

Avaliação de Complexos Formados por Catequina e Macromoléculas

Luiz Alberto Lira SOARES ^{1*}; Alessandro MAIA ²; Alice Louzada OLIVEIRA ²;
Pedro Ros PETROVICK ² e George GONZÁLEZ ORTEGA ²

¹ Departamento de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Avenida General Cordeiro de Farias, s/n, 59010-180, Natal, RN, Brasil

² Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Avenida Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi avaliar a comportamento de complexação entre catequina e polivinilpirrolidona. Para efeito de comparação, complexos entre catequina e caseína também foram estudados. A capacidade de formação de complexo e a influência do pH sobre a estabilidade do complexo foram investigados. Máxima interação foi observada entre catequina e polivinilpirrolidona insolúvel. Este complexo foi estável em faixa de pH de 3 a 7. Comparativamente, a caseína formou complexos com catequina, porém em menor intensidade e muito mais instáveis a variações de pH. Adicionalmente, a presença de flavonóide não causou modificações no perfil de complexação entre catequina e polivinilpirrolidona.

SUMMARY. "Evaluation of Complexes between Catechin and Macromolecules". This work aim to evaluate the binding ability of catechin to polyvinylpyrrolidone. For comparison purposes, casein was used as a protein matrix, with emphasis on the binding parameters and influence of the pH on the complex stability. Maximum binding was achieved with polyvinylpyrrolidone insoluble form (cross-linked). This complex was stable at pH from 3 to 7. Comparatively, casein was also able to bind catechin, but in a minor extend and was more sensitive to pH variations. Additionally, the presence of flavonoid unchanged the complexation behavior of catechin and polyvinylpyrrolidone.

INTRODUÇÃO

Os taninos correspondem a um grupo de substâncias amplamente distribuído no reino vegetal, aos quais é atribuído um número significativo de atividades biológicas ^{1,2}. A maioria das propriedades farmacológica destes polifenóis está relacionada à capacidade de formarem complexos com proteínas ^{3,4}. Diferentes técnicas para quantificação deste grupo de compostos também se baseiam nesta característica. Assim, os taninos têm sido determinados por ultravioleta, colorimetria ou gravimetria mediante métodos que incluem a formação de complexos insolúveis, seguido de uma posterior separação por filtração ou centrifugação ⁵⁻⁶. A precipitação por pó de pele, seguido por absorciometria, é o método de quantificação de taninos mais preconizado por códigos oficiais ⁷⁻⁹. Entretanto, em virtude de limitações relacionadas ao custo e a variabilidade de procedência do pó de pele, diver-

sos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidação do fenômeno da sua complexação e avaliação de agentes quelantes alternativos, especialmente de natureza protéica tais como, hemoglobina, gelatina, albumina bovina e caseína ¹⁰⁻²¹. Contudo, a formação e a estabilidade de complexos entre polifenóis e proteínas dependem de diversos fatores externos, como temperatura, tempo de complexação, pH, proporção proteína:tanino, massa molecular do polifenol, assim como o número de hidroxilas fenólicas e sua solubilidade; o que compromete a especificidade e a exatidão desses métodos ²²⁻²⁴. Como alternativa, a literatura tem demonstrado que o emprego de agentes complexantes de natureza não-protéica, podem permitir a obtenção de complexos estáveis e providos de maior especificidade. Neste contexto, a polivinilpirrolidona (povidona) tem se destacado devido a sua reconhecida capacidade de ligação com polife-

PALAVRAS-CHAVE: Caseína, Catequina, Interação, Polivinilpirrolidona, Taninos.

KEYWORDS: Casein, Catechin, Interaction, Polyvinylpyrrolidone, Tannins.

