis da coluna cromatográfica escolhida, na etapa de extração em fase sólida. A mistura constituída de acetona, água e ácido acético foi substituída pelo metanol, a partir dos estudos realizados anteriormente com o padrão *Polyphenon 60*.

## 6.2.2 - Pré-tratamento das amostras

*Experimento realizado de acordo com Hammerstone et al., 1999<sup>104</sup>:*

- Pesar cerca de 5,0 g de chocolate em barra, previamente picado;
- Em funil de separação, extrair os lipídios com 50 mL de n-hexano;
- Após decantar, desprezar o líquido sobrenadante, rico em lipídios;
- Repetir o procedimento de extração por 3 vezes;
- Filtrar em funil de Buckner acoplado a um Kitassato; deixando aspirar o excesso de solvente;
- Após secagem do solvente, uma alíquota em torno de 2,0 g do resíduo retido no papel de filtro foi transferida para funil de separação, sofrendo extração com 10 mL de mistura: 70% de acetona; 29,5% de água e 0,5% de ácido acético. Este procedimento de extração foi realizado duas vezes, para retirada mais eficiente dos polifenóis;
- Após decantação, o sobrenadante foi filtrado e recolhido em frasco de vidro escuro e armazenado em congelador.

A decantação é um procedimento extremamente demorado, sendo necessário cobrir o funil de separação com papel alumínio; para proteger os polifenóis da ação da luz. A centrifuga comum não é aconselhada, pois não se consegue uma separação satisfatória, visto que não se visualiza a interface entre as duas frações (água/lipídio, da primeira extração e água/mistura, do segundo tipo de extração) no tubo de centrifuga e, além disso, a separação entre fases é muito instável e o menor movimento feito no mesmo tubo, já é suficiente para misturar as frações novamente.

## 6.2.3 - Percolação da amostra por uma coluna de resina XAD- 16

De forma simplificada, a Tabela 9 mostra os volumes dos extratos, gerados a partir das amostras de chocolate meio amargo, que foram percoladas na coluna XAD-16 (200  $\mu$ L, 500  $\mu$ L, 1 mL e 5 mL); para as duas marcas comerciais A e B, cada qual feita em triplicata (A1, A2 e A3; B1, B2 e B3). A tabela mostra também os

volumes de eluente, isto é, de H<sub>2</sub>O e MeOH utilizados em cada alíquota de extrato; sendo as oito frações de cada eluente ordenadas de A à H.

As amostras de chocolate foram percoladas em duas etapas. Na primeira, diferentes alíquotas do extrato obtido foram percoladas e eluídas com água em um total de 80 mL e com MeOH, num total de 80 mL. Na segunda etapa, uma única alíquota de 5 mL foi percolada e utilizou-se, para eluição, 8 frações de 20 mL de H<sub>2</sub>O, totalizando-se 160 mL e 80 mL de MeOH, em frações de 10 mL. A vazão operacional foi igual a 0,5 mL/min.

O uso de uma alíquota maior (5 mL), tanto no final da primeira etapa como na segunda etapa, teve como objetivo averiguar o comportamento, na coluna de resina e no sistema de HPLC, de frações mais ricas em polifenóis.

*Tabela 9 - Volume do extrato das amostras A e B de chocolate, percolado pela resina XAD-16 e volume de eluente usado.*

Amostras de chocolate	Volume de eluente adicionado à coluna XAD-16				
	8 frações de 10 mL = 80 mL H <sub>2</sub> O		8 frações de 20 mL = 160 mL H <sub>2</sub> O		
	8 frações de 10 mL = 80 mL MeOH		8 frações de 10 mL = 80 mL MeOH		
	Volume de amostra adicionada à coluna XAD-16				
	200 µL	500 µL	1 mL	5 mL	5 mL
<b>A1</b>	X	X		X	X
<b>A2</b>	X	X			X
<b>A3</b>	X	X		X	X
<b>B1</b>	X	X	X		X
<b>B2</b>	X	X			X
<b>B3</b>	X	X			X

### 6.3 - Caracterização dos Polifenóis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

#### **Condições:**

- Detector com arranjo de fotodiodo;
- Coluna de fase normal;
- Tamanho do diâmetro da partícula da coluna: 5 µm;
- Tamanho da coluna: 25 x 4,6 mm;
- Comprimento de onda: 280 nm (ultravioleta);
- Temperatura do forno: 37 °C;
- Volume de amostra: 25 µL;
- Fase móvel terciária: (A) diclorometano, (B) metanol e (C) ácido acético e água (1:1 v/v);
- Gradientes lineares de B para A com uma constante de 4% de C a uma vazão de 1 mL/min.: a eluição começou com 14% B em A (até a estabilização completa da linha base); 14 - 28,4% B em A, 0-30 min.; 28,4 - 50% B em A, 30-60 min.; 50-86% B em A, 60-65 min.; 65-70 min., no isocrático, ou seja, 86% B em A.



## 7 - Resultados e Discussão

### 7.1 - Estudo com padrão

#### 7.1.1 - Avaliação das medidas da estabilidade da solução padrão de polifenóis usando espectrofotometria

De uma forma exploratória, o espectro de absorção (Fig.14) para o padrão *Polyphenon 60* foi construído na faixa do visível, isto é, na faixa de 400-700 nm porque o padrão era colorido, isto é, de cor marrom.

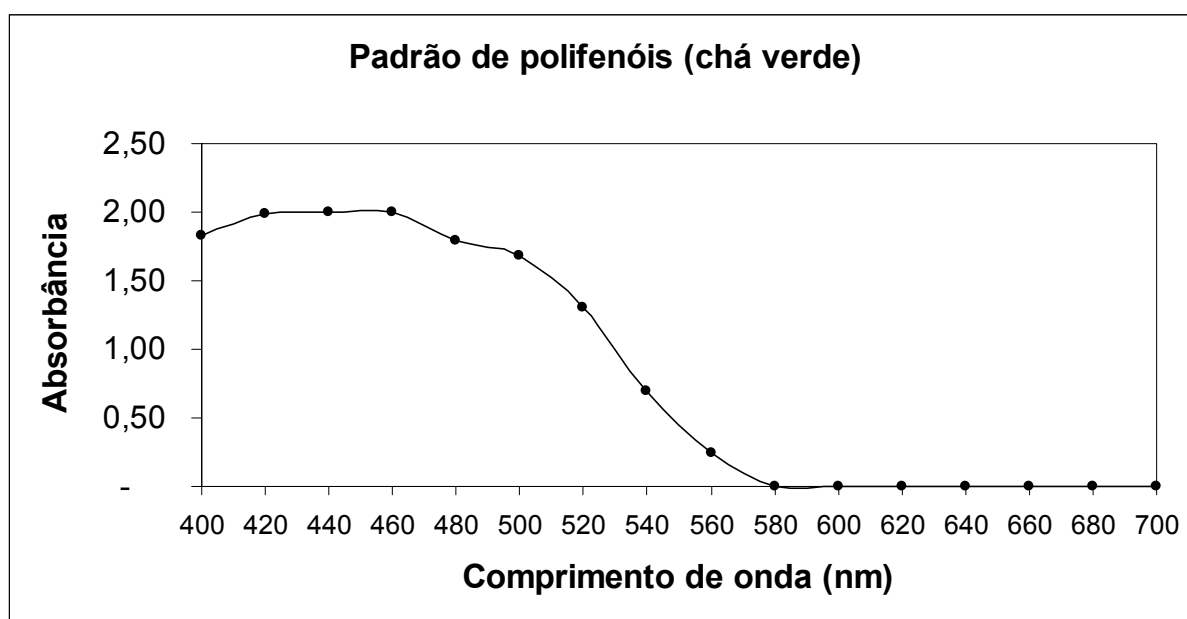
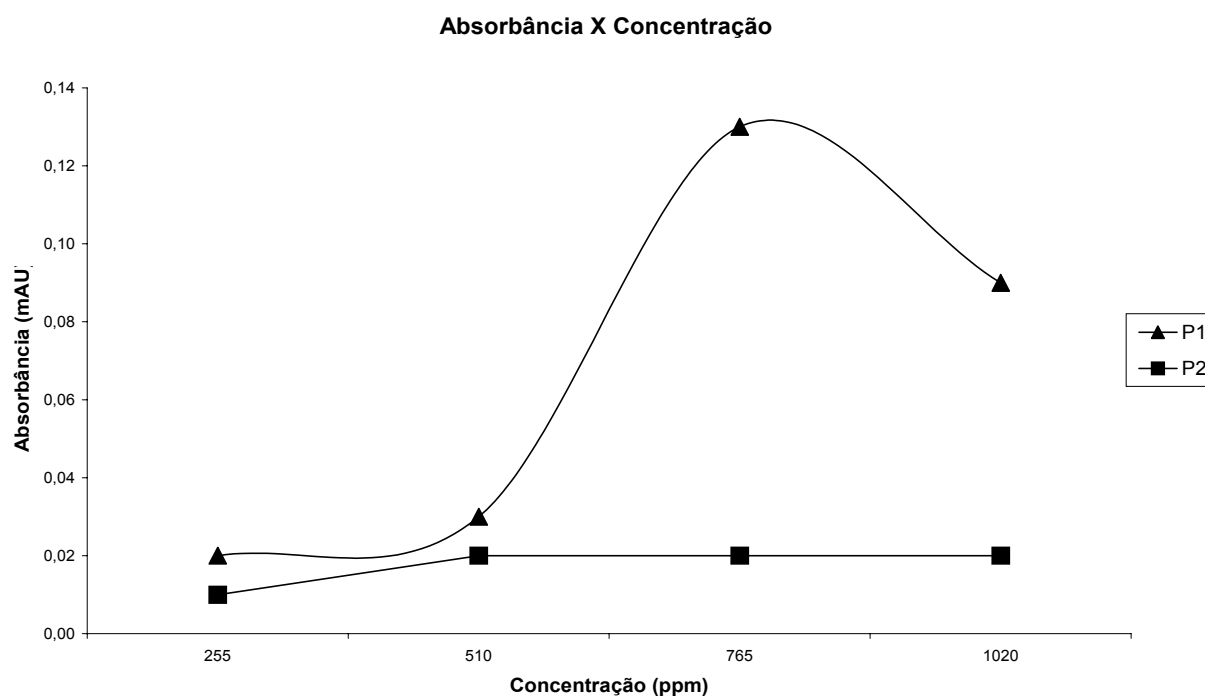


Figura 14 - Espectro de absorção para o padrão *Polyphenon 60*.

A partir da *Figura 14*, percebe-se que não há apenas um comprimento de onda, mas sim, uma faixa de comprimento de onda. Neste caso, adotou-se o  $\lambda_{\max}=440$  nm, por ser o ponto médio mais alto das absorbâncias.

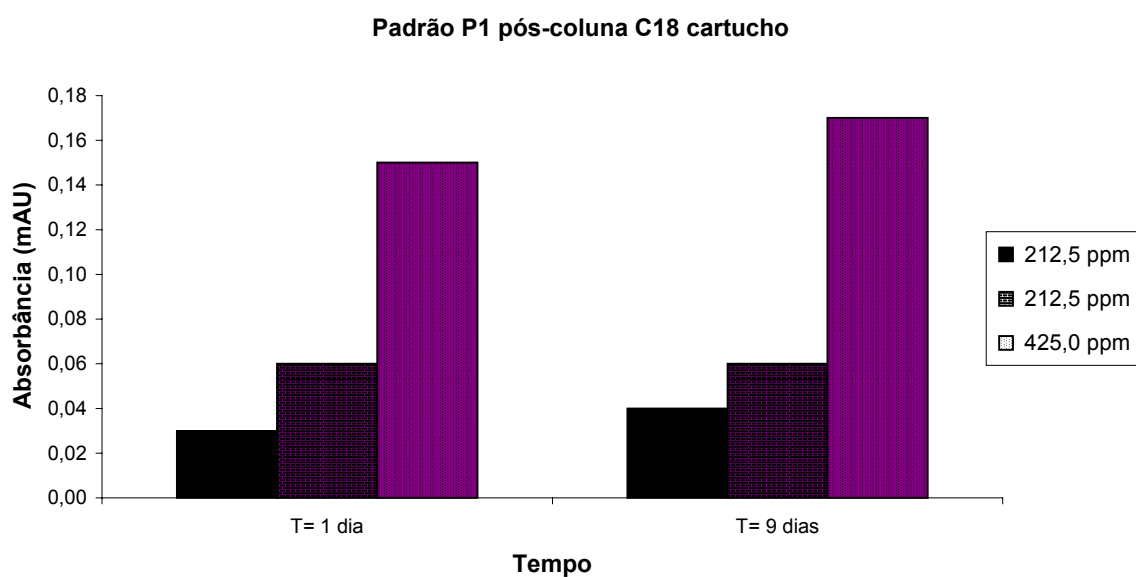
A *Figura 15* mostra a relação entre duas soluções-estoque idênticas (P1 e P2) e suas absorbâncias; sendo que as curvas de calibração são diferentes para padrões de mesma concentração. Além disto, fica claro que os valores de absorbâncias não seguem a lei de Beer.



*Figura 15 – Variação da absorbância em função da concentração obtida na faixa do visível ( $\lambda=440\text{nm}$ ).*

A *Figura 16* mostra a avaliação da estabilidade do padrão P1, após percolação numa coluna C18, de cartucho, em meio aquoso. A partir da eluição do padrão P1 foram obtidas soluções de concentração de polifenóis igual a 425,0 ppm; 212,5 ppm e, novamente, 212,5 ppm. As duas últimas soluções foram repetidas para que fosse avaliada a reprodutibilidade do procedimento. Novamente, pode-se observar que não há seguimento da lei de Beer.

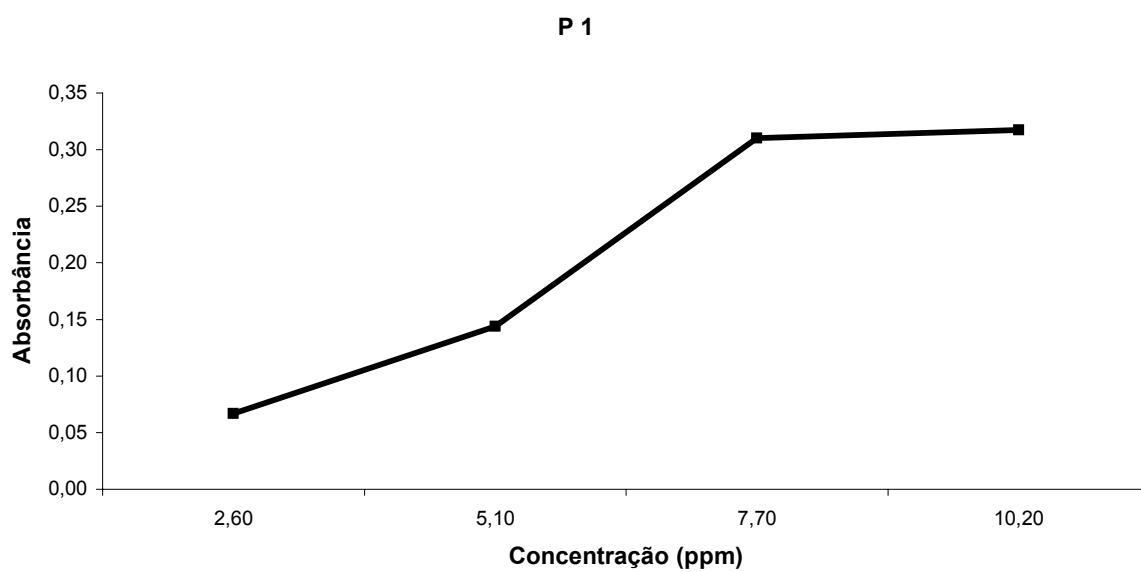
Quanto à estabilidade, pode-se dizer que não houve diferença entre as absorbâncias das soluções preparadas a partir do padrão P1 percolado, quando analisadas no primeiro dia, armazenadas sob refrigeração e depois analisadas, novamente, após nove dias. As diferenças observadas entre as soluções de mesma concentração, provavelmente, se devem ao fato de que o processo de percolação não foi otimizado e, portanto, alguma diferença nos parâmetros de percolação causou a diferença de absorbância notada.



