



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de uma nova metodologia MISPE para  
extração de Taninos**

Rafael Oliveira Martins

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucilia Kato

Goiânia  
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:     **Dissertação**     **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

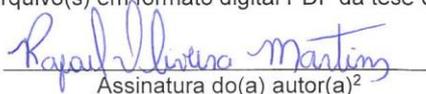
Nome completo do autor: Rafael Oliveira Martins

Título do trabalho: Desenvolvimento de uma nova metodologia MISPE para extração de Taninos

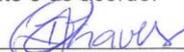
**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  **SIM**     **NÃO**<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 25 / 03 / 2019

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de uma nova metodologia MISPE para  
extração de Taninos**

Rafael Oliveira Martins

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Federal de Goiás  
como parte dos requisitos necessários para  
obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucilia Kato

Goiânia  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Martins, Rafael Oliveira

Desenvolvimento de uma nova metodologia MISPE para extração de Taninos [manuscrito] / Rafael Oliveira Martins. - 2019.  
LII, 52 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves; co-orientadora Dra. Lucília Kato.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2019.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. Tanino Condensado. 2. MISPE. 3. Catequina. I. Chaves, Andréa Rodrigues, orient. II. Título.

CDU 543



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)**

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado de Rafael Oliveira Martins, aluno regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aos dias 18 (dezoito) de fevereiro do ano de 2019 (dois mil e dezenove), com início às 14:00 hrs no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Andréa Rodrigues Chaves (UFG), Lucília Kato (UFG), Livia Flório Sgobbi (UFG) e Joseilson Alves de Paiva (UFT), sob a presidência da primeira, para julgar a dissertação de Rafael Oliveira Martins: "Desenvolvimento de uma nova metodologia MISPE para extração de taninos". A presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra ao candidato para que o mesmo fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, o candidato foi arguido pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves: Aprovado

Prof. Dra. Lucília Kato: Aprovado

Prof. Dra. Livia Flório Sgobbi: Aprovado

Prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva: APROVADO

A seguir, na presença do público e do candidato, a presidente da Banca Examinadora declarou que Rafael Oliveira Martins, candidato ao título de Mestre em Química foi: Aprovado (X); Reprovado ( ). Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, a senhora presidente cumprimentou o candidato e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Themerson Blenner Cavalcante Souza, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 18 de fevereiro de 2019.

Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves (UFG)

Prof. Dra. Lucília Kato (UFG)

Prof. Dra. Livia Flório Sgobbi (UFG)

Prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva (UFT)

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Dra. Andréa Rodrigues Chaves, pela confiança, incentivo e por proporcionar excelentes condições de trabalho em um laboratório bem equipado que possibilitou a realização deste trabalho.

A professora Lucília pelo aceite em me auxiliar neste processo com a sua coorientação.

Aos meus familiares, especialmente minha mamãe Lasára e minha vovó Dinair que não mediram esforços para me ajudar nessa caminhada em Goiânia, mesmo de longe, sempre foram meu apoio. Obrigado!

Aos meus colegas de trabalho do LaCEM pela amizade e cooperação.

A minha amiga Naty pela companhia e por ser parte da minha família em Goiânia.

Ao meu amigo e irmão Cristian Cordeiro, que por muitas vezes foi o meu maior apoio, em momentos que nem eu mesmo achei que fosse superar, por ser sem dúvidas a melhor pessoa que Goiânia me trouxe e por estar marcado na minha história e alma. Te amo.

À CAPES pelo apoio financeiro e ao programa de pós-graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. A todos que contribuíram para minha formação e concretização deste trabalho.

# Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, CÓDIGOS, SIGLAS E UNIDADE DE MEDIDA	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
<b>1.0- Introdução .....</b>	<b>2</b>
1.1- Angico Vermelho ( <i>Anadenanthera macrocarpa</i> ).....	2
1.2- Jabuticaba ( <i>Myrciaria cauliflora</i> ).....	4
1.3- Umbu ( <i>Spondias tuberosa L</i> ).....	5
1.4- Taninos .....	6
1.5- Métodos para extração de Taninos .....	8
1.6- Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction-SPE).....	9
1.7- Polímeros de Impressão Molecular (Molecular Imprinted Polymer-MIP)....	11
<b>2.0- Objetivo Geral.....</b>	<b>15</b>
2.1- Objetivos específicos.....	15
<b>3.0 - Materiais e Métodos .....</b>	<b>17</b>
3.1 - Padrões e Reagentes .....	17
3.3 - Rendimento em sólidos totais (TST).....	18
3.4- Precipitação dos Taninos (Índice de Stiasny) .....	19
3.5 - Determinação do teor de Taninos Condensados .....	19
3.6 - Varredura Infravermelho .....	20
3.7 - Síntese do MIP e NIP .....	20
3.8- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	21
3.9- Cartuchos SPE.....	21
3.10- Extração em Fase Sólida com Polímero Molecularmente Impresso.....	22
3.11- Condições Cromatográficas .....	22
3.12- Validação Analítica .....	23
3.13- Teste de Seletividade do MIP .....	25
<b>4.0 - Resultados e Discussões .....</b>	<b>27</b>
4.1 - Extração de taninos condensados das amostras de Angico Vermelho ...	27
4.2 - Análise por espectroscopia na região do UV-vis .....	29
4.3 - Determinação do teor de taninos condensados pela curva padrão de Catequina .....	30
4.4 - Infravermelho do Tanino extraído .....	31
4.5- Caracterização dos MIPs e do NIP.....	33

<b>4.6 – Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>34</b>
<b>4.7- Estudo do Efeito Imprinting e Seletividade do MIP</b> .....	<b>36</b>
<b>4.8 – Extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso</b> .....	<b>38</b>
<b>4.8.1- Teste de seletividade usando padrão de Catequina</b> .....	<b>38</b>
<b>4.8- Extração e detecção de tanino condensado do extrato aquoso do Angico Vermelho, Jabuticaba e Umbu</b> .....	<b>39</b>
<b>4.9- Figuras de Mérito</b> .....	<b>42</b>
<b>5.0- Considerações Finais</b> .....	<b>46</b>
<b>6.0- Referências Bibliográficas</b> .....	<b>48</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Casca do Angico Vermelho .....	3
<b>Figura 2.</b> Jaboticabeira .....	4
<b>Figura 3.</b> Fruto do Umbu.....	5
<b>Figura 4.</b> Estrutura característica de um tanino condensado e hidrolisável.....	6
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da síntese do Polímero Molecularmente impresso (MIP), adaptado .....	12
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do processo de extração e precipitação de taninos condensados .....	18
<b>Figura 7.</b> Cartuchos SPE confeccionados .....	21
<b>Figura 8.</b> Cromatograma obtido e otimizado para a solução de catequina 1mg/mL <sup>-1</sup> .....	23
<b>Figura 9.</b> Valores obtidos na extração das amostras de Angico Vermelho .....	27
<b>Figura 10.</b> Varredura UV feita no extrato da amostra ANG-2 .....	29
<b>Figura 11.</b> Curva de Calibração para a Catequina obtida pelo método Vanilina-HCl .....	30
<b>Figura 12.</b> Reação envolvida durante o método Vanilina-HCl .....	31
<b>Figura 13.</b> Infravermelho do tanino da ANG-2 (A) e Infravermelho do tanino da ANG-1 (B).....	32
<b>Figura 14.</b> a) Comparação dos espectros de infravermelho das amostras de ANG-2 e MIP b) Infravermelho obtido para o NIP .....	33
<b>Figura 15.</b> Comparação dos espectros de infravermelhos entre MIP do extrato e Sílica C-18 pura.....	34
<b>Figura 16.</b> Micrografias para o MIP sintetizado empregando o tanino extraído como template.....	35
<b>Figura 17.</b> Micrografias para o MIP sintetizado empregando a molécula de Catequina como template .....	35
<b>Figura 18.</b> Micrografias para o NIP .....	35
<b>Figura 19.</b> Estruturas químicas para (A) Catequina e (B) Quercetina .....	37
<b>Figura 20.</b> Gráfico de barras referente a área obtida nos cromatogramas para o pico referente as amostras de água enriquecidas com solução padrão catequina após extração SPE empregando as fases extratoras MIP catequina, MIP extrato de tanino e NIP .....	38