* Autor a quem dirigir correspondência. E-mail: phtech@uol.com.br

nóis^{13,21,25-33}. Ao contrário da maioria dos derivados protéicos, os complexos formados entre polifenóis e povidona são normalmente mais estáveis. Alguns trabalhos têm demonstrado que a povidona apresenta maior eficiência na formação de complexos com polifenóis, em especial com taninos, do que outras substâncias, tais como caseína, gelatina e albumina sérica bovina^{13,21,34-37}.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de complexos entre a catequina e a povidona, com o intuito de estabelecer parâmetros que possam maximizar sua formação. Para fins comparativos, a caseína também foi estudada como agente seqüestrante de catequina. O presente trabalho é a primeira parte de estudo para o desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de taninos em matérias-primas vegetais, empregando a povidona como agente complexante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

As amostras de polivinilpirrolidona solúveis (Kollidon® 17, Kollidon® 25 e Kollidon® 30) e insolúveis (Kollidon® CL; Kollidon® CL-M.) foram gentilmente doadas pela BASF (São Paulo, Brasil). A caseína, a rutina e a catequina foram adquiridas da Sigma (St. Louis, USA).

Preparação das soluções estoque

Solução de catequina

A solução estoque de catequina foi preparada na concentração de 2 mg/mL com água recentemente destilada. A total dissolução do padrão foi alcançada com o auxílio de banho de ultra-som. A solução foi armazenada protegida da luz.

Dispersões de povidona

As dispersões estoques de povidona, em diferentes concentrações, foram preparadas por dissolução (povidona solúvel - PVP) ou suspensão (povidona insolúvel - PVPP) do polímero em água recentemente destilada. Para assegurar a total hidratação do material, as dispersões foram preparadas pelo menos 24 horas antes dos experimentos e mantidas sob agitação constante.

Avaliação preliminar do perfil de interação entre catequina e polímeros

Uma alíquota de 5,0 mL da solução estoque de catequina e as diferentes dispersões/soluções de povidona (5 a 1600 µg/mL) foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e sub-

metidas à agitação magnética por 30 min a 25 °C. Em seguida, 10,0 mL de cada amostra foram centrifugados a 3000 rpm (centrífuga 4K15, Sigma, Alemanha) por 30 min. Em balão volumétrico de 25 mL, 5,0 mL do sobrenadante foram diluídos com água destilada e a concentração de catequina foi determinada por espectrofotometria (espectrofotômetro HP 8452A, Hewlett Packard, USA) em 280 nm. Água destilada foi empregada como branco.

Purificação da povidona insolúvel

Para eliminação de frações solúveis do polímero e H₂O₂, 50,0 g de PVPP (Kollidon® CL) foram submetidos à agitação com 250 mL de HCl 0,1 M em béquer de 500 mL por 30 min. O material foi filtrado em funil de vidro sinterizado G3, sob pressão reduzida. O material foi lavado com mais 1000 mL da mesma solução ácida e, posteriormente, com água destilada, até obtenção de um filtrado totalmente límpido. O resíduo foi seco em estufa a 40 °C, durante 72 h, e acondicionado em dessecador com sílica.

Comparação entre os perfis de complexação para catequina com PVPP ou com caseína

Soluções aquosas de catequina (400 µg/mL) foram tratadas com suspensões aquosas de PVPP (60 a 2400 µg/mL) ou caseína (5 a 2000 mg). Os resultados foram expressos como fração de catequina ligada³⁸ em função da razão ponderal do agente complexante (PVPP ou caseína)/catequina (Equação 1):

$$FCL = \frac{A_{pad} - A_{cent}}{A_{pad}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: A_{pad} = absorvância da solução padrão e A_{cent} = absorvância da solução após centrifugação.

Influência do pH sobre a estabilidade de complexos

Solução de catequina a 200 µg/mL foi submetida a complexação com PVPP (1200 µg/mL) ou caseína (1800 mg). O pH foi ajustado mediante adição de soluções diluídas de HCl ou NaOH e pela utilização de soluções-tampão de fosfatos e boratos (Tabela 1). Os resultados foram expressos como fração de catequina ligada (FCL) em função do pH.