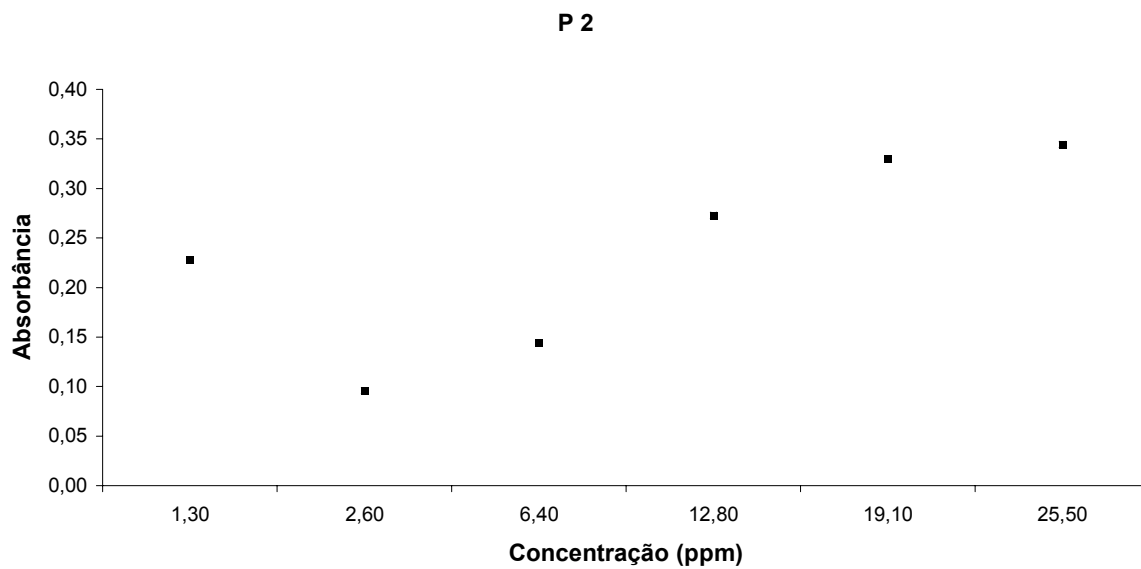
*Figura 16 - Comparação entre as absorbâncias de soluções recolhidas da coluna C18 (cartucho) provenientes da percolação do Padrão 1 ( $\lambda=440\text{nm}$ ).*

Como não houve obediência a lei de Beer, na faixa do visível, decidiu-se investir na faixa do ultravioleta, apesar do padrão de *Polyphenon 60* ser colorido.

Segundo a literatura, o comprimento de onda mais apropriado e utilizado pela maioria dos autores como referência para polifenóis é  $\lambda=280\text{ nm}$ . Sendo assim, a estabilidade começou a ser monitorada ao longo do tempo, através da espectrofotometria, na faixa do ultravioleta (UV). Foi necessário que todos os padrões fossem diluídos a uma faixa de concentração de modo a gerar um valor de absorbância adequado. Os valores de absorbância medidos são apresentados nas *Figuras 17 e 18 e na Tabela 10*.



*Figura 17 - Curva de calibração para as soluções preparadas a partir do Padrão 1 ( $\lambda=280\text{ nm}$ ).*



*Figura 18 - Curva de calibração para as soluções preparadas a partir do Padrão 2 ( $\lambda=280\text{ nm}$ ).*

Tabela 10 - Valores de Absorbâncias medidos para soluções recolhidas a partir do Padrão 1, após percolarem a coluna C18 cartucho. ( $\lambda=280$  nm).

<b>Soluções recolhidas a partir do P1 pós-C18 cartucho</b>	
<b>C (ppm)</b>	<b>A</b>
212,5	0,0676
212,5	0,0692
425,0	0,1128

Os resultados mostram uma reprodutibilidade das medidas de absorbância e, deve ser lembrado que as soluções tiveram suas absorbâncias medidas após percolação por uma coluna C18. Portanto, na reprodutibilidade do valor de absorbância se inclui também a reprodutibilidade do comportamento dos polifenóis na coluna C18. Entretanto, não foi observado o cumprimento da lei de Beer.

A partir do padrão 2, uma nova seqüência de soluções, ainda utilizando-se água como solvente, foi realizada; como pode ser visto na *Figura 19*. Em seguida, fez-se um acompanhamento das soluções de concentração 6,40 ppm e 25,50 ppm ao longo do tempo, de acordo com seus respectivos comprimentos de onda, como se pode verificar através das *Figuras 20 e 21*.

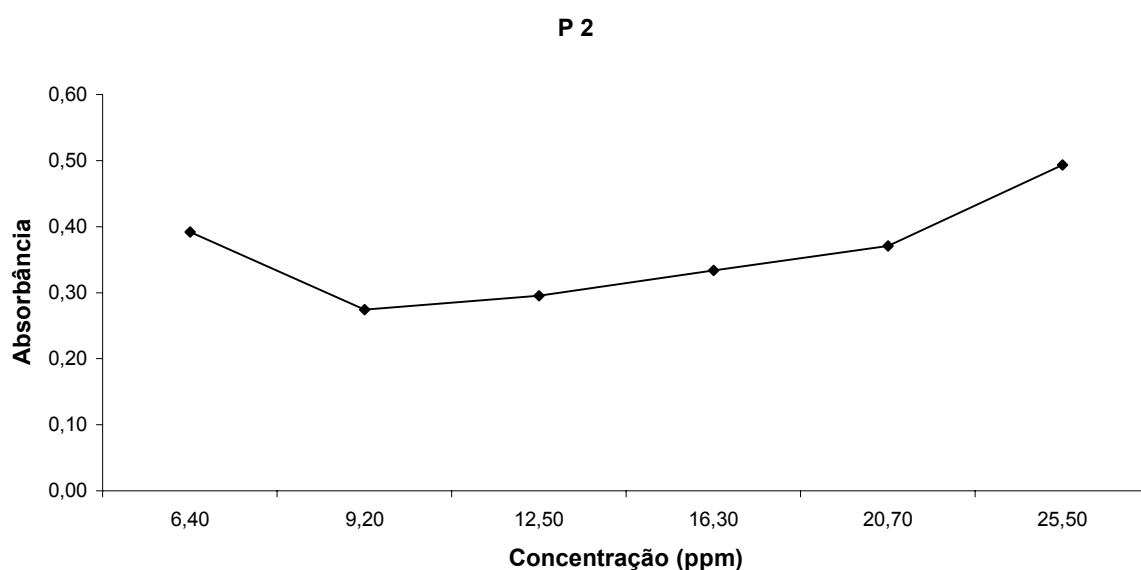
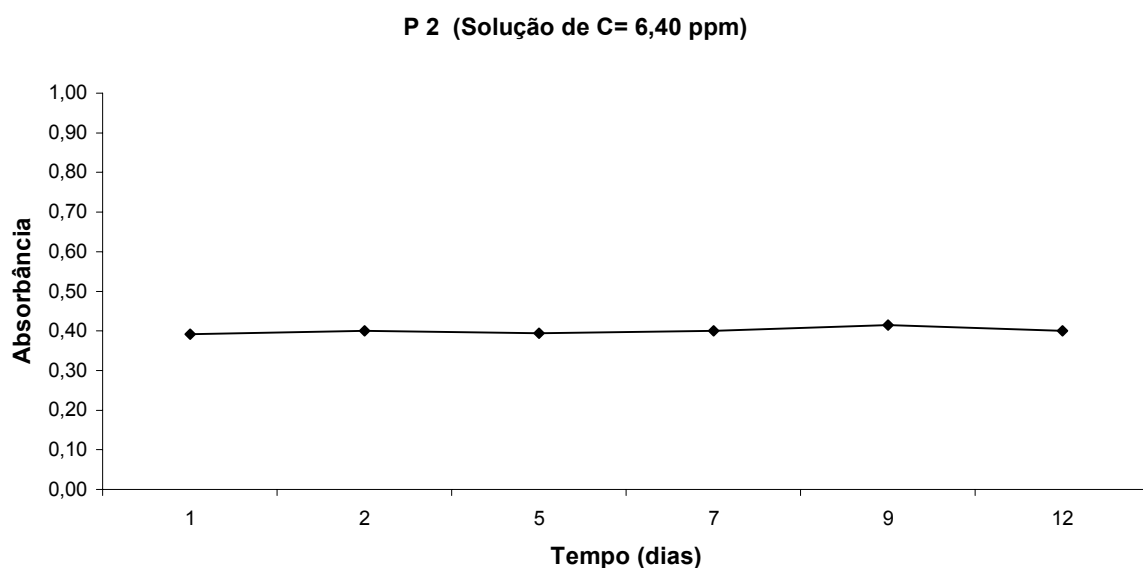
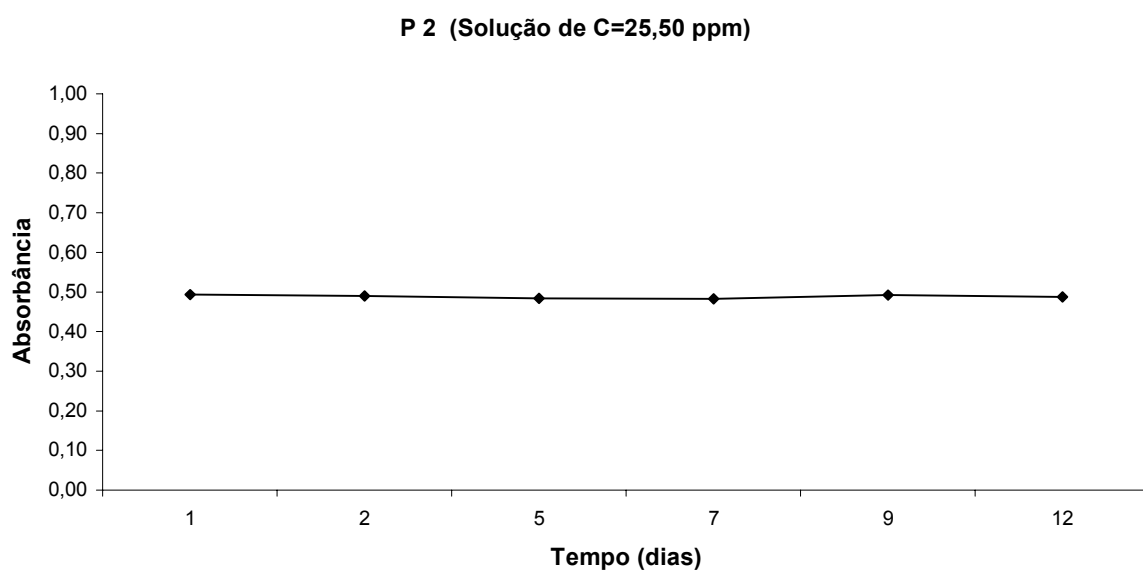


Figura 19 - Curva de calibração para soluções preparadas a partir do Padrão 2 ( $\lambda=280$  nm).



*Figura 20 - Acompanhamento da estabilidade ao longo do tempo, apenas para a solução de 6,40 ppm em água, originada do padrão 2, no comprimento de onda igual a 280 nm.*



*Figura 21 - Acompanhamento da estabilidade ao longo do tempo, apenas para a solução de 25,50 ppm em água, originada do padrão 2, no comprimento de onda igual a 280 nm.*

Todos os dados gerados até então, mostraram que o padrão se mantém estável ao longo do tempo, pelo menos por até 12 dias, que foi o período aqui avaliado. Entretanto, nem a fração colorida que absorve no visível, nem a fração incolor que absorve no ultravioleta, acompanharam a lei de Beer.

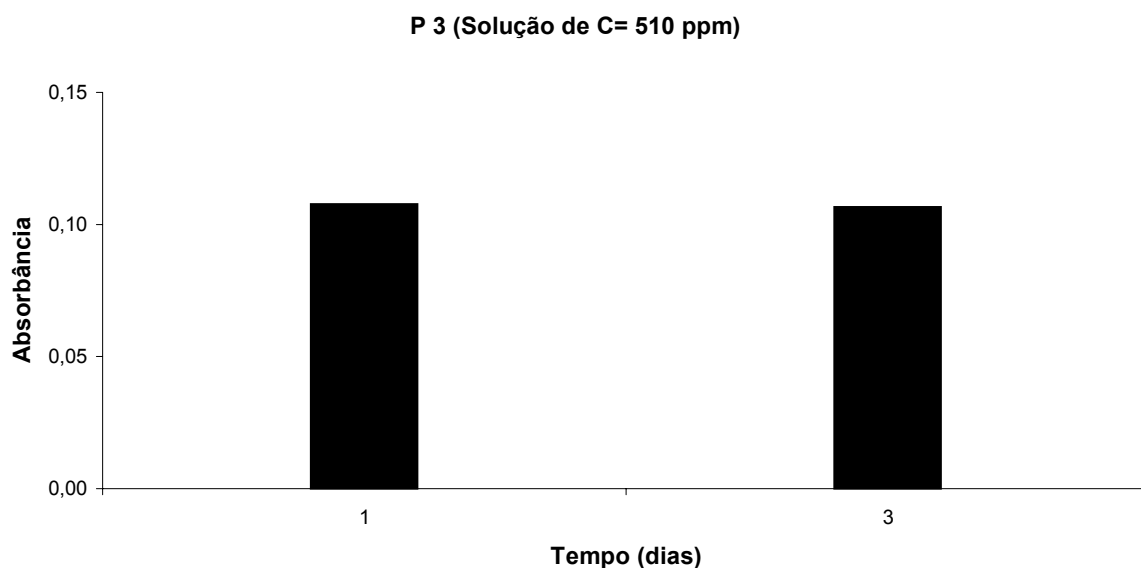
A influência do solvente nos valores de absorvância foi avaliada através do preparo de uma batelada de soluções em meio de uma mistura, constituída de 70% de acetona; 29,5% de água e 0,5% de ácido acético. Neste solvente, o padrão, agora chamado de P3, se mostrou estável; mas não acompanhou a lei de Beer, como pode ser visto na *Tabela 11 e Figura 22*.

*Tabela 11 - Valores de Absorvância medidos para as soluções preparadas a partir do Padrão 3 (padrão em meio de acetona, água e ácido acético)-  $\lambda=280$  nm.*

**Valores de absorvância lido para soluções preparadas a partir do P3**

<b>C (ppm)</b>	<b>A</b>
255	0,0791
510	0,1078
2550	0,0377
5100	0,0378

Nem em função de diferentes faixas de concentração, nem em função do meio de preparo das soluções; não foi observada a lei de Beer para as soluções preparadas a partir do padrão de *Polyphenon 60*. Entretanto, independente do meio e da faixa de concentração, a estabilidade das soluções foi mantida.



*Figura 22 - Comparação da estabilidade para uma solução de 510 ppm, originada do padrão 3; usando-se a mistura de acetona, ácido acético e água como solvente, no comprimento de onda igual a 280 nm.*

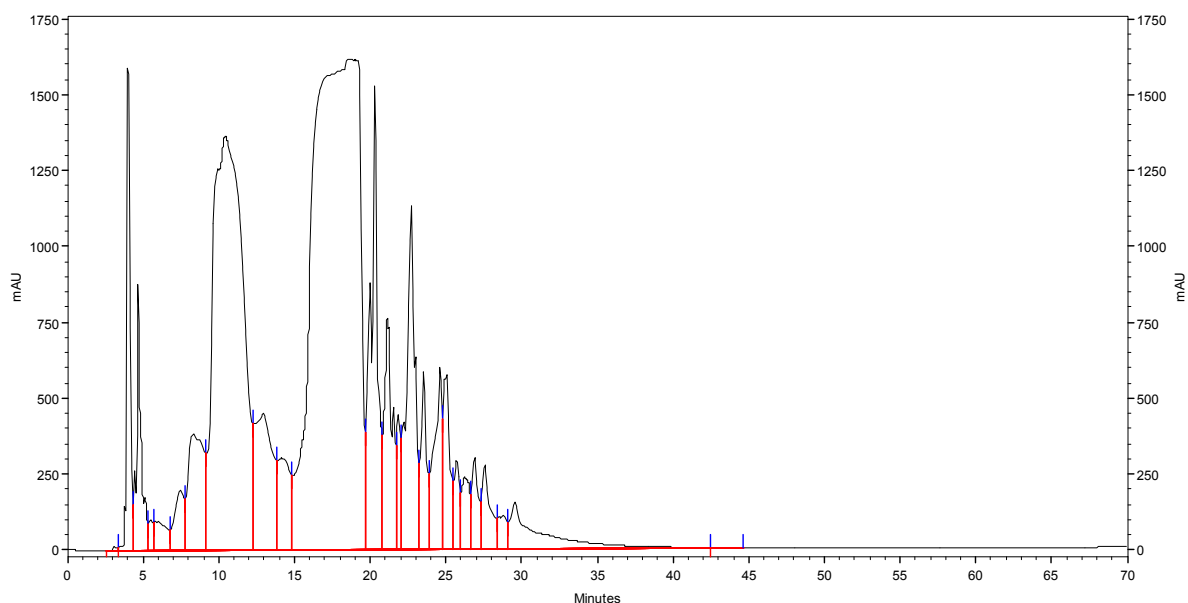
Os dados gerados nesta etapa mostraram que a espectrofotometria serviu ao propósito de monitoramento da estabilidade do padrão *Polyphenon 60*, sob variadas condições. Entretanto, como não houve qualquer compromisso com a lei de Beer, em qualquer dos casos avaliados, a espectrofotometria não se mostrou adequada ao monitoramento da eficiência de percolação e eluição das frações que serão obtidas nos procedimentos de isolamento de polifenóis, realizados nas etapas posteriores deste trabalho. Sendo assim, decidiu-se que o monitoramento da eficiência do processo de isolamento seria realizado por meio do sistema de HPLC.

