

Validação de método analítico para determinação do teor de taninos em “Mel Rosado”

Analytical method validation for tannins content's determination in “Honey Rose”

Cleiton Antônio Nunes¹, Diôgo Heleno Campos² & Eudson Carlos Souza Magalhães³

RESUMO – A validação de um método analítico é apresentada para a determinação do teor de taninos em “Mel Rosado”. O método baseou-se na formação de um complexo azulado pela reação dos taninos com cloreto férrico e dosado por espectrofotometria UV-Vis a 715nm, utilizando ácido tânico como padrão de referência. O método obteve um bom desempenho, apresentando boa linearidade ($r=0,999$), - recuperação de 99,81 a 102,36%, repetibilidade (DPR %) de 0,63% e precisão intermediária (DPR %) de 0,49%, além de uma boa seletividade e robustez, sendo uma alternativa viável para laboratórios de controle de qualidade.

PALAVRAS-CHAVE – Taninos, espectrofotometria UV-Vis, validação de métodos analíticos.

SUMMARY – The analytical methods validation is presented for tannins content determination in “Honey Rose”. The method was based on a bluish complex formed by the reaction between tannins and ferric chloride and assayed by UV Vis spectrophotometer at 715 nm, using tannic acid as reference standard. The method had a good performance, presenting a good linearity ($r=0,999$), a recovery of 99,81 to 102,36%, a repeatability (DPR%) of 0,63% and intermediate precision(DPR%) of 0,49%, besides a good selectivity and robustness, being a viable alternative for quality control laboratories.

KEYWORDS – Tannins, UV-Vis spectrophotometer, analytical methods validation.

INTRODUÇÃO

De acordo com a resolução RDC 199, de 26 de outubro de 2006⁽¹⁾, o produto “Mel Rosado” é constituído de 10% de extrato de rosas rubras em mel e é indicado como adstringente nas estomatites, principalmente, as infantis. Estabelece ainda que seja determinado o teor de taninos no produto acabado, devendo estar entre 1,5 a 3,0%. Entretanto, os compêndios farmacopéicos não apresentam uma monografia para o produto “Mel Rosado” e nem um método específico para a determinação de taninos neste produto, requerendo que os laboratórios de controle de qualidade validem um método desenvolvido ou adaptado para esse fim.

Alguns métodos são indicados para a determinação dos taninos em produtos de origem natural^(3,7,10,11). Entre eles destaca-se o método de HARGERMAN & BUTLER⁽⁷⁾. O método tem por base a possibilidade de formação de um complexo azulado obtido a partir da reação dos taninos com cloreto férrico ($FeCl_3$). A precipitação deste complexo em solução aquosa é evitada por uma solução de trietanolamina, lauril sulfato de sódio, isopropanol e água. A estimativa do teor na amostra é feita por espectrofotometria UV-Vis utilizando ácido tânico como padrão de referência. Embora este método seja bastante difundido, não foram encontra-

dos na literatura relatos de sua aplicação para determinações em “Mel Rosado”.

Este trabalho teve então o objetivo de validar uma metodologia baseada no método de HARGERMAN & BUTLER adaptada para a determinação do teor de taninos em amostras de “Mel Rosado”, estimando os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

MATERIAL E MÉTODOS

• Preparo das soluções

- **Solução estoque de ácido tânico:** foram pesados 75,0 mg de ácido tânico e diluídos quantitativamente em 100,0ml de etanol 50%(v/v).

- **Solução estoque da amostra:** foram pesados 3,3g da amostra de “Mel Rosado” e diluídos quantitativamente em 100,0ml de etanol 50%(v/v).

- **Solução de estabilidade:** foram pesados 1,0g de lauril sulfato de sódio, 5,0g de trietanolamina e medidos 25,0ml de isopropanol, sendo diluídos para 100,0ml de água destilada.

- **Solução padrão para leitura:** a 4,0ml da solução de estabilidade foram adicionados 2,0ml de $FeCl_3$ 0,01mol.l⁻¹

Recebido em 11/9/2008

¹Químico, Mestre em Agroquímica. Discente do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica/UFLA. Lavras-MG

²Químico. Laboratório de Controle de Qualidade/FARMAX Produtos Farmacêuticos e Cosméticos. Divinópolis-MG

³Químico, Mestre em Agroquímica. Docente da UFSJ campus Divinópolis-MG. Docente da UIT. Itáúna-MG

(em HCl 0,001 mol.L⁻¹) e 2,0ml da solução estoque de ácido tânico. A mistura foi deixada em repouso por 15min até leitura.