Interação de catequina com PVPP

Em balões volumétricos de 25 mL, foram submetidos à agitação 5,0 mL de solução esto-

Solução	Volume adicionado	pH (literatura)	pH (solução final)	λ_{nm}
HCl 0,1 N	1,0 mL	-	3,1	280
HCl 0,1 N	0,5 mL	-	3,4	280
Água destilada	-	-	6,1	280
Tampão fosfato ⁴⁰	15,0 mL	7,0	7,1	280
Tampão fosfato ⁴⁰	15,0 mL	8,0	7,9	280
Tampão borato ³⁹	15,0 mL	8,6	8,6	290*
Tampão borato ³⁹	15,0 mL	9,0	8,9	290*
Tampão borato ³⁹	15,0 mL	9,6	9,4	290*
NaOH 0,1 N	0,5 mL	-	10,5	290*

Tabela 1. Soluções e condições utilizadas para avaliação da influência do pH sobre a formação de complexos.

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

que de catequina e suspensões de PVPP em concentrações que variaram de 5 a 6000 $\mu\text{g/mL}$. Após 30 min de agitação, 10,0 mL de cada amostra foram centrifugados a 3000 rpm durante 30 min. Em balão volumétrico de 25 mL, 5,0 mL do sobrenadante foram diluídos com água destilada e a concentração de catequina determinada por espectrofotometria em 280 nm. O resultado foi expresso como concentração molar de catequina em função da concentração molar de PVPP, considerando a massa molecular do monômero de PVP = 111,1 ³⁸. Os resultados foram analisados utilizando o modelo da solubilidade ⁴¹:

$$\frac{[CAT]_{\text{COMPLEXO}}}{[PVPP]_{\text{TOTAL}}} = \frac{[CAT]_{\text{TOTAL}} - [CAT]_{\text{LIVRE}}}{[PVPP]_{\text{TOTAL}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde: $[CAT]_{\text{TOTAL}}$ = número de moles de catequina adicionado ao sistema; $[CAT]_{\text{LIVRE}}$ = número de moles de catequina livre ao final da complexação; $[PVPP]_{\text{TOTAL}}$ = número de moles de PVPP adicionada ao sistema ao final da complexação.

Cromatografia líquida de alta eficiência ⁴²

Preparação das amostras

Para preparação das amostras, 60 mg de (+)-catequina e 20 mg de rutina foram dissolvidos em 50,0 mL de água destilada. 15,0 mL da solução contendo os padrões foram transferidos para bquer de 50 mL e submetidos à agitação, durante 30 min, com 30 mg de PVPP. Após agitação, 10,0 mL foram centrifugados a 3000 rpm por 30 min. Uma alíquota de 5,0 mL do sobrenadante foi diluída a 25,0 mL com água destilada

(solução amostra). Paralelamente, 10,0 mL da solução contendo o padrão foram submetidos à centrifugação a 3000 rpm durante 30 min. 5,0 mL do sobrenadante foram diluídos a 25,0 mL com água destilada (solução referência). Tanto a solução amostra quanto a referência foram filtradas através de membrana 0,45 μm e 20 μL foram injetados no cromatógrafo líquido. A quantidade de PVPP adicionada ao sistema foi suficiente para promover a remoção de 50% da catequina presente no meio, estimada a partir da curva de solubilidade.

Cromatógrafo líquido

A análise foi realizada em cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10 munido de sistema de fornecimento de solventes LC-10AD; sistema de válvulas para eluição gradiente FVC-10AL; detector UV/VIS SPD-10A; injetor automático SIL-10A e programa para aquisição de dados CLASS-LC10 (Shimadzu, Japão). Como fase estacionária foi utilizada coluna cromatográfica Nova-Pak C₁₈ 150 mm x 39 mm (Waters, USA), protegida por pré-coluna C₁₈ 10 mm x 4 mm (125 μm) (Shimadzu, Japão).

Preparação da fase móvel

Foram preparadas duas soluções para constituir a fase móvel: ácido acético 1% (V/V) (fase móvel A), e acetonitrila:água:ácido acético (50:49:1; V/V/V) (fase móvel B). As soluções foram filtradas através de membrana 0,45 μm e saturadas com hélio.