Por outro lado, os resultados aqui gerados mostraram que os padrões podem ser mantidos e guardados sob refrigeração por um período de, pelo menos, 12 dias, sem que haja degradação. A estabilidade do padrão vem favorecer, sobremaneira, o procedimento experimental; pois não acarreta a necessidade de injetar as frações, no sistema HPLC, imediatamente após o seu recolhimento das colunas cromatográficas onde será feito o isolamento dos polifenóis.



## 7.1.2 - Avaliação da estabilidade do padrão através do sistema de HPLC

O padrão *Polyphenon 60* gerou o cromatograma mostrado na *Figura 23*.



*Figura 23 - Cromatograma do padrão de chá verde Polyphenon 60*

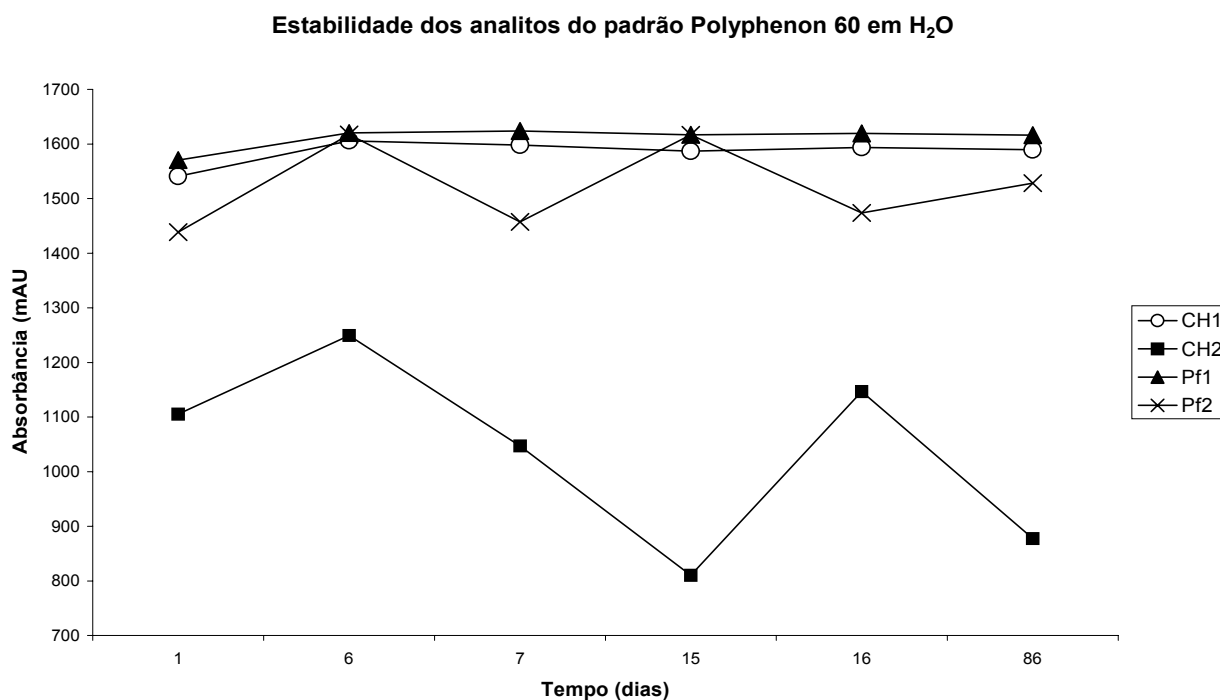
O cromatograma do padrão de chá verde íntegro (Fig.23), sem fracionamento em coluna, revelou que se tratava de uma mistura de substâncias, não apenas de catequinas (polifenóis). O perfil do cromatograma mostra uma série de sinais referentes a polifenóis, localizados após o tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos, e dois picos referentes aos carboidratos, localizados antes do tempo de retenção de 5 minutos <sup>104</sup>.

Os carboidratos referidos aqui, na verdade são pseudo-alcalóides, conhecidos como cafeína e teobromina (1<sup>o</sup> pico e 2<sup>o</sup> pico, respectivamente, antes do tempo de retenção de aproximadamente 5 minutos). Entretanto, são chamados na literatura de carboidratos <sup>104</sup>.

Para efeito deste estudo, inicialmente consideraremos como importante apenas os dois maiores picos dos carboidratos, antes do tempo de retenção de 5 minutos, na ordem da esquerda para direita (CH1 e CH2) e; da série de polifenóis,

apenas os dois maiores picos, após o tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos e antes de 40 minutos. Os dois maiores sinais dos polifenóis (Pf1 e Pf2), neste cromatograma, estariam no tempo de retenção de 18.699 e 20.288, respectivamente. O Pf1 e o Pf2 não são sempre os mesmos picos, ao contrário dos carboidratos, eles são sempre os dois maiores picos de polifenóis, na ordem da esquerda para direita, que aparecem no cromatograma. Estes picos foram considerados como de referência e escolhidos, pois foram os que realmente se destacaram nas soluções-estoque do padrão *Polyphenon 60*, sem fracionamento através de coluna.

Os dados para acompanhamento da estabilidade das soluções-estoque foram gerados a partir do perfil de cada cromatograma obtido ao longo do tempo para o padrão de *Polyphenon 60*. Em cada cromatograma foi determinado o valor da absorbância dos picos de referência para polifenóis (Pf1 e Pf2) e para carboidratos (CH1 e CH2). Com estes dados foram construídas as curvas da *Figura 24*.

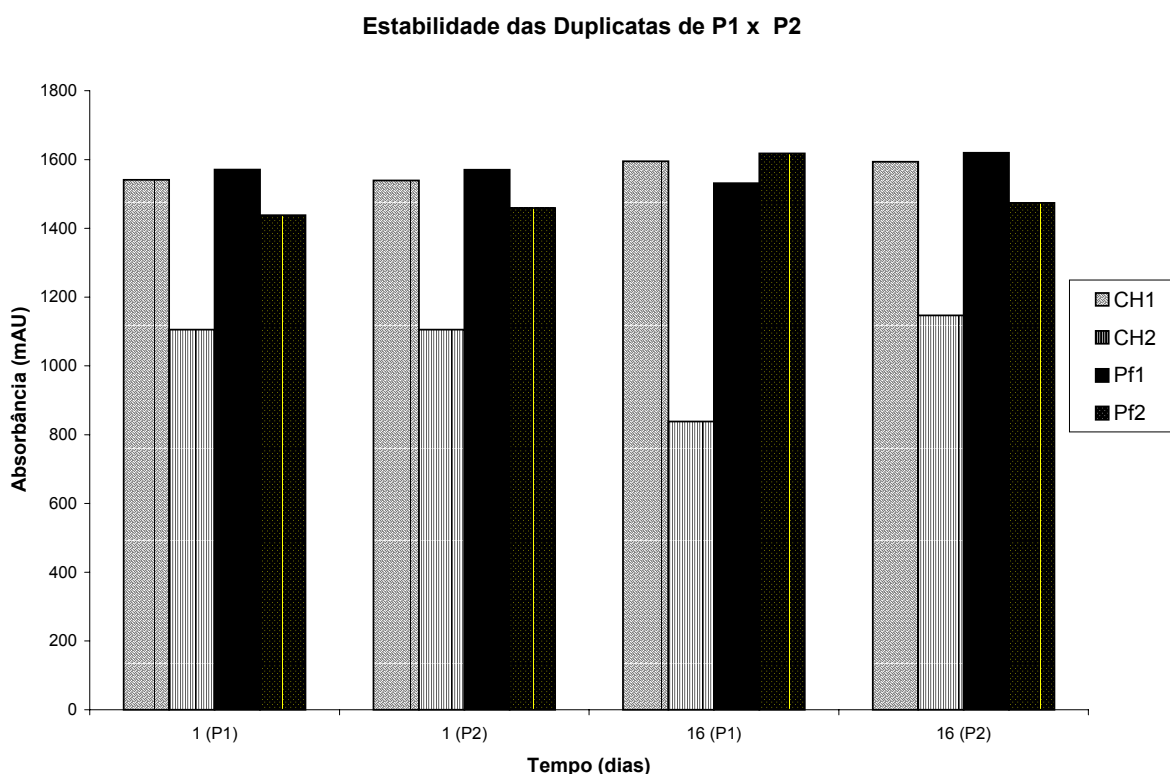


*Figura 24 - Acompanhamento da estabilidade do padrão de chá verde em água ao longo do tempo, através de seus analitos: carboidrato 1 (CH1), carboidrato 2 (CH2), polifenol 1 (Pf1) e polifenol 2 (Pf2).*

Como pode ser observado na *Figura 24*, as espécies responsáveis pelo aparecimento dos picos denominados de Pf1 e CH1 mantiveram-se bastante

estáveis com o tempo. A estabilidade do Pf2 oscilou quase uniformemente e não houve estabilidade no CH2, ou seja, foi completamente aleatória.

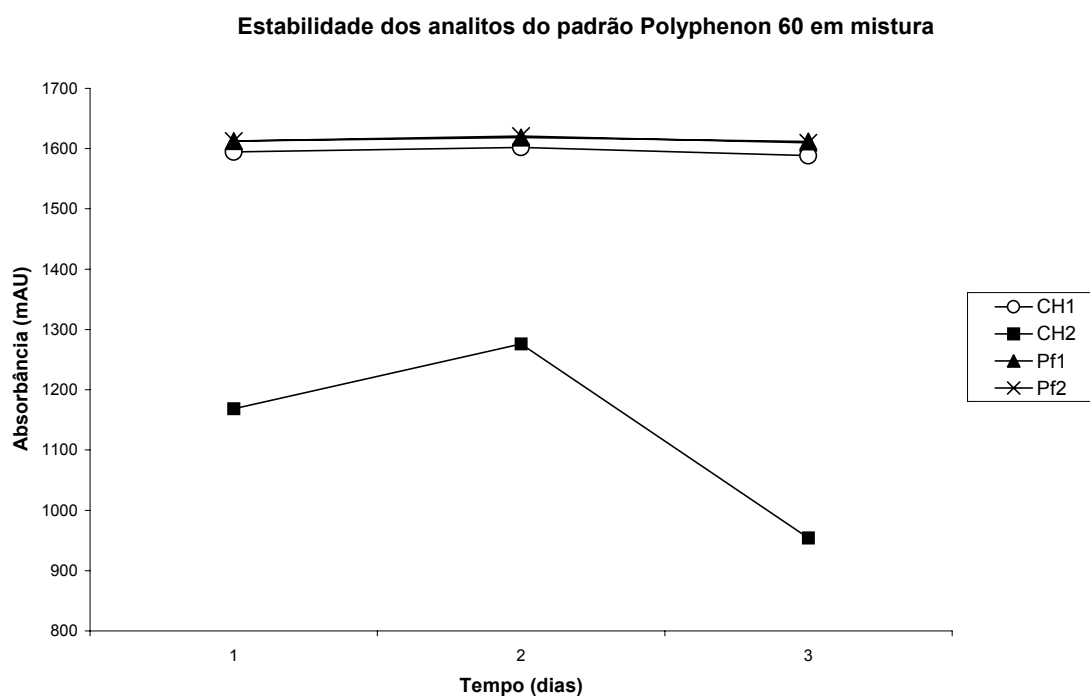
A estabilidade dos polifenóis e dos carboidratos de referência, presentes nas soluções-estoque P1 e P2, ao longo de 16 dias, está compilada no gráfico de barras mostrado na *Figura 25*.



*Figura 25 - Comparação da estabilidade entre os carboidratos e polifenóis contidos no P1 e no P2, do primeiro dia de análise e dezesseis dias depois.*

Pode-se observar que o perfil do P1 é muito semelhante ao perfil obtido para o padrão P2, para o primeiro dia de análise. Fica claro que o polifenol 1 e o carboidrato 1 mostraram-se os mais estáveis ao longo do tempo. A estabilidade do polifenol 2 foi pouco significativa, mas não pode ser desprezada, enquanto que o carboidrato 2 não se manteve estável.

A estabilidade do padrão *Polyphenon 60* em meio não aquoso, isto é, em meio da mistura de ácido acético, água e acetona foi avaliada e os dados gerados são apresentados na *Figura 26*.



*Figura 26 - Acompanhamento da estabilidade do padrão de chá verde em meio não aquoso, ao longo do tempo: carboidrato 1 (CH1), carboidrato 2 (CH2), polifenol 1 (Pf1) e polifenol 2 (Pf2).*

Neste caso, o Pf1, CH1 e o Pf2 tiveram estabilidades praticamente idênticas, ao contrário do CH2 que se manteve instável, como anteriormente. Comparando-se com a *figura 24* que mostra a estabilidade em água, as espécies que geraram os picos Pf1 e o CH1 se mantiveram estáveis ao longo do tempo, independente do meio reacional. Entretanto, as espécies responsáveis pelo pico Pf2 se mantiveram satisfatoriamente estáveis somente em meio da mistura.

Como o Pf2 após eluição nas colunas praticamente não é observado, em comparação ao Pf1 e ao CH1, o seu desempenho na mistura em termos de estabilidade não foi levado em consideração, para o julgamento do melhor solvente a ser utilizado nos experimentos seguintes; visto que, se compararmos o solvente água e os solventes que compõem a mistura, a água foi escolhida por ser atóxica, não poluente, pela facilidade de manipulação e baixo custo.

No geral, o polifenol 1 e o carboidrato 1 foram os que apresentaram melhor estabilidade com o tempo; já, em contrapartida, o polifenol 2 e o carboidrato 2 demonstraram várias oscilações e, além disso, quando foram eluídos através da

coluna (tanto quando são constituintes do padrão; como quando são constituintes da amostra, como será visto posteriormente no capítulo de estudo das amostras), não são encontrados de maneira expressiva nos resultados. Por estes motivos, só consideraremos neste estudo o polifenol 1 e o carboidrato 1.

### **7.1.3 - Condições de Contorno do Padrão para as colunas C18, XAD-16 e Espuma**

Todas as frações recolhidas das colunas foram injetadas no sistema de HPLC, sendo analisado o perfil de cada cromatograma obtido. A partir destes, foram gerados dados que permitiram a escolha da coluna mais adequada ao isolamento de polifenóis dos carboidratos.

O perfil dos cromatogramas foi analisado à luz dos seguintes fundamentos:

- Os carboidratos (ou pseudo-alcalóides, cafeína e teobromina) são os dois maiores analitos, respectivamente, que se localizam antes do tempo de retenção de 5 minutos. <sup>104</sup>
- Os polifenóis compreendem a série de picos localizados entre os tempos de retenção de 10 e 40 minutos. <sup>104</sup>
- O grande interesse é obter o máximo de polifenóis e o mínimo de carboidratos possível.
- Os polifenóis são eluídos em sua maioria pelo metanol, não tendo ocorrido nenhuma eluição de polifenóis pela mistura.
- Os carboidratos são eluídos em sua maioria pela água. <sup>104</sup>
- Quanto menor a concentração dos carboidratos após a extração em fase sólida, maior será a pureza dos polifenóis envolvidos e menor será a dificuldade na avaliação, devido a problemas na escala.
- Estabelece-se a relação P/C como sendo a relação entre o maior pico do polifenol e o maior pico do carboidrato, expressos através de suas alturas, ou seja, de suas absorbâncias medidas nos cromatogramas.
- Em todos os cromatogramas, os polifenóis para serem considerados como relevantes devem apresentar percentuais derivados do índice

P/C maiores que 100% em relação ao padrão de referência, ou seja, aquele que ainda não foi adicionado à coluna; sendo rejeitados por completo todos àqueles cromatogramas apresentando separação abaixo de 60%, já que valores abaixo deste percentual são insignificantes e demonstram que não vale a pena investir no mesmo método.