<b>Figura 21.</b> Cromatograma obtido para extrações de amostras de água fortificadas com solução padrão de catequina .....	39
<b>Figura 22.</b> Cromatograma obtido após a etapa de extração para amostras reais do extrato aquoso da amostras da casca do Angico Vermelho.....	40
<b>Figura 23.</b> Cromatograma obtido após a etapa de extração para amostras reais do extrato aquoso da amostras da casca do Umbu .....	40
<b>Figura 24.</b> Cromatograma obtido após a etapa de extração para amostras reais do extrato aquoso da amostras da casca da Jabuticaba .....	41
<b>Figura 25.</b> Gráfico de barras para a área obtida nos cromatogramas das amostras de extrato de Angico Vermelho após extração de SPE usando fases extrativas MIP catequina, extrato de tanino MIP e NIP .....	42
<b>Figura 26.</b> Curva de calibração para a catequina na faixa de concentração de 100 a 700 mg L <sup>-1</sup> . .....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fases de SPE comumente comercializadas, e suas aplicações .....	10
<b>Tabela 2.</b> Aplicações de MIP para extração de compostos fenólicos em diferentes matrizes .....	13
<b>Tabela 3.</b> Valores obtidos de concentração obtidos para a Quantificação de taninos condensados das amostras de ANG-1 e ANG-2 pelo método UV-vis .	31
<b>Tabela 4.</b> Principais atribuições para absorções no infravermelho .....	32
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros de Seletividade, Kd, R e IF, para o MIP's e NIP .....	37
<b>Tabela 6.</b> Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação para o método MISPE/LC-UV .....	43
<b>Tabela 7.</b> Exatidão, Precisão e Recuperação para o MIP confeccionado com o Tanino extraído .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS, CÓDIGOS, SIGLAS E UNIDADE DE MEDIDA

**ANG-1** – Casca da árvore de Angico 1

**ANG-2** – Casca da árvore de Angico 2

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**C<sub>i</sub>** – Concentração inicial