Condições cromatográficas

O sistema de eluição em gradiente consta na Tabela 2, empregando fluxo de 1,5 mL/min e detecção em 280 (catequina) ou em 352 nm (rutina).

Tempo (min)	Concentração da fase móvel B (%)
0	12,5
5	20,0
8	30,0
17	45,0
18	100,0
25	100,0
27	12,5
30	12,5

Tabela 2. Programa do gradiente de eluição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando a catequina como substância referência, a formação de complexos foi avaliada para diferentes tipos de povidona, os quais se diferenciam quanto à massa molecular e à solubilidade em água. Os derivados solúveis correspondem a Kollidon® 17 PF, Kollidon® 25 e Kollidon® 30 (PVP's), que apresentam massas moleculares médias de 9300, 31000 e 49000 Da, respectivamente. Por outro lado, a massa molecular não pode ser utilizada para diferenciar os derivados insolúveis Kollidon® CL e CL-M (PVPP's) ³¹.

A capacidade complexante de cada um dos derivados da povidona, caracterizada indiretamente pela quantidade de catequina livre no meio líquido, mostrou-se nitidamente diferenciada (Fig. 1). Os derivados solúveis da povidona (PVP) não formaram complexos insolúveis nem demonstraram uma capacidade complexante relevante. A diferença de massa molecular média do polímero não demonstrou ser um fator deci-

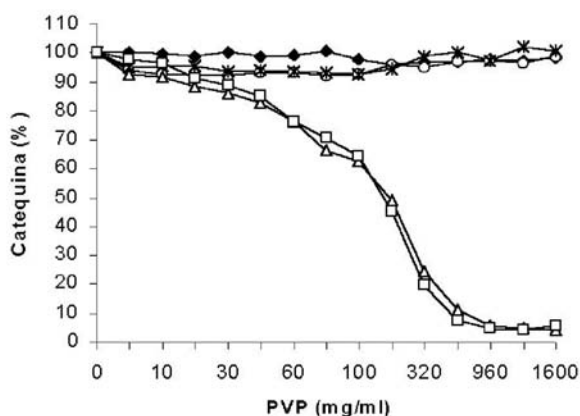


Figura 1. Teor percentual de catequina livre presente no sobrenadante em função da concentração de povidona. Kollidon® 17PF (◆), Kollidon® 25 (○), Kollidon® 30 (*), Kollidon® CL (△) e Kollidon® CL-M (□).

sivo, uma vez que não promoveu qualquer diferença nos perfis obtidos. Desta forma, a utilização de povidona solúvel para promover a separação ou precipitação de catequina foi logo de início descartada.

Por outro lado, os dois polímeros insolúveis da povidona (PVPP) conduziram à remoção completa da catequina presente no sistema. Os dois polímeros insolúveis apresentaram um perfil de complexação muito similar na faixa de concentrações testada, observando-se uma remoção completa da catequina a partir da concentração de 960 µg/mL. Considerando que a diferença fundamental entre os produtos Kollidon® CL e Kollidon® CL-M consiste no caráter micronizado deste último, a ausência de diferenças nos perfis sugere que os fatores vinculados a fenômenos de superfície não afetam a formação destes complexos. É provável que o polímero micronizado (Kollidon® CL-M) apresente maior velocidade de hidratação em função da maior superfície de contato. Porém, a adoção do procedimento de hidratação prévia permitiu eliminar qualquer variável adicional vinculada a esse fenômeno. Diante da similaridade observada para os polímeros reticulados, os ensaios subseqüentes foram conduzidos unicamente com a povidona reticulada não-micronizada.

A PVPP foi submetida a uma etapa de purificação prévia, cujo objetivo foi a remoção de traços de H₂O₂, partículas finas e resíduos de PVP-solúvel capazes de afetar a formação do complexo ⁴⁰. Os resultados encontrados não evidenciaram diferenças para os perfis de complexação obtidos com a PVPP antes ou depois da purificação (dados não apresentados).