Sendo assim, a partir das absorbâncias dos picos Pf1 e CH1 foi calculada a razão P/C para o padrão de chá verde, isto é, para o padrão íntegro, sem fracionamento em coluna, cujo perfil do cromatograma (*Fig.23*) mostrou que os picos de polifenol e de carboidrato são praticamente da mesma altura. O valor obtido para P/C foi igual a 1,02 e será equivalente a 100%. Este valor servirá como referência para o julgamento da ocorrência ou não do isolamento dos polifenóis, após percolação através das colunas.

Assim, para os casos onde houver a separação dos polifenóis dos carboidratos, o pico referente a polifenol será sempre maior que aquele de carboidrato e, portanto, a relação P/C será maior que 100%.

#### 7.1.4 - Avaliação da coluna C18

*Tabela 12 - Resultados relevantes encontrados para a coluna C18*

<b>Volume de Padrão (uL)</b>	<b>Ordem da Fração</b>	<b>Eluente</b>	<b>P/C</b>	<b>%</b>
50	A	H <sub>2</sub> O (5 mL)	2,29	224,82
100	A	H <sub>2</sub> O (20 mL)	1,47	144,9
400	A	H <sub>2</sub> O (20 mL)	1,01	98,9

Teoricamente, ocorreria separação nas alíquotas de 50 e 100 uL, de acordo com o percentual obtido a partir do índice P/C que estabelece a separação acima de 100%. Mas, isso jamais ocorreria na 1ª fração de água; visto que os polifenóis são eluídos em sua maioria pelo metanol e não pela água. Assim, podemos observar que houve, provavelmente, uma ultrapassagem de limite da capacidade da coluna e não uma separação efetiva. Os demais resultados foram desprezados porque apresentaram um percentual de separação abaixo de 60%.

### 7.1.5 - Avaliação da coluna XAD-16

*Tabela 13 - Resultados relevantes encontrados para a coluna XAD-16*

<b>Volume de Padrão (uL)</b>	<b>Ordem da Fração</b>	<b>Eluente</b>	<b>P/C</b>	<b>%</b>
50	A	MeOH (10 mL)	2,29	224,94
50	B	MeOH (10 mL)	0,87	85,29
100	A	MeOH (10 mL)	27,37	2692,16
100	A	MeOH (10 mL)	43,60	4288,39
100	A	MeOH (10 mL)	21,28	2092,81

Diante dos resultados apresentados, podemos dizer que houve significativa separação na fração A, de MeOH, para todas as replicatas. Observou-se também pico de polifenol no cromatograma da fração B, de metanol, entretanto, a relação P/C era menor que 1,02.

As Figuras 27, 28 e 29 ilustram os cromatogramas das frações em triplicatas da separação dos polifenóis em relação aos carboidratos. Estas são frações A de metanol, isto é, de 10 mL, quando foram percolados 100 uL da solução estoque do padrão *Polyphenon 60* pela coluna XAD-16. A Figura 30 mostra, nitidamente, o isolamento ocorrido no padrão *Polyphenon 60*, através da aproximação visual, *Zoom*, dos seus analitos: carboidrato 1, à esquerda; e do polifenol 1, à direita.

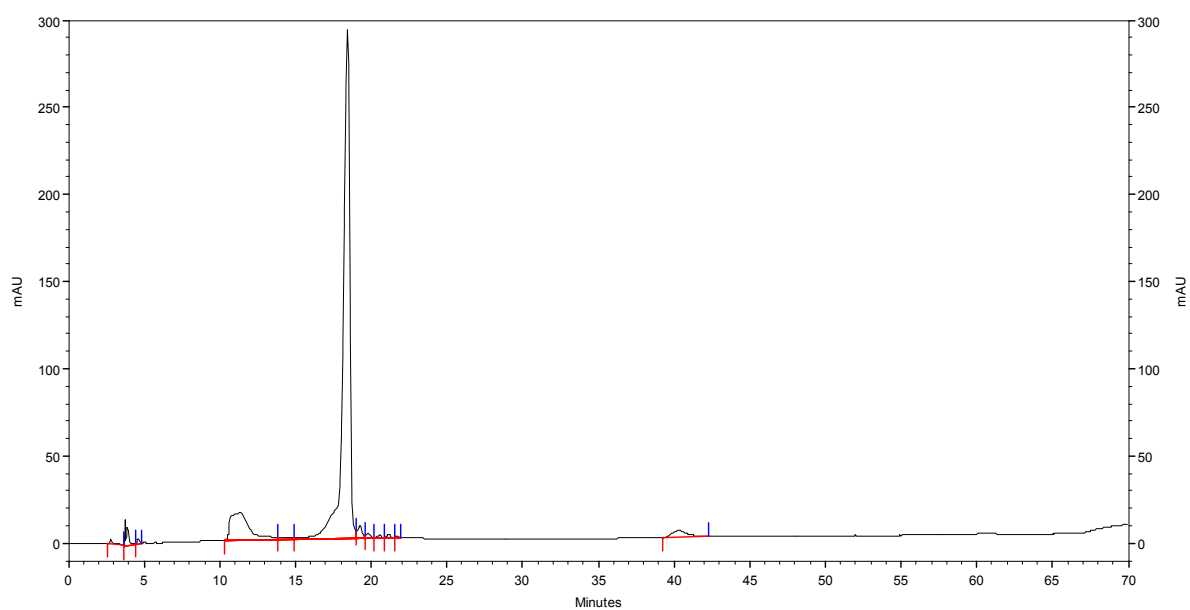


Figura 27 - Cromatograma do Padrão Polyphenon 60 após ter sido adicionado a coluna XAD-16.

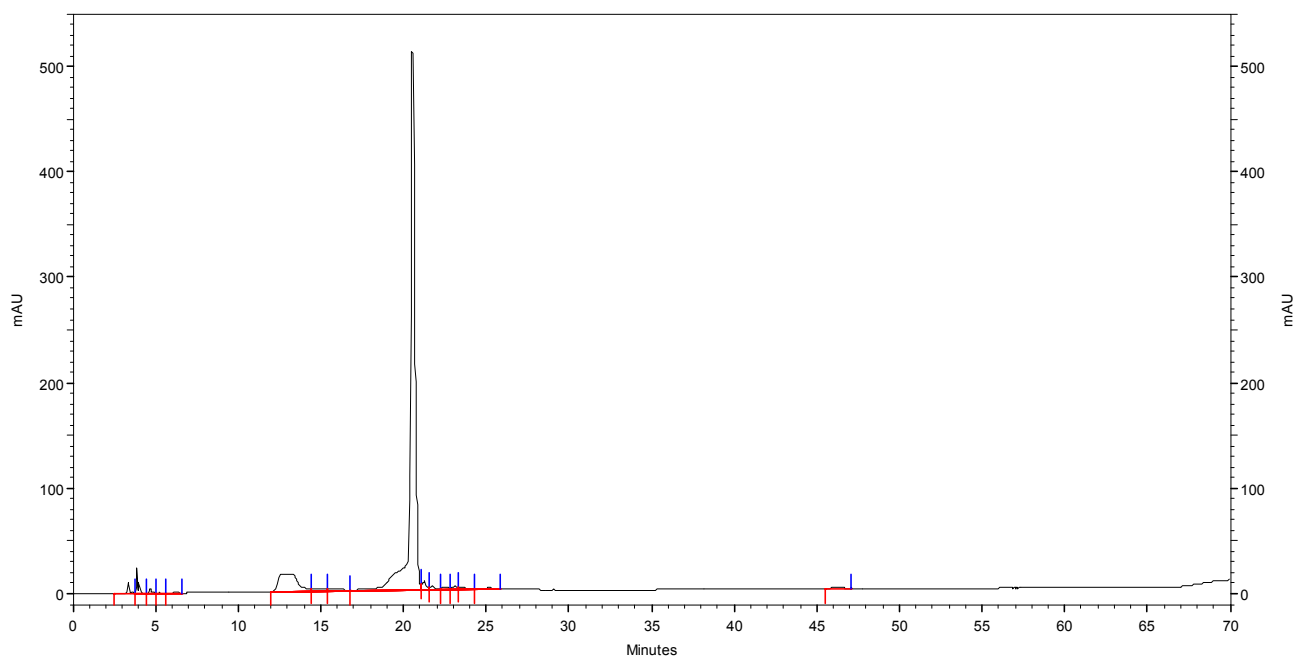


Figura 28 - Cromatograma do Padrão Polyphenon 60 após ter sido adicionado a coluna XAD-16 (duplicata).



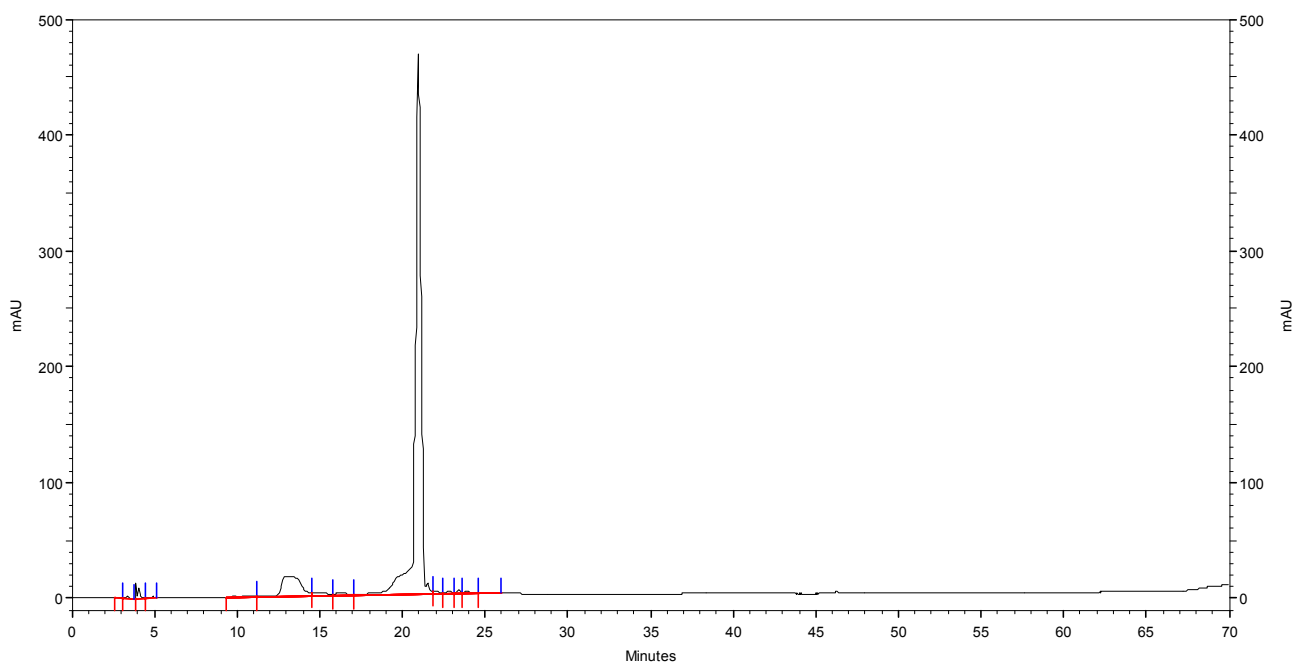


Figura 29 - Cromatograma do Padrão Polyphenon 60 após ter sido adicionado a coluna XAD-16 (triplicata).

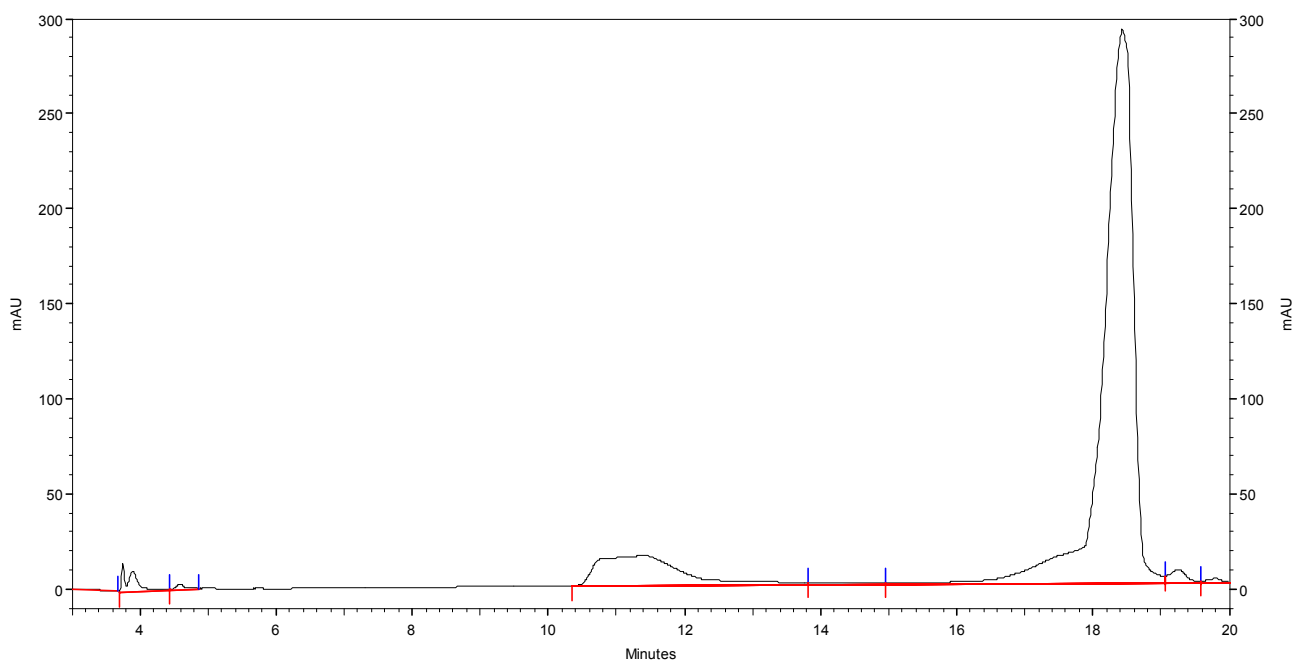


Figura 30 - Cromatograma do Padrão Polyphenon 60 após ter sido adicionado a coluna XAD-16 (Zoom do Carboidrato 1 e do Polifenol 1).

### 7.1.6 - Avaliação da coluna de espuma de poliuretano

*Tabela 14 - Resultados relevantes encontrados para a coluna de espuma*

Volume de Padrão (uL)	Ordem da Fração	Eluente	P/C	%
100	E	MeOH (10 mL)	0,69	67,34
100	G	MeOH (10 mL)	2,09	205,48

A separação ocorreu na fração G de MeOH, diferentemente da XAD-16 em que, nas triplicatas, ocorria sempre na fração A de MeOH. Além disto, para a coluna de espuma, não foi observada qualquer separação na duplicata e triplicata. O valor percentual de P/C calculado para a fração E não se mostrou interessante porque está abaixo de 100% e o restante dos resultados obtidos foram desprezados por apresentarem percentuais abaixo de 60% de separação.

### 7.1.7 - Seleção da melhor coluna de extração em fase sólida

De acordo com a literatura levantada durante a realização deste trabalho, o isolamento de polifenóis esteve sempre relacionado com a separação em sílica, seja em coluna C18, seja em coluna de sílica, propriamente dita. O uso de outras fases sólidas, em particular, o uso de resina e de espuma de poliuretano, não tem sido explorado para polifenóis. Neste particular, o que existe disponível na literatura são poucos trabalhos referentes ao estudo da retenção de fenóis.

O estudo de avaliação de técnicas para isolamento de polifenóis apresentado veio explorar a aplicação de duas fases sólidas, isto é, de uma resina polimérica e de espuma de poliuretano, ainda não utilizadas para o isolamento de polifenóis. A espuma e a sílica modificada com C18 não mostraram um perfil de eluição reproduzível e nem eficiência de separação que justificasse um investimento no método, enquanto que a resina se mostrou capaz de isolar, com eficiência, polifenóis de carboidratos, gerando frações muito ricas em polifenóis. Esta metodologia, uma vez otimizada, poderá ser implementada para atender técnicas que requeiram frações, nas quais, necessariamente, os polifenóis deverão estar livres de carboidratos, como no caso da espectrometria de massa.

Os dados gerados mostraram que dentre os meios avaliados, a coluna de resina XAD-16 se apresentou como o mais adequado ao isolamento dos polifenóis, tendo em vista os altos valores determinados para a razão P/C. O isolamento eficiente foi confirmado pelos resultados obtidos em triplicata. Considerando o valor de P/C igual a 27,37 (Tab. 13), é possível eluir uma fração da coluna de resina com um fator de concentração de 27 vezes, do teor de polifenol em relação ao teor de carboidrato. Este fator foi calculado em relação ao valor de P/C inicial que é de 1,02. Há de se considerar ainda que este resultado foi conseguido com um volume muito pequeno de metanol.