- **Solução amostra para leitura:** a 4,0ml da solução de estabilidade foram adicionados 2,0ml de FeCl₃ 0,01 mol.L⁻¹ (em HCl 0,001 mol.L⁻¹) e 2,0ml da solução estoque da amostra. A mistura foi deixada em repouso por 15min até leitura.

• **Instrumental**

As medidas de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 715nm. Empregou-se um espectrofotômetro UV-Vis SHIMADZU modelo UV-Mini 1240 e cubetas de quartzo com 1,0cm de caminho óptico.

RESULTADOS

Inicialmente, foi feita a medida da absorbância de um branco (4,0ml da solução de estabilidade e 2,0ml da solução de FeCl₃) para verificar sua possível interferência nos resultados, sendo constatado que o mesmo não interferiu nas medidas analíticas.

Sem a disponibilidade da matriz livre do analito, a seletividade foi avaliada pela comparação dos coeficientes angulares das curvas de adição padrão para dois grupos de amostras contendo a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Um grupo incluiu a matriz da amostra (já contendo certa concentração do analito) e o outro grupo não a incluiu⁽⁵⁾. Foram feitas três repetições para cada ponto das curvas. As curvas obtidas para os dois grupos são apresentadas na **Figura 1**.

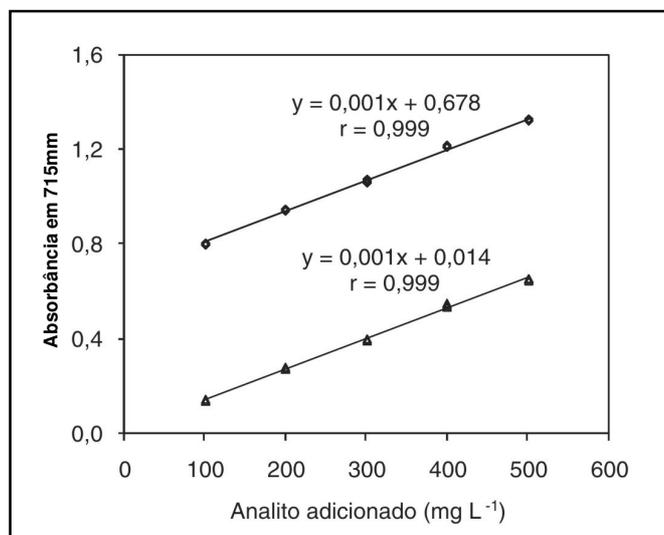


FIG. 1 - Avaliação da seletividade pelo método de adição padrão. Sem adição de analito (◆) e com adição de analito (◇).

Pelo mesmo motivo relatado na avaliação da seletividade, o estudo da linearidade foi feito pelo método de adição padrão⁽⁵⁾. Foram avaliadas adições de 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 e 500,0mg l⁻¹ de analito à solução da amostra (contendo certa concentração do analito), resultando em uma faixa de concentrações que abrangeu aproximadamente 80 a 120% do intervalo de trabalho. Foram realizadas três repetições para cada ponto da curva. A curva obtida é apresentada na **Figura 2**.

A repetibilidade foi avaliada através da análise de uma amostra de “Mel Rosado” em 6 repetições feitas por um único analista, nas mesmas condições e em um curto in-

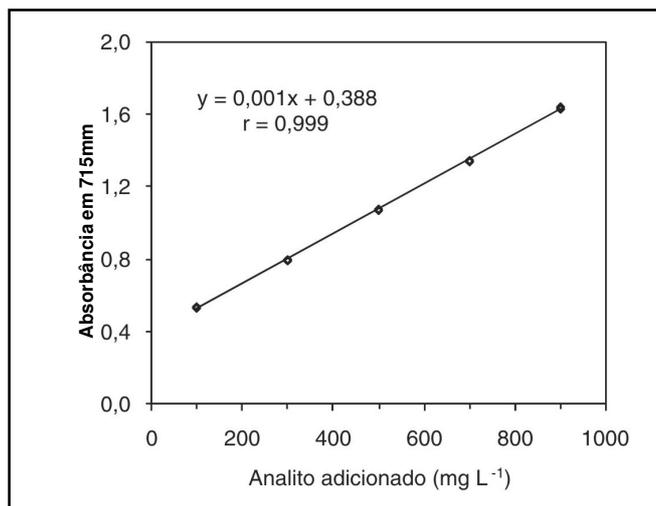


FIG. 2 - Avaliação da linearidade pelo método de adição padrão.