A Fig. 2 representa o perfil de complexação em meio aquoso para os agentes complexantes (PVPP ou caseína) com a catequina, em função da razão ponderal polímero/catequina (m/m).

A análise da forma e inclinação até o ponto de inflexão das curvas demonstra uma diferença da eficácia para ambas as substâncias, sendo o emprego de PVPP como agente complexante muito mais eficaz na remoção da catequina do que a caseína (Fig. 2). Nas condições estudadas, foram necessários 25 mg de PVPP para remoção completa do polifenol presente no meio (cerca de 10 mg). Para caseína, porém, a remoção (complexação) de igual quantidade de catequina não foi possível de ser alcançada, obtendo-se, como valor máximo, uma complexação de 70% após adição de 2 g da proteína.

A formação de complexos entre polifenóis e povidona depende de condições específicas de

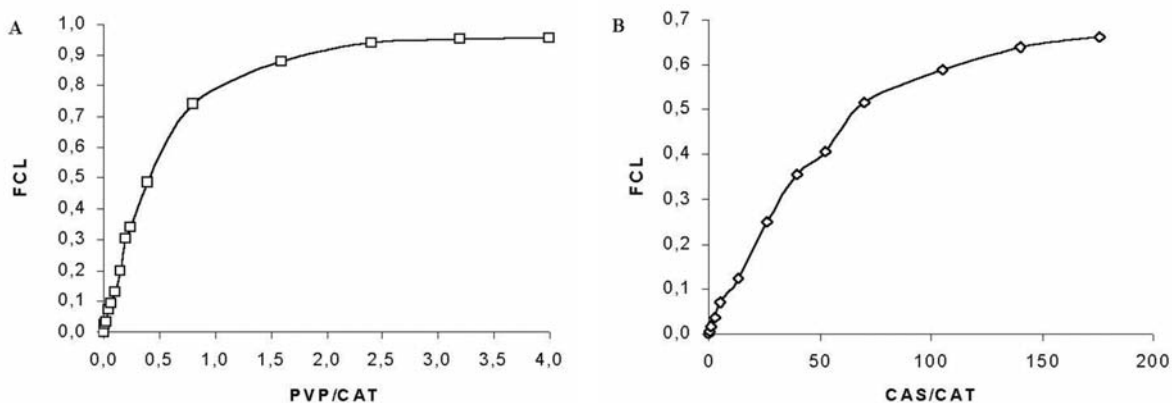


Figura 2. Efeito da razão ponderal (m/m) povidona/catequina (A) e de caseína/catequina (B) sobre a fração de catequina ligada (FCL).

pH. A complexação máxima entre o polímero e compostos fenólicos ocorre em pH suficientemente baixo para suprimir a ionização das hidroxilas fenólicas favorecendo a formação de pontes de hidrogênio^{38,43}. Neste trabalho, os resultados obtidos para as diferentes condições de pH confirmam a maior interação entre os agentes complexantes e a catequina em pH ácido ou muito próximo da neutralidade (Fig. 3). A curva que descreve o perfil de interação da PVPP demonstra que o complexo formado não sofre qualquer alteração quando o pH variou de 3,1 até 7,0. Porém, quando o pH foi elevado para 8,0, houve uma pequena redução no teor de catequina ligada a povidona e, em valores de pH superiores a 8,0, foi observada uma reversão significativa na fração de catequina ligada. Tal comportamento acompanha o aumento do pH do meio, quando é favorecida a maior ionização das hidroxilas fenólicas (Fig. 3). Para os complexos formados com caseína, também foi

observado um comportamento semelhante de reversão dos complexos formados com o aumento do pH. Entretanto, pode-se observar na Fig. 3 que a reversão do complexo formado entre catequina e caseína teve início em pH 3,5, com queda lenta até pH 6,1. A partir pH 6,1 ocorre uma queda brusca na fração de catequina ligada, atingindo reversão total dos complexos formados em pH 7,1.