Por outro lado, os experimentos realizados com a espuma não apresentaram uma boa reprodutibilidade. A interação da amostra com a espuma sofreu variações que não puderam ser controladas, por falta de tempo hábil, e gerou dados de pouca consistência. São ainda necessários estudos exploratórios que permitam otimizar as condições operacionais.

Assim, houve uma coerência entre os resultados da coluna XAD-16, pois os maiores valores de P/C ocorreram sempre para a mesma fração eluída. Esta coerência deu subsídios para que a coluna de resina fosse escolhida dentre os outros meios avaliados.

## **7.2 - Estudo com amostras de chocolate**

Sob as mesmas condições experimentais definidas para os padrões, os extratos obtidos no pré-tratamento das amostras de chocolate, das marcas A e B, foram percolados pela coluna de resina XAD-16. Cada fração obtida na eluição das colunas foi injetada no sistema de HPLC gerando um cromatograma, cujo perfil foi analisado da mesma forma que para os padrões.

Os cromatogramas mostraram picos de altura muito pequena para polifenóis, o que significa que o extrato deveria ter sido pré-concentrado. Entretanto, se fosse usado o rotavapor para pré-concentrar, nas condições que possuíamos no laboratório, as amostras se degradariam e oxidariam pela dificuldade de evaporação

do azeótropo formado entre a acetona (70%), água (29,5%) e ácido acético (0,5%) e, principalmente, pelo longo tempo de exposição (mesmo em temperatura adequada de 40°C para os polifenóis), como chegou a acontecer experimentalmente. Então, preferiu-se estudar amostras com baixas concentrações de polifenóis do que correr o risco de perdê-las completamente. A água possui uma grande capacidade de eluir os carboidratos retidos na XAD-16; isso explica o fato dos percentuais relativos ao índice P/C, no caso das amostras, serem tão altos, mesmo com uma baixa concentração de polifenóis.

### 7.2.1 - Condições de Contorno das Amostras na Coluna XAD-16

O perfil dos cromatogramas foi analisado à luz dos seguintes fundamentos:

- Os carboidratos (ou pseudo-alcalóides, cafeína e teobromina) são os dois maiores analitos, respectivamente, que se localizam antes do tempo de retenção de 5 minutos<sup>104</sup>. Sendo que no caso das amostras, como elas estão imersas na mistura, o primeiro pico mais alto e de base mais larga corresponde à mistura e os dois picos seguintes seriam os carboidratos.
- Os polifenóis compreendem a série de picos localizados entre os tempos de retenção de 10 e 40 minutos.<sup>104</sup>
- O grande interesse é obter o máximo de polifenóis e o mínimo de carboidratos possível.
- Os polifenóis são eluídos em sua maioria pelo metanol, não tendo ocorrido nenhuma eluição de polifenóis pela mistura.
- Os carboidratos são eluídos em sua maioria pela água.<sup>104</sup>
- Em uma separação efetiva pelo HPLC, quanto menor a concentração dos carboidratos após a extração em fase sólida através da coluna XAD-16, menor a probabilidade de interferência com os polifenóis, melhorando a pureza dos polifenóis envolvidos e minimizando problemas de escala.

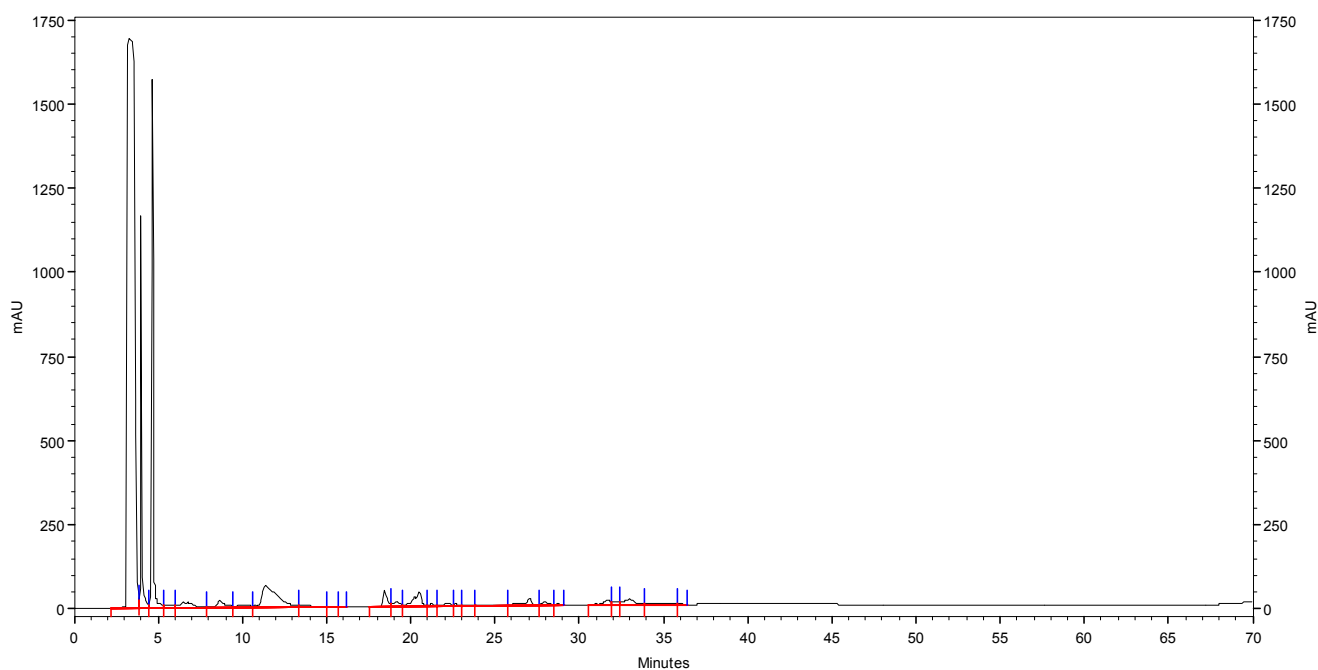
- Estabelece-se a relação P/C como sendo a relação entre o maior pico do polifenol e o maior pico do carboidrato, expressos através de suas alturas, ou seja, de suas absorvâncias lidas nos cromatogramas.
- Em todos os cromatogramas, os polifenóis para serem considerados como relevantes devem apresentar percentuais derivados do índice P/C maiores que 100% em relação ao padrão de referência, ou seja, aquele que ainda não foi adicionado à coluna; sendo rejeitados por completo todos àqueles cromatogramas apresentando separação abaixo de 60%, já que valores abaixo deste percentual são insignificantes e demonstram que não vale a pena investir no mesmo método.
- Estabelece-se, então, o índice de separação P/C das amostras de referência das duas marcas A e B feitas em triplicatas e equivalentes a 100 %: a partir das absorvâncias dos picos Pf1 e CH1 foi calculada a razão P/C para as amostras de chocolate meio amargo, que foram assumidas como *amostras de referência*, ou seja, a partir do extrato íntegro obtido no pré-tratamento da amostra, sem fracionamento em coluna. Os valores obtidos para P/C nas amostras de referência serão equivalentes a 100% (Tab. 15).

*Tabela 15 - Relação P/C das amostras de referência das marcas A e B equivalentes a 100%.*

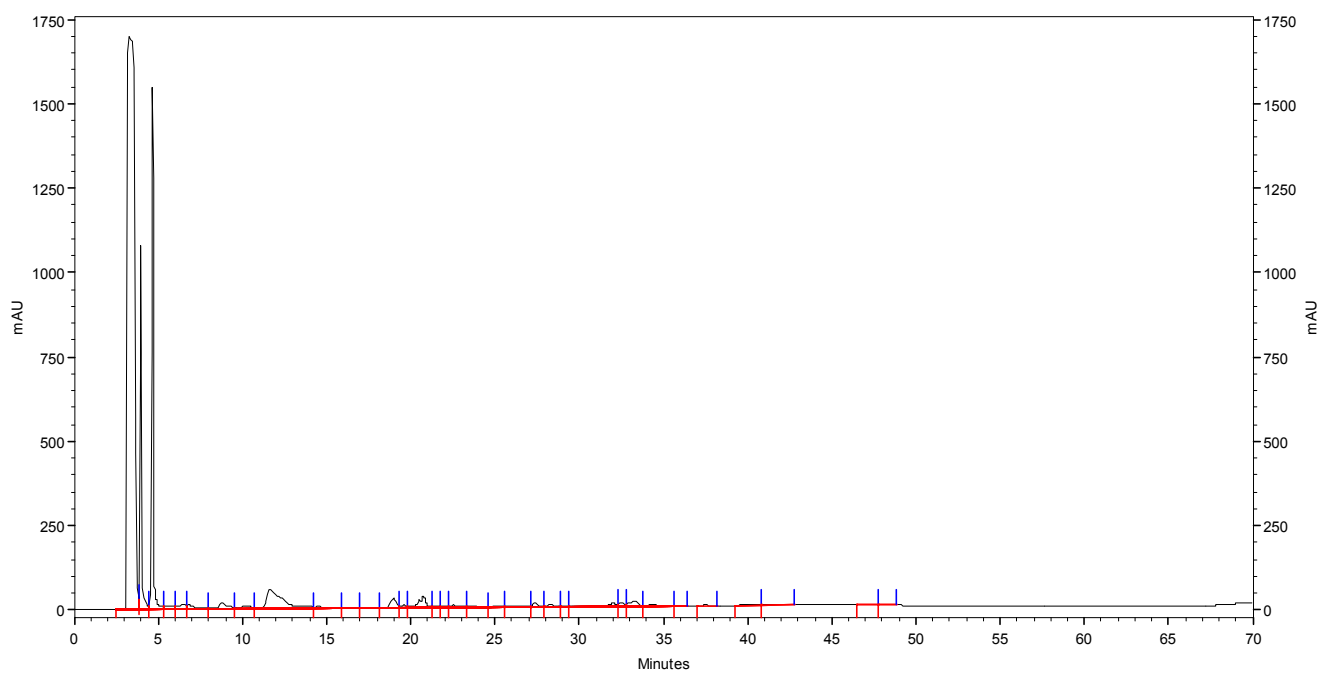
<b>Amostras de Chocolate meio amargo</b>						
	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>
<b>P/C</b>	0,04	0,04	0,03	0,03	0,26	0,03
<b>%</b>	100	100	100	100	100	100

Assim, para os casos onde houver a separação dos polifenóis dos carboidratos, a relação P/C será maior que 100%.

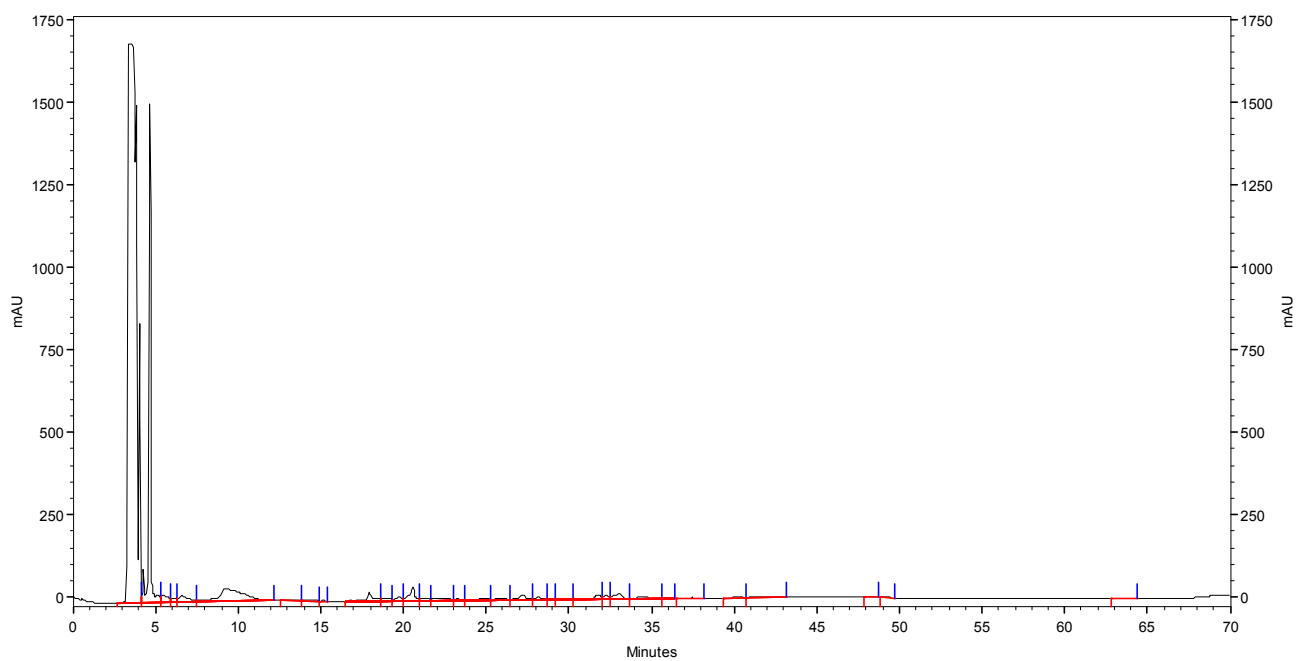
As *Figuras 31 a 36* mostram os cromatogramas obtidos para as amostras de chocolate meio amargo, das marcas A e B, em triplicata (A1, A2, A3 e B1, B2 e B3), sem fracionamento através da coluna. Destes cromatogramas foram calculados os valores de P/C.



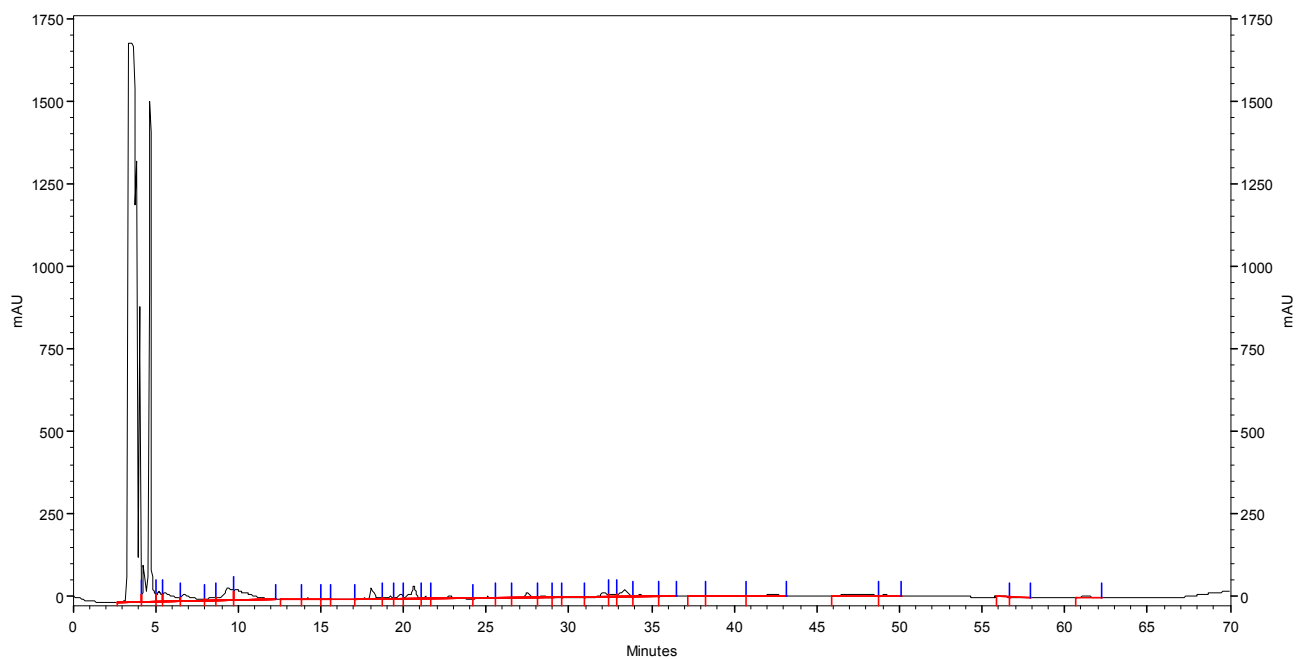
*Figura 31 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca A1.*