tervalo de tempo. A precisão intermediária foi avaliada pela comparação de 6 determinações realizadas por analistas diferentes, em dias diferentes e com o mesmo equipamento de análise. As médias e os respectivos desvios padrão obtidos em cada condição, são apresentados na **Tabela I**.

TABELA I
Avaliação da precisão com analistas e dias diferentes

	Analista 1/dia 1	Analista 2/dia 2
média (n=6)	1,69 % ± 0,01	1,68 % ± 0,01
DPR	0,63	0,49
F _{crítico} = 5,05		F _{calculado} = 1,67

A exatidão foi estimada como a porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de analito adicionada à amostra em três concentrações distintas. As concentrações adicionadas, as médias das triplicatas para as concentrações estimadas e os respectivos desvios padrão são apresentadas na **Tabela II**, bem como, os valores de exatidão obtidos.

TABELA II
Avaliação da exatidão em três pontos da faixa de trabalho

Concentração adicionada (mg L ⁻¹)	Concentração estimada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
100,00	102,36 ± 0,64	102,36 ± 0,67
500,00	500,40 ± 0,90	100,08 ± 0,56
900,00	898,32 ± 1,50	99,81 ± 0,62

A robustez foi avaliada por um planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻²^(6,9) realizando os cálculos através da planilha proposta no trabalho de TEÓFILO & FERREIRA⁽⁹⁾. Foi avaliado o efeito que uma possível variação das concentrações de cloreto férrico, de ácido clorídrico, de lauril sulfato de sódio, de trietanolamina e de isopropanol nas soluções reagente causariam no resultado analítico. Os níveis testados em cada variável são apresentados na **Tabela III**.

Os resultados foram obtidos de forma aleatória em duplicata para cada ensaio conforme a matriz de planejamento mostrada na **Tabela IV**. A partir dos resultados

DISCUSSÃO

TABELA III
Níveis testados em cada variável na avaliação da robustez

Variável	Codificação	Nível baixo (-)	Nível alto (+)
[lauril sulfato de sódio]	A	0,7 g	1,3 g
[trietanolamina]	B	4,0 g	6,0 g
[isopropanol]	C	18,0 g	22,0 g
[cloreto férrico]	D	0,008 mol L ⁻¹	0,012 mol L ⁻¹
[ácido clorídrico]	E	0,0008 mol L ⁻¹	0,0012 mol L ⁻¹

TABELA IV
Planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻² com os resultados para cada ensaio

Ensaio	Variável					Taninos (%)
	A	B	C	D	E	
1	-	-	-	+	+	1,68
2	+	-	-	-	-	1,67
3	-	+	-	-	+	1,68
4	+	+	-	+	-	1,68
5	-	-	+	+	-	1,67
6	+	-	+	-	+	1,67
7	-	+	+	-	-	1,68
8	+	+	+	+	+	1,67
Efeito	-0,008	0,005	-0,003	-0,002	0,001	-
Erro	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	-
t	2,280	1,378	0,900	0,494	0,159	-

t tabelado (0,05 de probabilidade e 8 graus de liberdade) = 2,306

obtidos foram calculados os efeitos e seus erros. A significância de cada variável foi avaliada pelo teste t. Os valores de t para cada efeito foram calculados pela divisão do valor do efeito pelo seu erro e comparados com o valor de t tabelado de 2,306, que corresponde a um nível de significância de 95% com 8 graus de liberdade^(6,9).

O método validado foi aplicado na determinação do teor de taninos em amostras comerciais de “Mel Rosado”. Os resultados foram expressos como a média de três determinações para cada amostra analisada. Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela V**.

As amostras não declaravam o teor de taninos nos rótulos.