A redução da concentração molar de catequina livre em função da concentração molar de PVPP está representada na Fig. 4. Para tanto, a massa molecular do monômero vinilpirrolidona³⁸ foi utilizada para determinar a concentração molar do polímero, e a formação de complexos entre catequina e PVPP foi avaliada utilizando o método de solubilidade⁴¹.

O sentido decrescente da curva corresponde à remoção paulatina de catequina do meio em função do aumento da concentração molar de PVPP. O fenômeno segue equação exponencial,

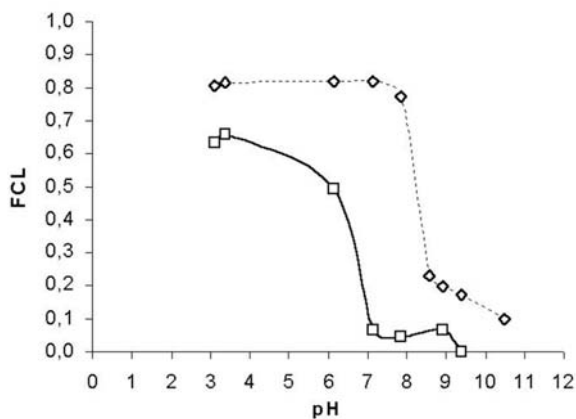


Figura 3. Efeito do pH sobre a fração de catequina ligada (FCL) à PVPP (◊) ou à caseína (◻).

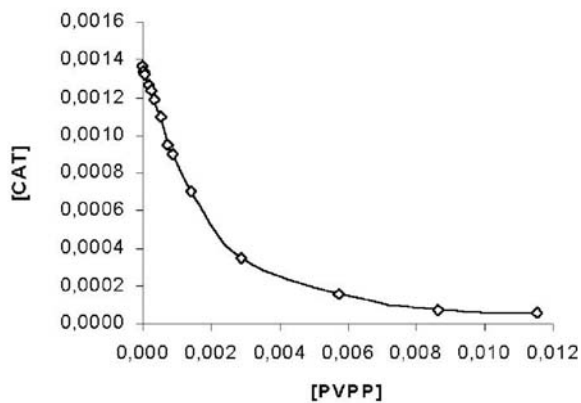


Figura 4. Redução na concentração molar de catequina [CAT] livre em função da concentração molar de PVPP [PVPP].

e pode ser descrito satisfatoriamente pelo diagrama de solubilidade apresentado por Higushi & Connors ⁴¹. Nestas condições, onde a fase final do diagrama se aproxima de zero, é possível estabelecer a estequiometria do complexo. O cálculo estequiométrico, realizado através da razão entre o número de moles de catequina no complexo e o número de moles de PVPP necessário para interação máxima, sugere que o complexo deve apresentar a seguinte fórmula geral PVPP₇CAT.

A capacidade de polímeros protéicos e não-protéicos de complexar substâncias polifenólicas de forma não seletiva encontra-se bem documentada na literatura ^{31,38}. Esta falta de especificidade, portanto, pode se configurar como um dos obstáculos ao emprego de um polímero como agente precipitante com finalidades analíticas, especificamente, na quantificação de taninos.

A avaliação preliminar da interação de PVPP com catequina na presença de flavonóides (que também apresenta hidroxilas fenólicas) foi conduzida empregando o mesmo procedimento metodológico dos ensaios anteriores. Para tanto, a uma solução contendo catequina e rutina foi adicionada PVPP em proporção molar suficiente para promover complexação com 50 % do tanino disponível.

Os resultados obtidos por CLAE confirmaram os dados espectrofotométricos sobre a relação molar PVPP:catequina na formação de complexos, alcançando-se uma redução na área da catequina de 51,51%, bastante próxima ao esperado. Para a área encontrada para o pico da rutina em 352 nm, a adição do polímero ocasionou redução de 18,02 % em sua área. Este resultado sugere que o PVPP interage preferencialmente com os taninos, porém, indica que o polímero forma complexo com outros polifenóis. É importante destacar que, apesar da interação com o flavonóide, não foi observado qualquer prejuízo ao perfil de interação do polímero com o tanino.