**C<sub>f</sub>** - Concentração final

**CME** - Concentração média experimental

**CR** - Concentração real

**CT** - Concentração teórica

**cm<sup>-1</sup>** – Centímetro<sup>-1</sup>

**dpe** - Desvio padrão experimental

**Ee** - Exatidão inter-dias

**FTIR**- Fourier-transform infrared spectroscopy

**g** – Gramas

**HCl** – Ácido Clóridrico

**HPLC**- High performance liquid chromatography

**IF** – Imprinting fator

**IS** – Índice de Stiasny

**IV** – Infravermelho

**kV** – quilovolts (10<sup>3</sup> Volts)

**Kd** – Coeficiente de distribuição

**LC/UV** - Cromatografia Líquida Com Detecção Uv

**LOD** - Limite de detecção

**LOQ** - Limite de quantificação

**MEV** – Microscopia eletrônica de varredura

**N** – Normal

**mg** – mili grama (10<sup>-3</sup> grama)

**mL** – mili Litro (10<sup>-3</sup> Litro)

**mm** - Milímetro

**MIP** - Molecularly Imprinted Polymer (Polímero Molecularmente Impresso)

**MISPE**- Extração de fase sólida impressa molecularmente

**NIP** - Non-Imprinted Polymer (Polímero Molecularmente não Impresso)

**nn** - Nanômetro

**Pi** - Precisão inter-dias

**Pe** - Precisão inter-dias

**Rec** - Recuperação

**R<sup>2</sup>** – coeficiente de determinação da regressão linear

**RT** – Teor de Taninos Condensados

**%R** – Porcentagem de remoção

**SPE**- Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)

**TEOS** – Tetraetoxisilano

**TST** – Teor de sólidos totais

**UV**- UV-*vis* detector (Detector UV-*vis*)

**°C** – Graus Celsius

## RESUMO

O presente estudo empregou a síntese e aplicação de matriz polimérica baseada em polímeros molecularmente impressos (MIP) em sistemas de preparo de amostras. Para tanto, avaliou-se duas amostras de cascas de *Anadenanthera macrocarpa* (Angico Vermelho). A extração dos taninos condensados, foi realizada utilizando-se água quente e a precipitação do tanino foi realizada de acordo com a reação de Stiasny. O MIP foi sintetizado empregando a solução extrato do Angico Vermelho como *template* e também a partir de solução padrão de catequina (*template*), além disso, foi sintetizado um NIP (polímero sem a molécula de *template*), e então os polímeros sintetizados foram utilizados em cartuchos de extração em fase sólida (SPE) para extração de amostras de água fortificadas com solução padrão de catequina e amostras reais do extrato bruto. As análises foram feitas por cromatografia líquida com detecção UV (LC/UV). A extração de taninos condensados, mostrou uma diferença no teor de taninos condensados para as amostras de Angico Vermelho. Os MIP's sintetizados foram caracterizados por análises de Espectroscopia de Infravermelho e Microscopia eletrônica de varredura. Ambos MIP's sintetizados apresentaram seletividade para extração SPE de taninos. Entretanto, o MIP sintetizado empregando a catequina como *template* apresentou uma maior especificidade para a extração da catequina. O método SPE empregando as fases MIP'S sintetizadas foi padronizado para análises por LC/UV de amostras de extratos das cascas do Angico Vermelho, Jabuticaba e Umbu. Segundo os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, a maior eficiência de extração foi obtida empregando a fase MIP sintetizada a partir de solução padrão de catequina. O método de LC/UV mostrou  $R^2 > 0.990$ , LOQ ( $80 \text{ mg L}^{-1}$ ) e LOD ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) na faixa de  $\text{mg L}^{-1}$ . A precisão intra e inter dias variaram de 4,8% a 8,3% e 8,5% a 10,1% respectivamente. Os valores de exatidão abrangeram a faixa de 90,6% a 95,6% para os testes inter dias e 93,5% e 100,7%. A recuperação do método variou entre 101,9% a 108,5% nas concentrações avaliadas ( $200, 400$  e  $600 \text{ mg L}^{-1}$ ). Segundo os resultados obtidos, o método MISPE-LC/UV apresentou sensibilidade, repetitividade e exatidão adequadas para a análise de compostos fenólicos em amostras de cascas de Angico-Vermelho, Jabuticaba e Umbu.

**Palavras Chaves:** Tanino Condensado; MISPE; Catequina

## ABSTRACT

The present study employed the synthesis and application of polymer matrix based on molecularly printed polymers (MIP) in sample preparation systems. Two samples of *Anadenanthera macrocarpa* shells (Angico Vermelho) were evaluated. The extraction of the condensed tannins was carried out using hot water and the tannin precipitation was performed according to the Stiasny reaction. The MIP was synthesized using the Angico Vermelho extract solution as *template* and from standard *template* solution. In addition, a NIP (polymer without the *template* molecule) was synthesized, and then the synthesized polymers were used in solid phase extraction (SPE) cartridges for extraction of water samples fortified with standard catechin solution and actual samples of the crude extract. Analyzes were done by liquid chromatography with UV detection (LC/UV). The extraction of condensed tannins showed a difference in the content of condensed tannins for the Angico Vermelho samples. The MIPs synthesized were characterized by analyzes of Infrared Spectroscopy and Scanning Electron Microscopy. Both MIP's synthesized presented selectivity for SPE extraction of tannins. However, the MIP synthesized using the catechin as a *template* showed a higher specificity for catechin extraction. The SPE method using the synthesized MIP'S phases was standardized for LC/UV analysis of the extracts from the barks of Angico Vermelho, Jabuticaba and Umbu. According to the results obtained by high performance liquid chromatography, the highest extraction efficiency was obtained using the MIP phase synthesized from standard catechin solution. The LC/UV method showed  $R^2 > 0.990$ , LOQ (80 mg L<sup>-1</sup>) and LOD (10 mg L<sup>-1</sup>) in the mg L<sup>-1</sup> range. The intra and inter day precision ranged from 4.8% to 8.3% and 8.5% to 10.1% respectively. Accuracy values ranged from 90.6% to 95.6% for inter-day tests and 93.5% and 100.7%. The recovery of the method ranged from 101.9% to 108.5% at the concentrations evaluated (200, 400 and 600 mg L<sup>-1</sup>). According to the results, the MISPE-LC/UV method presented adequate sensitivity, repeatability and accuracy for the analysis of phenolic compounds in samples from Angico-Vermelho, Jabuticaba and Umbu barks.