TABELA V
Teor de taninos em amostras comerciais de “Mel Rosado” determinados pelo método validado

Amostra	Taninos (%)
A	2,15 ± 0,02
B	2,18 ± 0,04
C	2,26 ± 0,02
D	2,45 ± 0,03
E	2,14 ± 0,02

A **Figura 1** mostrou que os coeficientes angulares da regressão para os dois grupos de amostra usados no estudo da seletividade foram iguais. Isso indica uma seletividade aceitável e que o único efeito de matriz presente foi a interferência natural causada pelo nível básico do analito já presente na amostra⁽⁵⁾.

No estudo da linearidade foi observado um coeficiente de correlação linear superior a 0,99 indicando uma linearidade adequada^(2,5), com verificado na **Figura 2**.

Na avaliação da precisão foram obtidos desvios padrão relativos (DPR) muito abaixo do valor de 3,6% recomendado para a faixa estudada^(4,12). Uma comparação estatística (Teste F) mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as variâncias nas duas condições avaliadas, indicando portanto, uma precisão (repetibilidade e precisão intermediária) adequada.

No estudo da exatidão, os valores de absorvância das amostras, com adição de analito, foram descontados do valor da absorvância para as amostras sem a adição, com o intuito de compensar a absorção do analito já presente na matriz da amostra. Os valores de exatidão obtidos mostraram-se adequados por estarem dentro do limite recomendado de 97 a 103%⁽⁸⁾, como verificado na **Tabela II**.

Como discutido anteriormente, a avaliação do efeito de cada variável no teste de robustez foi feita pelo teste t. Um valor de t calculado menor que o tabelado indica que a respectiva variável não teve influência estatisticamente significativa no resultado analítico^(6,9). Pelos valores de t calculado, verificou-se que as variáveis testadas não apresentaram influência estatisticamente significativa nos resultados analíticos ao serem alterados nos níveis testados, indicando uma boa robustez. Isso significa que, se por algum motivo as soluções reagentes tiverem suas concentrações alteradas dentro dos níveis avaliados, o resultado analítico não terá seu valor alterado significativamente.

Na aplicação do método validado para a determinação do teor de taninos nas amostras comerciais, foram obtidos resultados condizentes com o exigido pela legislação vigente para o produto (taninos de 1,5 a 3,0%)⁽¹⁾, apesar de tal teor não estar declarado nos rótulos das amostras.

CONCLUSÕES

Pela avaliação das figuras de mérito da validação verificou-se que a metodologia baseada no método de HARGERMAN & BUTLER adaptada para a determinação do teor de taninos em “Mel Rosado” teve um bom desempenho. A metodologia apresentou boa linearidade (r=0,999), exatidão de 99,81 a 102,36%, repetibilidade de 0,63% e precisão intermediária de 0,49%, além de uma boa seletividade e robustez, mostrando-se indicada para determinações de taninos em amostras comerciais de “Mel Rosado” e sendo uma alternativa viável para os laboratórios de controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA. *Resolução RDC nº 199 de 26 de outubro de 2006*. D.O.U. de 30/10/2006.
2. ANVISA. *Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003*. D.O.U. de 02/06/2003.
3. FARMACOPÉIA PORTUGUESA VII. 7ª ed., CD-ROM, Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, Lisboa, 2002.
4. HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.*, v. 54, n. 1, p. 67A-76A, 1982.
5. INMETRO. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*. DOQ-CGCRE-008, 2003.
6. HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINS-TE, B.G.M.; MASSART, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 24, p. 723-753, 2001.
7. PRADO, C. C.; ALENCAR, R. G.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Avaliação do teor de polifenóis da *Camellia sinensis* (Chá Verde). *R. Eletr. Farm.*, v. 2, n. 2, p. 164-167, 2005.
8. TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.*, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.
9. TEÓFILO, R. F. & FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quim. Nova*, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
10. THE BRITISH PHARMACOPOEIA 2000. CD-ROM, v4.0, The Stationery Office, London, UK, 2000.
11. THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA 26. National Formulary 21, US Pharmacopeial Convention, Rockville, 2003.
12. WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends Anal. Chem.*, v. 18, n. 9-10, p. 624-632, 1999.

Endereço para correspondência
Diógo Heleno Campos
Rua Bolívia, 135, Nações. Divinópolis-MG
35500-532
e-mail: diogoqmcb@yaho.com.br