CONCLUSÕES

O emprego de PVPP foi muito mais eficiente na formação de complexos com a catequina do que a caseína. Variações no pH do meio demonstraram que a fração de catequina ligada ao complexo é reduzida drasticamente com o aumento do pH, independentemente do agente seqüestrante. O complexo formado com PVPP apresentou interação máxima em faixa de pH de 3,1 a 7,1. Tal resultado tem especial im-

portância para o desenvolvimento de metodologias de quantificação de polifenóis em soluções extrativas aquosas, quando o pH do meio é levemente ácido. A complexação de catequina com PVPP em presença de rutina revelou que o polímero também é capaz de interagir simultaneamente com outros polifenóis, porém, sem provocar modificações no perfil de ligação catequina-PVPP.

Embora o emprego direto de PVPP como agente precipitante de taninos ainda necessite de mais estudos, a capacidade elevada de complexação, a manutenção da estabilidade dos complexos em importante faixa de pH e a interação aparentemente específica entre o polímero e taninos, fazem com que o PVPP figure como um agente complexante promissor para o desenvolvimento de um método de quantificação geral de polifenóis, incluindo taninos.

Agradecimentos. Este foi realizado no PPGCF-UFRGS, com auxílio do CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haslam, E., T.H. Lilley, Y. Cai, R. Martin & P. Magnolato (1989) *Planta Med.* **55**: 1-8.
2. Scholz, E. (1994) *Dtsch. Apoth. Ztg.* **134**: 3167-70.
3. Haslam, E. (1977) *Phytochemistry* **16**: 1625-40.
4. Haslam, E., M.P. Williamson, N.P. Baxter & A.J. Charlton (1999) *Astringency and polyphenol protein interaction, in: Phytochemical in human health protection, nutrition, and plant defense: recent advances in phytochemistry*. Kluwer Academic/Plenum, New York, Cap. 11.
5. Sticker, O. (1997) *Phenolische Verbindungen, In: Pharmakognosie-Phytopharmazie*. (Hänsel, R., Sticker, O. & E. Steinegger, eds.), 6. Auf., Springer, Berlin, Cap. 7. págs. 870-890.
6. Mello, J.C.P. & S.C. Santos (2004) *Taninos*, In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento* (Simões, C.M.O., E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A., Mentz & P.R. Petrovick, eds.), 5. ed. UFRGS, Porto Alegre, UFSC, Florianópolis, Cap. 24, págs. 615-656.
7. Pharmacopée Française 10.ed. (1980) Adrapparm, Paris.
8. Deutsches Arzneibuch 10. (1992) Govi-Deutscher Apotheker, Frankfurt.
9. World Health Organization (1992) *Quality Control Methods for Medicinal Plants Materials*. WHO, Genebra.
10. Bate-Smith, E.C. (1973) *Phytochemistry* **12**: 907-12.