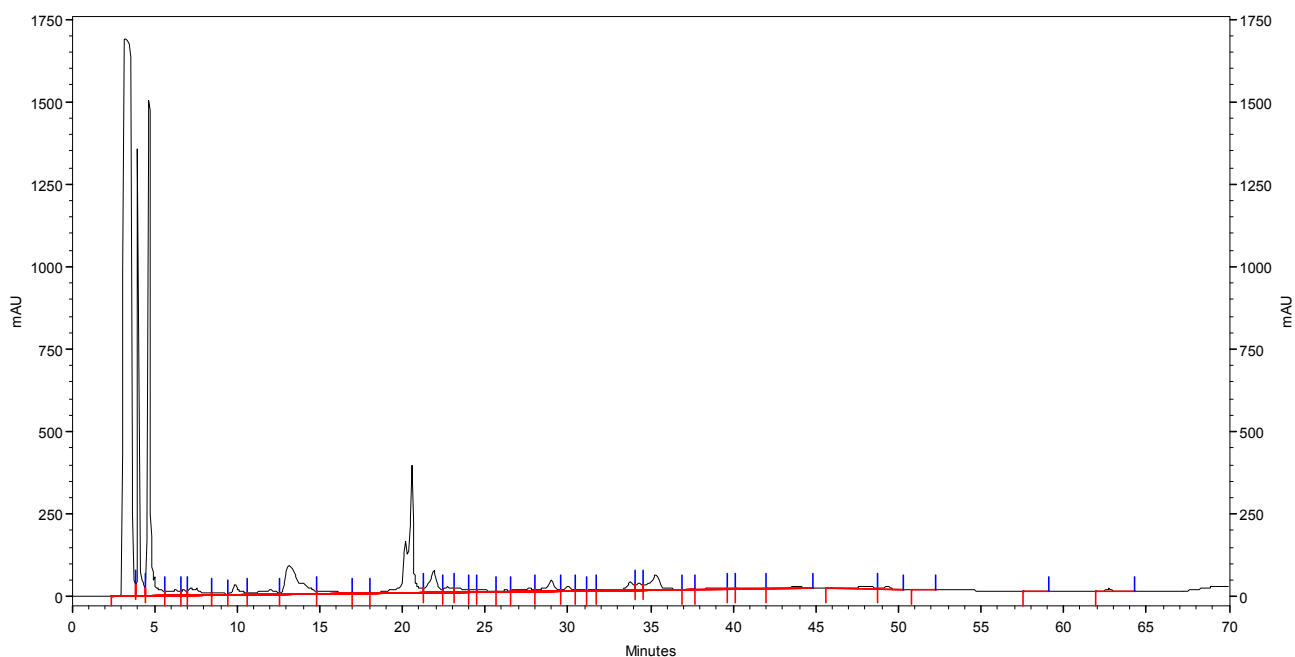
*Figura 32 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca A2.*



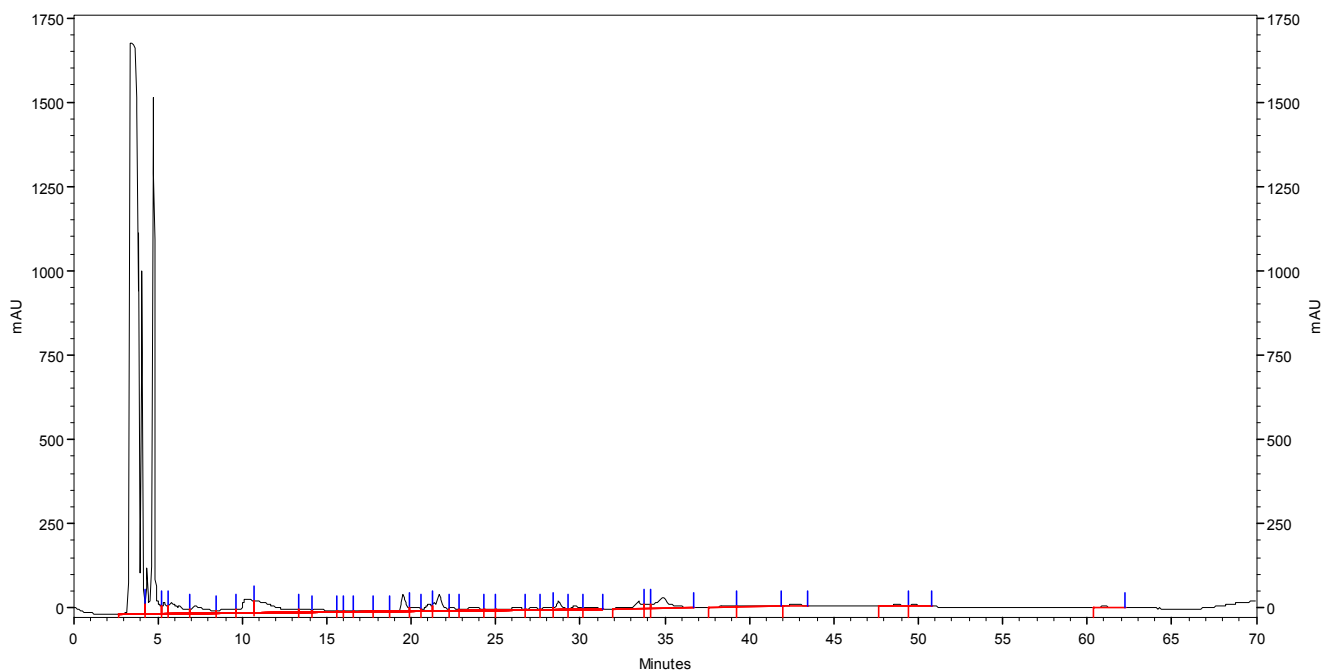
*Figura 33 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca A3.*



*Figura 34 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca B1.*



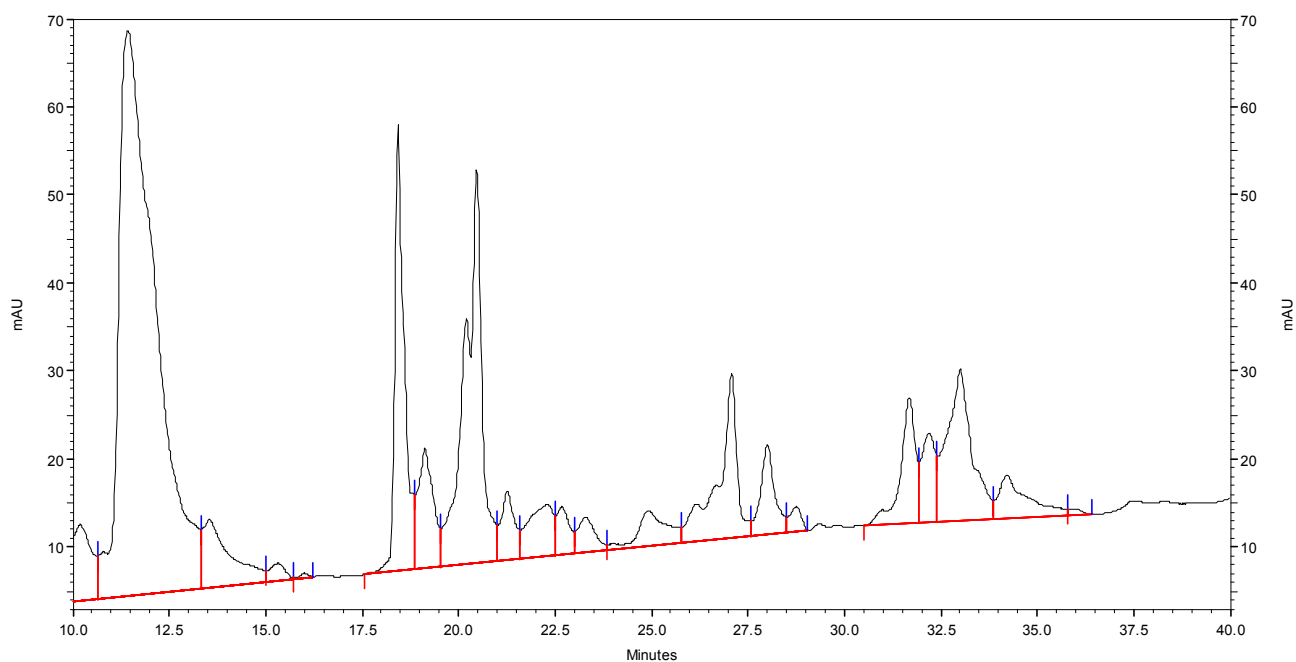
*Figura 35 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca B2.*



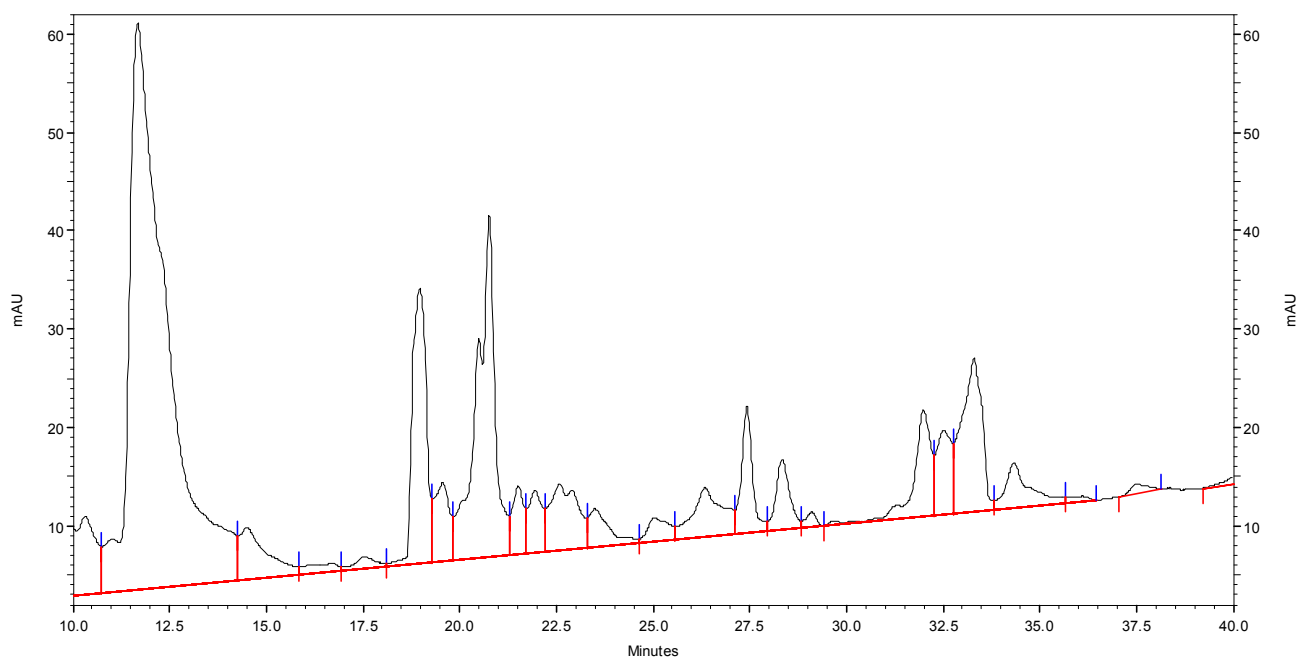
*Figura 36 - Cromatograma da amostra de chocolate meio amargo da marca B3.*

As Figuras 37 a 42 mostram os mesmos cromatogramas obtidos anteriormente; só que desta vez isentos dos picos de carboidratos, apenas destacando os polifenóis do chocolate meio amargo, das marcas A e B, em triplicata (A1, A2, A3 e B1, B2 e B3), sem fracionamento através da coluna.

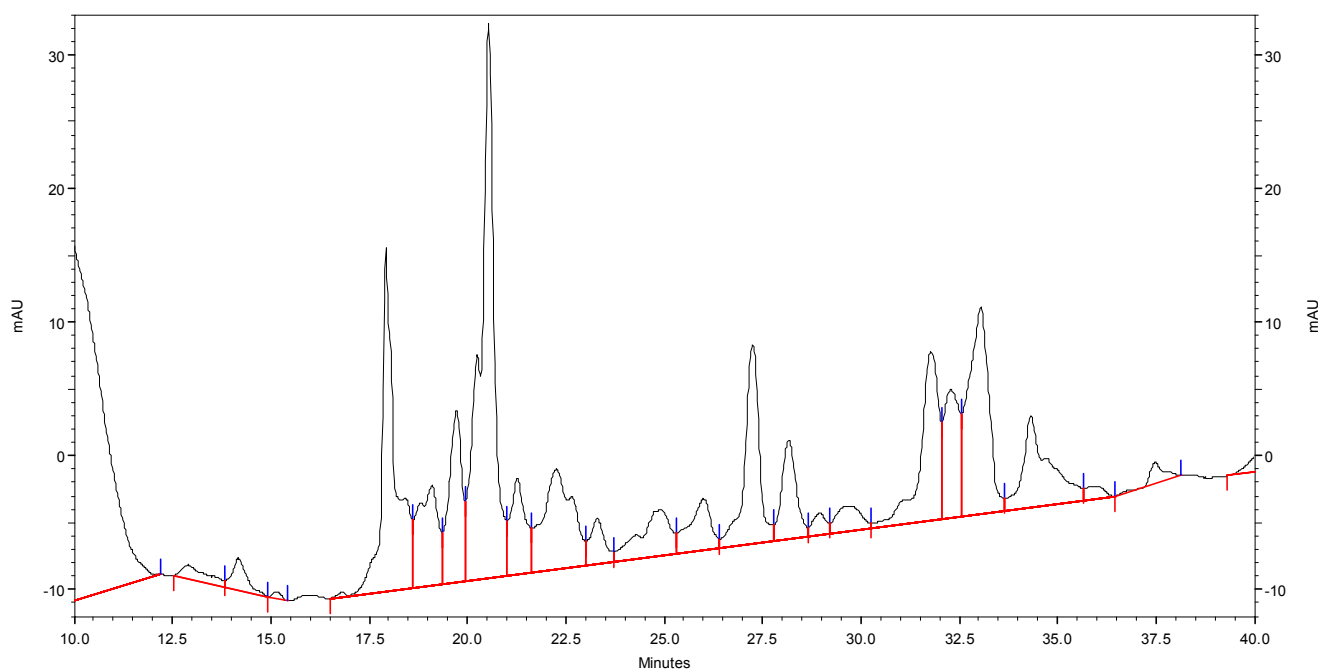




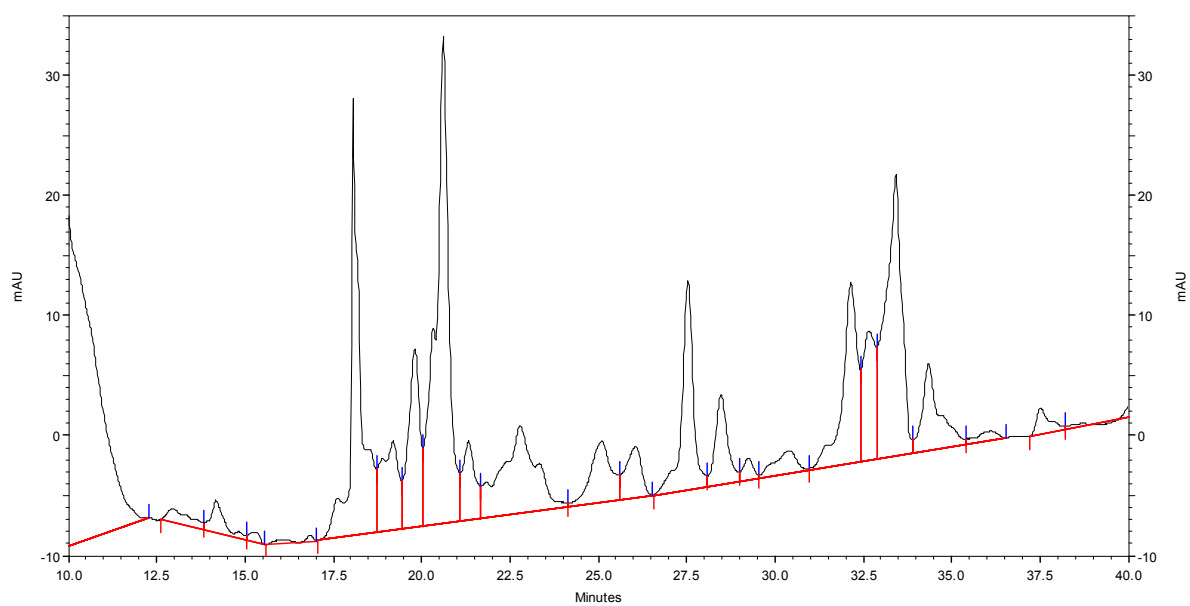
*Figura 37 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca A1, sem os carboidratos.*