11. Spencer, C.M., Y. Cai, R. Martin, S.H. Gaffney, P.N. Goulding, D. Magnolato, H. Lilley & E. Haslam (1988) *Phytochemistry* **27**: 2397-409.
12. Okuda, T., T. Yoshida & T.J. Hatano (1989) *J. Nat. Prod.* **52**:1-31.
13. Luck, G., H. Liao, N.J. Murray, H.R. Grimmer, E.E. Warminski, M.P. Williamsom, T.H. Lilley & E. Haslam (1994) *Phytochemistry* **37**: 327-71.
14. Lang, F. & E. Wilhelm (1996) *Pharmazie* **10**: 734-7.
15. Prates de Lima, M.A.S., G.G. Ortega & E.P. Schenkel (1995) *Rev. Bras. Farm.* **76**: 12-6.
16. Kawamoto, H., F. Nakatsubo & K. Murakami (1996) *Phytochemistry* **41**: 1427-31.
17. Carvalho, E.L.S. (1997) *Desenvolvimento de produto seco nebulizado de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss - Celastraceae (espinheira-santa)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
18. Martins, A.G. (1998) *Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos nebulizados de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss - Celastraceae (espinheira-santa)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
19. Ratnavathi, C.V. & R.B. Sashidhar (1998) *Food Chem.* **61**: 373-80.
20. Schofield, P.D., M. Mbugua & A.N. Pell (2001) *Anim. Feed Sci. Technol.* **91**: 21-40.
21. Maia, A., A.L. Oliveira, L.A.L. Soares, P.R. Petrovick, & G. Gonzáles Ortega (2001) *Estudo sobre a formação de complexos entre a catequina e polivinilpirrolidona*. In: Farmápolis, 2001, Florianópolis, Resumos, Florianópolis, Brasil.
22. Mcmanus, J.P., K.G. Davis, J.E. Beart, S.H. Gaffney, T.H. Lilley & E.J. Haslam (1994) *Chem. Soc. Perkin Trans. 2*: 1429-38.
23. Haslam, E. & Y. Cai (1994) *Nat. Prod. Rep.* **11**: 41-66.
24. Hagerman, A.E.M., E. Rice & N.T. Ritchard (1998) *J. Agric. Food Chem.* **46**: 2590-5.
25. Frömring, K.H.W. Ditter & D.S. Hörn (1981) *J. Pharm. Sci.* **70**: 738-43.
26. Hörn, D. & W.J. Ditter (1982) *J. Pharm. Sci.* **71**: 1021-6.
27. Makkar, H.P.S. & K.J. Becker (1993) *Sci. Food Agric.* **62**: 295-9.
28. Makkar, H.P.S., B. Singh, S.K. Vats & R.P. Sood (1993) *Biosource Technol.* **45**: 69-71.
29. Makkar, H.P.S., M. Blummel, N.K. Borowy & K.J. Becker (1993) *Sci. Food Agric.* **61**: 161-5.
30. Makkar, H.P.S., M. Blummel & K. Becker (1995) *Brit. J. Nutr.* **73**: 897-913.
31. Bühler, V. (1999) "Kollidon®: Polyvinylpyrrolidone for the pharmaceutical Industry". BASF. 4TH Ed., Ludwigshafen.
32. Bornemann, Z., V. Gökmen & H.H. Nijhuis (2001) *Sep. Purif. Technol.* **22-23**: 3-61.
33. Nacz, M., R. Amarowicz, R. Zadernowski & F. Shahidi (2001) *Food Chem.* **73**: 467-71.
34. Siebert, K.J., N.T., Troukhanova & P.Y. Lynn (1996) *J. Agric. Food Chem.* **44**: 80-5.
35. Siebert, K.J., A., Carrasco & P.Y., Lynn (1996) *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1997-2005.
36. Siebert, K.J., & P.Y. Lynn (1997) *J. Food Sci.* **62**: 79-84.
37. Silankove, N., A. Perevolotsky & F.D. Provenza (2001) *Anim. Feed Sci. Technol.* **91**: 69-81.
38. Donner, L.W., G. Bécard & P.L. Irwin (1993) *J. Agric. Food Chem.* **41**: 753-7.
39. Assumpção, R.M.V. & T. Morita (1968) *Manual de soluções, reagentes e solventes*. São Paulo: Edgard Blucher, 1968.
40. The United States Pharmacopeia 22 (1990) Rockville:United States Pharmacopeial Convention.
41. Higuchi, T. & K.A. Connors (1965) *Phase-solubility techniques en: Advances in analytical chemistry and instrumentation* (C.N., Reilley, ed.), Willey:New York, V. 4, 117-212.
42. Soares, L.A.L., A.L. Oliveira, G. González Ortega & P.R. Petrovick (2004) *J. Pharm. Biom. Anal.* **36**: 787-90.
43. Andersen, R.P. & J.A. Sowers (1968) *Phytochemistry* **7**: 293-301.