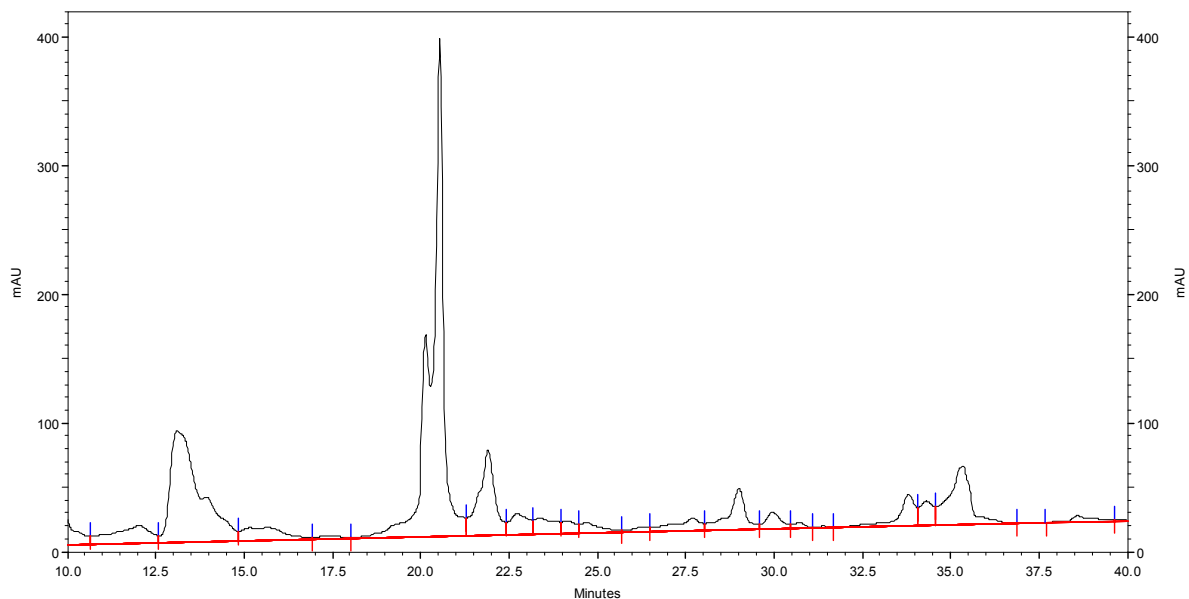
*Figura 38 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca A2, sem os carboidratos.*



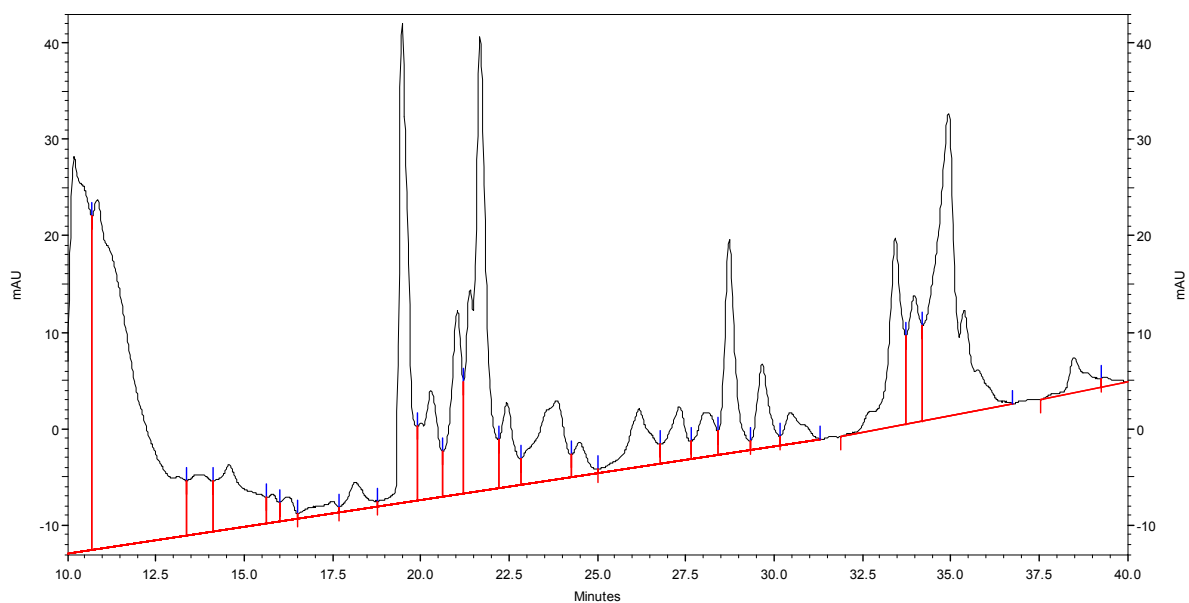
*Figura 39 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca A3, sem os carboidratos.*



*Figura 40 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca B1, sem os carboidratos.*



*Figura 41 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca B2, sem os carboidratos.*



*Figura 42 - Polifenóis da amostra de chocolate meio amargo da marca B3, sem os carboidratos.*

O perfil dos cromatogramas mostrou que os extratos íntegros das amostras de chocolate possuem matriz bastante complexa pois apresentou variados picos numa ampla faixa de tempo de retenção. Qualitativamente, os cromatogramas se equivalem salvo aquele referente a amostra B2, onde surgiu um pico de polifenol de intensidade, em relação ao mesmo pico nos demais cromatogramas.

Os cromatogramas dos extratos obtidos no pré-tratamento da amostra mostraram que tal procedimento é adequado para uma avaliação qualitativa de polifenóis. Hammerstone *et al.*, 1999<sup>104</sup> também usou o mesmo procedimento para avaliar qualitativamente as procianidinas em cacau.

O fato de ter sido obtido extrato de composição quantitativa diferente para amostra em replicata não representa uma desvantagem para o propósito deste trabalho, pois os cromatogramas destes extratos mostram com clareza a relação entre polifenol e carboidrato. Este parâmetro é que será usado para monitorar a eficiência de enriquecimento das frações em relação ao teor de polifenol.

## 7.2.2 - Avaliação da marca A

Tabela 16 - Resultados relevantes encontrados para a amostra A

Amostra	Volume (uL)	Fração H <sub>2</sub> O (mL)	Ordem da Fração	Eluente	P/C	%
A1	200	10	F	MeOH (10 mL)	1,04	2536,34
A1	5000	10	A	H <sub>2</sub> O (10 mL)	0,35	859,75
A1	5000	10	C	H <sub>2</sub> O (10 mL)	0,19	460,8
A1	5000	10	D	H <sub>2</sub> O (10 mL)	0,05	110,72
A1	5000	10	G	H <sub>2</sub> O (10 mL)	0,04	94,99
A1	5000	10	H	H <sub>2</sub> O (10 mL)	1,85	4516,43
A1	5000	10	A	MeOH (10 mL)	0,57	1400,13
A1	5000	10	E	MeOH (10 mL)	0,25	604,93
A1	5000	10	F	MeOH (10 mL)	0,7	1721,38
A1	5000	20	B	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,47	1157,25
A1	5000	20	C	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,22	539,38
A1	5000	20	D	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,09	212,6
A1	5000	20	E	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,36	885,54
A1	5000	20	F	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,25	622,26
A1	5000	20	G	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,32	787,8
A1	5000	20	H	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,09	230,88
A1	5000	20	A	MeOH (10 mL)	0,11	271,37
A1	5000	20	B	MeOH (10 mL)	0,03	66,48
A1	5000	20	C	MeOH (10 mL)	0,04	102,08
A1	5000	20	D	MeOH (10 mL)	0,58	1429,5
A1	5000	20	E	MeOH (10 mL)	4,32	10579,24
A1	5000	20	F	MeOH (10 mL)	0,52	1272,39
A1	5000	20	G	MeOH (10 mL)	0,62	1526,21
A1	5000	20	H	MeOH (10 mL)	0,19	464,79
A2	5000	20	A	MeOH (10 mL)	0,17	448,22
A2	5000	20	E	MeOH (10 mL)	0,42	1121,23
A2	5000	20	F	MeOH (10 mL)	0,27	729,51
A3	5000	10	H	H <sub>2</sub> O (10 mL)	0,22	785,05
A3	5000	10	A	MeOH (10 mL)	0,92	3341,21
A3	5000	10	E	MeOH (10 mL)	0,46	1669,54
A3	5000	10	F	MeOH (10 mL)	0,56	2045,21
A3	5000	20	A	MeOH (10 mL)	0,19	691,07
A3	5000	20	E	MeOH (10 mL)	0,53	1930,71
A3	5000	20	F	MeOH (10 mL)	0,57	2067,95

- Houve uma ótima separação na fração F de metanol, mas que não foi reproduzido nem na fração de 200 uL da duplicata (A2) , nem na fração de 200 uL da triplicata (A3).

- Foram separadas as frações F, A e E de metanol, em ordem decrescente; correspondentes a amostra A1 de 5 mL e frações de água contendo 10 mL.

- Na tentativa de aumentar a eficiência de separação, aumentou-se o volume das frações de água com a intenção de eluir maior quantidade de carboidrato, nas frações iniciais e, assim, proporcionar um maior destaque aos polifenóis. Realmente, com a mudança deste parâmetro experimental, chegamos a um valor de 10579,24 % de separação na fração E de metanol; correspondentes a amostra A1 de 5 mL e frações de água contendo 20 mL.
  
- Observando-se os valores de P/C para as frações aquosas iniciais de 10 e 20 mL, fica claro que não houve interação entre os polifenóis e a resina. Entretanto, os dados já mostram que um volume em torno de 60 mL de metanol é adequado para alcançar a maior eficiência de separação.
  
- Alíquotas menores foram percoladas, mas para a amostra A2 só houve separação para um volume de 5 mL de amostra. Separação mais significativa ocorreu para a fração E, o que significa o gasto de 50 mL de metanol.
  
- Destacam-se as frações A, F e, em seguida, E de metanol; no que diz respeito a separações significativas. Ocorreu reprodutibilidade em duplicata nas amostras A1 e A3 de 5 mL, com frações de água contendo 10 mL; para as frações A, E e F de MeOH.
  
- O aumento do volume de água como eluente apresentou vantagens para a relação P/C e se manteve a tendência para se obter frações com maiores níveis de polifenóis em relação ao carboidrato, usando-se em torno de 60 mL de metanol. Além disso, houve reprodutibilidade nas triplicatas A1, A2 e A3, das frações A, E e F de MeOH para volume de amostra de 5 mL, com frações de 20 mL de água.

### 7.2.3 - Avaliação da marca B

*Tabela 17 - Resultados relevantes encontrados para a amostra B*

Amostra	Volume (uL)	Fração H <sub>2</sub> O (mL)	Ordem da Fração	Eluente	P/C	%
B1	200	10	A	MeOH (10 mL)	0,15	547,04
B1	200	10	F	MeOH (10 mL)	2,17	8092,78
B1	500	10	F	MeOH (10 mL)	3,7	13816,03
B1	1000	10	A	MeOH (10 mL)	0,18	683,81
B1	1000	10	C	MeOH (10 mL)	0,09	351,2
B1	5000	20	B	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,21	795,92
B1	5000	20	C	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,35	1295,86
B1	5000	20	D	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,23	841,7
B1	5000	20	E	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,57	2112,69
B1	5000	20	F	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,39	1451,2
B1	5000	20	G	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,39	1447,6
B1	5000	20	H	H <sub>2</sub> O (20 mL)	0,89	3338,44
B1	5000	20	A	MeOH (10 mL)	0,36	1357,1
B1	5000	20	B	MeOH (10 mL)	0,13	477,27
B1	5000	20	C	MeOH (10 mL)	0,15	560,35
B1	5000	20	D	MeOH (10 mL)	0,47	1761,37
B1	5000	20	E	MeOH (10 mL)	0,49	1836,02
B1	5000	20	F	MeOH (10 mL)	2,61	9771,91
B1	5000	20	G	MeOH (10 mL)	0,46	1725,67
B1	5000	20	H	MeOH (10 mL)	0,54	2003,67
B2	200	10	F	MeOH (10 mL)	0,28	107,33
B2	500	10	A	MeOH (10 mL)	0,32	123,62
B2	5000	20	A	MeOH (10 mL)	0,36	138,26
B2	5000	20	E	MeOH (10 mL)	0,52	202,66
B3	5000	20	A	MeOH (10 mL)	0,32	979,41
B3	5000	20	E	MeOH (10 mL)	0,71	2195,65
B3	5000	20	F	MeOH (10 mL)	0,22	678,17

- Ótima separação ocorrida na duplicata das frações F de metanol das amostras de B1 e de B2, 200 uL e frações de água de 10 mL.

- Alto percentual de separação para a amostra B1 de 500 uL, com frações de água de 10 mL; apesar do resultado não ter se reproduzido para as demais amostras B2 e B3 correspondentes.

- Ocorreu separação nas frações A e C de metanol da amostra B1 de 1 mL, com frações de água de 10 mL.

- Encontramos em 5 mL, com frações de água de 20 mL: triplicata nas frações A e E de metanol para B1, B2 e B3; além de duplicata na fração F de metanol em B1 e B3.
- Ao invés de ter ocorrido separação na fração F de metanol como foi em B1, dessa vez foi na fração A de metanol para o B2; em 500 uL, com frações de água de 10 mL.

#### 7.2.4 - Comparação entre as marcas A e B

É importante notar que os valores de P/C confirmam que não houve interação dos polifenóis com a resina durante a eluição com água. Porém, a separação dos polifenóis ocorreu em diversas frações de metanol.

Os cromatogramas obtidos para os extratos das amostras A e B, em triplicatas, deixaram claro que há uma tendência para eluição de polifenóis com metanol utilizando-se um volume em torno de 60 mL. Uma vez otimizada, esta eluição deverá permitir o fracionamento da amostra, isolando com eficiência, os polifenóis de carboidratos.

O perfil dos cromatogramas das Figuras 37 a 42 permitiu traçar uma relação qualitativa entre as amostras A e B. Os principais picos de polifenóis aparecem com repetibilidade nos cromatogramas, contudo, não reproduzem em sensibilidade para uma mesma amostra. Entretanto, cabe salientar que Hammerstone *et al.*, 1999<sup>104</sup> detectou, por HPLC/PDA e por HPLC/MS, picos de polifenóis, isto é, de monômeros de procianidinas, em extrato obtido de sementes de cacau produzido no Brasil e comparando-se o cromatograma obtido para tal extrato com aqueles obtidos para as triplicatas das amostras de chocolate A e B, picos com tempo de retenção muito similar foram obtidos. Não houve diferenciação entre ambas as marcas avaliadas.

Relacionando as marcas A e B, podemos dizer que o volume mais adequado para as análises das amostras de chocolate, ou seja, o volume onde se consegue o maior percentual de isolamento seria o de 5 mL, nas frações de água contendo 10 ou 20 mL e com a reprodutibilidade do método marcada pelas frações A, E e F



contendo 10 mL de MeOH cada uma; onde realmente ocorreram as separações em sua grande maioria.

Em relação ao isolamento de polifenóis, pode-se afirmar que o perfil de eluição encontrado para o chocolate da marca A foi o mesmo para a marca B, o que variou foi a eficiência da separação.

## 8 - Conclusão

- Os resultados alcançados para a resina mostraram um perfil de eluição reprodutivo, tanto para o padrão, quanto para as amostras de chocolate. A resina XAD-16 gera fração muito mais rica em polifenol que a espuma de poliuretano ou a sílica modificada com C18.
- Além de se mostrar bastante promissora quanto ao isolamento de polifenóis, a resina é vantajosa por permitir procedimentos experimentais rápidos e que podem ser feitos sob ação da gravidade, evitando-se o uso de bomba peristáltica; é um material regenerável, diminuindo-se, assim, o custo operacional.
- A espectrofotometria mostrou-se como um método interessante na avaliação da estabilidade do padrão de chá *Polyphenon 60*, ao longo do tempo; mas, não é apropriada para determinação quantitativa, pois não houve cumprimento da “Lei de Beer”.
- As espécies denominadas de polifenol 1 e carboidrato 1 foram as que apresentaram melhor estabilidade com o tempo; já, em contrapartida, aquelas denominadas de polifenol 2 e carboidrato 2 demonstraram várias oscilações e, além disso, quando eluídas das colunas, tanto no caso do padrão como no caso da amostra, não foram encontrados de maneira expressiva.

- O estudo com padrão de chá verde mostrou que, para matriz menos complexa, a coluna de resina XAD-16 gerou resultados eficientes, com rapidez e com reprodutibilidade, enquanto que o mesmo não foi observado para a coluna de espuma. Tais qualidades deixa a coluna de resina em vantagem também sobre a coluna C18 que é pouco convidativa para trabalhos de rotina.
- O metanol se mostrou bastante adequado para a eluição de polifenóis da coluna de resina XAD-16, independente da complexidade da matriz. Com apenas 20 mL de metanol foi possível eluir os polifenóis presentes nas alíquotas do padrão que foram percoladas pela resina. O perfil de eluição com metanol mostrou uma significativa reprodutibilidade confirmada através dos procedimentos em triplicata.
- As amostras de chocolate, que foram objetos deste trabalho, apresentaram um teor de carboidratos equivalente aquele encontrado na solução estoque do padrão *Polyphenon 60*, enquanto que o teor de polifenóis na mesma amostra foi muito menor, gerando picos de baixa absorbância.
- Não foi possível pré-concentrar a amostra por rotavapor, devido à formação de azeótropo pelos componentes da mistura, os quais inviabilizava qualquer tentativa de evaporação dos solventes; sem contar com a degradação e oxidação totais dos polifenóis, devido ao longo tempo de exposição ao calor, mesmo em temperatura adequada (40°C). Além disso, as condições experimentais citadas <sup>104</sup> para a evaporação eram muito diferentes das nossas; pois possuíam bomba de vácuo mais apropriada e adaptações no condensador do rotavapor de modo a ser resfriado a 5°C e, ao mesmo tempo, o sistema era submerso em nitrogênio líquido. Entretanto, neste trabalho, um procedimento experimental foi desenvolvido, com sucesso, mesmo excluindo-se a etapa de pré-concentração por evaporação.

## 9 - Referências Bibliográficas

- 1 CAMPOS, C. T. de; BENEDET, H. D. Aceitabilidade de bombons (recheio - sabor passas ao rum) adicionados de proteína de soja. *Bol. SBCTA*, v.28, n. 2, p. 113-119, 1994.
- 2 KEEN, C. L. Chocolate: food as medicine/medicine as food. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 20, n. 90005, p.436S-439S, 2001.
- 3 SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.
- 4 SAITO, M. *et al.* Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, p. 1460-1464, 1998.
- 5 KÜHNNAU, J. The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, v. 24, p. 117-191, 1976.
- 6 SINGLETON, V. L. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv. Food Res.*, v. 27, p. 149-242, 1981.
- 7 BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- 8 WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Res. Intern.*, v. 33, p. 449-459, 2000.
- 9 BLOCH, A.; THOMSON, C.A. Position of the american dietetic association: phytochemicals and functional foods. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 95, p. 493, 1995.
- 10 ZUMBÉ, A. Polyphenols in cocoa: are there health benefits? *BNF Nutr. Bull.*, v. 23, p. 94-102, 1998.
- 11 KEALEY *et al.* *Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses.* Mars Incorporated, USA. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 98/09533.
- 12 WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Intern.*, v. 33, p. 423-447, 2000.
- 13 MURPHY, K. J. *et al.* Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (Theobroma cacao) inhibit platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.77, n.6, p.1466-1473, 2003.
- 14 WEISBURGER, J. H. Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Exp. Biol. Med.*, v.226, n.10, p. 891-897, 2001.
- 15 DONOVAN, J.L. Flavonoids and the risk of cardiovascular disease in women. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 79, n.3, p. 522-523, 2004.
- 16 BEECHER, G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.*, v. 133, n.10, p. 3248S-3254S, 2003.
- 17 GU, L. *et al.* Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.*, v.134, p. 613-617, 2004.
- 18 OSAKABE, N. *et al.* Ingestion of proanthocyanidins derived from cacao inhibits Diabetes-Induced cataract formation in rats. *Exp. Biol. Med.*, v.229, p. 33-39, 2004.
- 19 TAUBERT, D. *et al.* Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *JAMA*, v.290, n.8, p.1029-1030, 2003.
- 20 RIOS, L.Y. *et al.* Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 77, n.4, p.912-918, 2003.
- 21 KEEN, C. L. Chocolate: food as medicine/ medicine as food. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 20, n.90005, p.436S-439S, 2001.

- 22 MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.79, p.727-747, 2004.
- 23 ENGLER, M. B. *et al.* Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J. Am. Coll. Nutr.*, v.23, n.3, p.197-204, 2004.
- 24 NESTEL, P.J. How good is chocolate? *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 74, n. 5, p.563-564, 2001.
- 25 REYES, F. G. *et al.* Recomendações gerais para os trabalhos de elaboração ou revisão de padrões de identidade e qualidade. *Cadernos de Nutrição. Soc. Bras. Alim. Nutr.*, v. 10, p.1-7, 1995.
- 26 PORTER, L. J. *Flavans and proanthocyanidins*. In: HARBORNE, J.B. *The flavanoids, advances in research since 1980*. New York: Chapman and Hall, 1988.
- 27 AUGER, C. *et al.* Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food Res. Intern.*, v. 37, p.233-245, 2004.
- 28 HARBORNE, J. B. *Methods in plant biochemistry*. I: plant phenolics. London: Academic Press, 1989.
- 29 SIMÕES, C.M.O. *et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.
- 30 HARBORNE, J. B. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London: Chapman and Hall, 1993.
- 31 HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. *The flavonoids: advances in research*. London: Chapman and Hall, 1982.
- 32 MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 35, p.341-371, 1995.
- 33 PORTER, L.W. *Tannins*. In: HARBORNE, J.B. *Methods in plant biochemistry*. I: plant phenolics. London: Academic Press, p.389-419, 1989.
- 34 WÜRSCH, P.; DEL VEDOVO, S.; ROSSET, J.; SMILEY, M. The tannin granules from ripe carob pod. *Lebens Wiss. Technol.*, v.17, p.351-354, 1984.
- 35 HERRMANN, H. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm Unters Forsch*, v.186, p.1-5, 1988.
- 36 PELEG, H.; NAIM, M.; ROUSEFF, R.L.; ZEHAVI, U. Distribution of bound and free phenolic acid in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J. Sci. Food Agric.*, v.57, p.417-426, 1991.
- HO, C.T.; LEE, C.Y.; HUANG, M.T. Phenolic Compounds in food and their effects on health. I: analysis, occurrence and chemistry. ACS Symposium Series 506. Washington, DC. *Am. Chem. Soc.*, 1992.
- 37 SHAHIDI, F.; NACZK, M. *Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications*. Lancaster, PA, Technomic Publishing Co, 1995.
- 38 BRAVO, L. *et al.* Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract, effect on colonic fermentation and faecal output. *Brit. J. Nutr.*, v.71, p.933-946, 1994.
- 39 RICHELLE, M. *et al.* Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 53, p.22-26, 1999.
- 40 WATERHOUSE, A.L. *et al.* Antioxidants in chocolate. *Lancet*, v.348, p.834, 1996.
- 41 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzymol.*, v.186, p.1, 1990.
- 42 SCHRECK, R. *et al.* Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-Kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, v. 10, p.2247,1991.
- 43 JACOB, R.A.; BURRI, B.J. Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.63, p.985S, 1996.
- 44 HERTOOG, M.G.L. *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, v.342, p.1007, 1993.
- 45 CLINTON, S. K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.*, v.56, n.2, p.35-51, 1998.
- 46 SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.32, p.67-103, 1992.
- 47 RATTY, A.K.; DAS, N.P. Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, v. 39, p.69-79, 1998.
- 48 BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Meth. Enzymol.*, v.186, p.343-355, 1990.
- 49 MANACH, C.; REGERAT, F.; TEXIER, O. *et al.* Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr. Res.*, v.16, p.517-544, 1996.
- 50

- 51 FUHRMAN, B.; LAVY, A.; AVIRAM, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and LDL to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.61, p.549-554, 1995.
- 52 AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.L.; BRODSKII, A.V. *et al.* Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, v.38, p.1763-1769, 1989.
- 53 HAGERMAN, A.E.; RIEDL, K.M.; JONES, G.A. *et al.* High-molecular-weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, v.46, p.1887-1892, 1998.
- 54 KANNER, J.; FRANKEL, E.; GRANIT, R. *et al.* Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, p.64-69, 1994.
- 55 FRANKEL, E.N.; KANNER, J.; GERMAN, I.B. *et al.* Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, v.341, p.454-457, 1993.
- 56 BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*, v.28, p.25-30, 1995.
- 57 SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, v.76, p.270-276, 1998.
- 58 VAN HET HOF, K.H.; KIVITS, G.A.A.; WESTTRATE, J.A.; TIJBURG, L.B.M. Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v.52, p.356-359, 1998.
- 59 LEE, M.J.; WANG, Z.Y.; LI, H. *et al.* Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Canc. Epidemiol. Biomark. Prev.*, v.4, p.393-399, 1995.
- 60 HERTOOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H. *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, v.342, p.1007-1011, 1993.
- 61 SERAFINI, M.; GHISELLI, A.; FERRO-LUZZI, A. Red wine, tea and antioxidants. *Lancet*, v.344, p.626, 1994.
- 62 GENSLER, H.L.; GERRISH, K.E.; WILLIAMS, T. *et al.* Prevention of photocarcinogenesis and UV-induced immunosuppression in mice by topical tannic acid. *Nutr. Canc.*, v.22, p.121-130, 1994.
- 63 CONSTANTINOU, A.; STONER, G.D.; MEHTA, R. *et al.* The dietary anticancer agent ellagic acid is a potent inhibitor of DNA topoisomerases in vitro. *Nutr. Canc.*, v.23, p.121-130, 1995.
- 64 NOROOZI, M.; ANGERSON, W.J.; LEAN, M.E.J. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.67, p.1210-1218, 1998.
- 65 BROWN, J.P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat. Res.*, v.75, p.243-277, 1980.
- 66 MARKHAM, K.R.; BLOOR, S.J. *Analysis and identification of flavonoids in practice.* In: RICE-EVANS, C.A.; PACKER, L. *Flavonoids in health and disease.* New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc., p.1-33, 1998.
- 67 LEE, I.I.S.; WIDMER, B.W. *Phenolic compounds.* In: NOLLET, L.M.L. *Handbook of food analysis,* Basel, New York, Hong Kong: Marcel Dekker Inc., v.1, p.821-894, 1996.
- 68 MAKKAR, H.P.S. Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. *J. Agric. Food Chem.*, v.37, n.4, p.1197-1202, 1989.
- 69 MCMURROUGH, I.; BYRNE, J.R. *HPLC analysis of bittering substances, phenolic compounds and various compounds of alcoholic beverages.* In: NOLLET, L.M.L. *Food analysis by HPLC.* New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc., p.579-641, 1992.
- 70 THURMAN, E.M.; MILLS, M.S. *Solid-phase Extraction: principles and practice.* *Chemic. Anal.*, Wiley-interscience publication, v.147, 1998.
- 71 FRITZ, J.S. *Analytical solid-phase extraction.* John Wiley-VCH, 1999.
- 72 VAN HOME, K.C. *Sorbent Extraction Technology.* *Analitichem. Internat.*, Harbor City, 1985.
- 73 SKOOG, D.A. *Principles of instrumental analysis.* 3ª. edição, 1985.
- 74 ZIEF, M.; KISER, R. *Solid phase extraction for sample preparation.* Phillipsburg, N.J.: J.T. Baker Inc., 1987.
- 75 NAWROCKI, J. Silica surface controversies, strong adsorption sites, their blockage and removal, parts I and II. *Chromatogr.*, v.31, p.177-205, 1991.
- 76 AIKEN, G.R. *et al.* Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution. *Anal. Chem.*, v.51, p.1799-1803, 1979.
- 77 FRITZ, J.S. *Analytical solid-phase extraction.* Wiley-VCH, 1999.
- 78 SANT'ANA, O.D. *Extração em fase sólida com espuma de poliuretano: estudos dos processos sortivos e análise direta do material sólido por atomização eletrotérmica na determinação de metais em amostras ambientais.* Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense. Curso de pós-graduação em Geociências. Rio de Janeiro, fevereiro de 2002.

- 79 BRAUN, T. *et al.* *Polyurethane foam sorbents in separation science*. Boca Raton, CRC Press, 1985.
- FERREIRA, E.M.M. *Uso de espuma de poliuretano na extração de índio de meio iodeto*. Tese de  
80 Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química,  
programa de pós-graduação em Química. Rio de Janeiro, fevereiro de 2003.
- 81 BAYER, E. *Gaschromatogr.* Springer-Verlag, Heidleberg, 2<sup>a</sup>. ed., p.4, 1962.
- 82 BAUMAN, E.K. *et al.* Preparation of immobilized cholinesterase for use in analytical chemistry.  
*Anal. Chem.*, v.37, p.1378-1381, 1965.
- 83 VAN VENROOY, J.J. *Polymeric foam column packaging for gas chromatography*. U.S. Patent, 3,  
347, 020, 1967.
- 84 BOWEN, H.J.M. Absorption by polyurethane foams: new method of separation. *J. Chem. Soc. (A)*,  
p.1082-1085, 1970.
- 85 BRAUN, T.; FARAG, A.B. Foam chromatography. Solid foams as supports in column  
chromatography. *Talanta*, n.6, v.19, p.828-830, 1972.
- 86 BRAUN, T.; BAKOS, L.; SZABÓ, Z. S. Reversed phase foam chromatography. Separation of iron  
from copper, cobalt and nickel in the tri-n-butylphosphate-hydrochloric acid system,  
*Anal. Chim. Acta*, v.66, p.57-66, 1973.
- 87 BRAUN, T.; NAVRATIL, J.D.; FARAG, A.B. *Polyurethane foam sorbents in separation science*.  
Boca Raton, CRC Press, 1984.
- 88 RIGAS, J. *et al.* Analytical use of polyurethane foam sorbents for enrichment proceses.  
I. Enrichment and determination of trace elements in natural waters. *Chem. Papers*, v.45, n.4,  
p.509-516, 1991.
- 89 NÓBREGA, W.A.; CARVALHO, S.M. *Fixação de Cs em espuma de poliuretano com e sem carga  
de azul da Prússia*. Anais do II Congresso Geral de Energia Nuclear. Congresso Geral de Energia  
Nuclear, v.2, Rio de Janeiro, 1988.
- 90 CARVALHO, S.M. *Aplicação de espumas de poliuretano na recuperação de gálio de rejeitos  
industriais*. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento  
de Química. Rio de Janeiro, 1992.
- 91 JESUS, D.S. *Uso de espuma de poliuretano em separação, enriquecimento e determinação de  
zinco por técnicas espectroanalíticas*. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Bahia.  
Departamento de Química. Salvador, 1999.
- 92 MOODY, G.J.; THOMAS, J.D.R. Extractions and separations with foamed plastics and rubbers.  
*Analyst*, v.104, p.1, 1979.
- 93 LEMOS, V.A. *Extração em fase sólida usando espuma de poliuretano para separação de Al (III) de  
outros cátions metálicos*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia. Mestrado em  
Química Analítica. Salvador, 1998.
- 94 WEINAND, R. Adsorbent resins in the beverage industry. *Fruit Proces.*, v.5, p.166-171, 1995.
- 95 BURNHAM, A.K. *et al.* *Anal. Chem.*, v.44, p.139, 1972.
- 96 SUN, J.J.; FRITZ, J.S. *J. Chromatogr.*, v.522, p.95-105, 1990.
- 97 HENNION, M.C.; PICHON, V. Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water.  
*Environ. Sci. Tech.*, v.28, p.576A-583A, 1994.
- 98 OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analyzing tannins. *J. Nat. Prod.*, v.52,  
p.1-31, 1989.
- 99 TREUTTER, D. *et al.* Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid  
chromatography and chemical reaction detection. *J. Chromatogr. A*, v.667, p.290-297, 1994.
- 100 WATERHOUSE, A.L.; SIRLEY, J.R.; DONOVAN, J.L. Antioxidants in chocolate. *Lancet*, v.348,  
p.834, 1996.
- 101 LEA, A.G.H. The phenolics of ciders: oligomeric and polymeric procyanidins. *J. Sci. Food Agric.*,  
v.29, p.471-477, 1978.
- 102 RIGAUD, J. *et al.* Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of  
procyanidins from cacao beans and grape seeds. *J. Chromatogr. A.*, v.654, p.255-260, 1993.
- 103 ENGELHARDT, H. *Practice of high performance liquid chromatography*. Applications, equipment  
and quantitative analysis. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, 1985.
- 104 HAMMERSTONE, J.F. *et al.* Identification of procyanidins in cocoa (*Teobroma cacao*)  
and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry.  
*J. Agric. Food Chem.*, v.47, p.490-496, 1999.