**Key Words:** Condensed Tannin; MISPE; Catechin

# INTRODUÇÃO

## 1.0- Introdução

A utilização de plantas medicinais para a manutenção ou recuperação da saúde, ocorre desde os primórdios da humanidade (GIRALDI; HANAZAKI, 2010). Através da utilização empírica destas plantas, foi possível a descoberta de seus benefícios para o tratamento de enfermidades, contribuindo assim para a descoberta de compostos bioativos, que são em grande parte os princípios utilizados para a fabricação dos fármacos conhecidos nos dias atuais (PINTO et al., 2002). É importante salientar, que o estudo de produtos naturais tem se tornado um campo promissor, seja visando a caracterização de novas moléculas e princípios ativos, ou para aplicação das mesmas em benefício da manutenção da vida.

### 1.1- Angico Vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*)

A espécie *Anadenanthera macrocarpa* conhecida também como Angico é uma árvore que abrange as espécies arbóreas dos gêneros *Piptadenia*, *Parapiptadenia* e *Anadenanthera* da família Mimosoideae. A sua diversidade de espécies pode ser encontrada em toda América Tropical e Subtropical, sendo que a maior parte desta diversidade se encontra no Brasil (DIAS et al., 2012). A sua distribuição geográfica em diferentes solos é abrangente, sendo observada em solos secos e úmidos, considerada tolerante a solos rasos, compactados e encharcados (GONÇALVES et al., 2008). Dentre as espécies de Angico conhecidas e catalogadas, os gêneros do Angico vermelho se destaca como sendo a maior em distribuição geográfica, encontrada desde o norte da Bolívia até o sul da Argentina, e em todo Brasil com exceção de algumas regiões no sul (GONÇALVES et al., 2012). É considerada uma espécie pioneira, ou seja, é uma espécie resistente aos fatores abióticos do ambiente, além disso, apresenta um rápido crescimento e possui grande aplicação para programas de reflorestamento (GONÇALVES et al., 2008).

A árvore do Angico Vermelho é facilmente reconhecida por suas características: possui consigo um caule tortuoso e mediano e a casca grossa e avermelhada (GONÇALVES et al., 2012).



**Figura 1.** Casca do Angico Vermelho

**Fonte:** Disponível em: <<https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/8636-2/>> Acessado: 28/11/18

Estudos sobre as árvores do gênero *Anadenanthera*, mostram que a árvore é extremamente utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças do sistema respiratório, em processos inflamatórios e cicatrizações (FIGUEREDO et al., 2013). Além disso, essas atividades biológicas que árvores do gênero *Anadenanthera* apresentam, podem ser atribuídas a compostos específicos, sendo estes, os compostos fenólicos, tais como os taninos condensados. A extração dos compostos fenólicos presentes no angico vermelho se apresenta como uma opção promissora, visando as possíveis aplicações que estes compostos podem ter para a indústria farmacêutica, alimentícia, produção de tintas, e indústrias de adesivos naturais para madeira.

Segundo Paes e colaboradores (2010) os taninos podem representar de 2 a 40% da massa seca da casca de várias espécies florestais. Portanto, estudar o potencial tânico da casca do angico vermelho é fundamental, assim como buscar uma alternativa para a extração destes compostos de forma mais econômica.

## 1.2- Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)

A Jabuticabeira pertence à família Myrtaceae, é uma árvore que tem a sua origem no centro-sul do Brasil. Dentre as suas espécies conhecidas, a *Myrciaria cauliflora* e a *Myrciaria jabuticaba* destacam-se pela sua abrangência e maior consumo (ASQUIERI; SILVA; CÂNDIDO, 2009).

O fruto da Jabuticabeira é chamado de Jabuticaba, e apresenta um tamanho médio, sendo a casca de seus frutos de cor preta, fina e frágil, com a polpa branca, ligeiramente ácida e doce. A Jabuticabeira é uma frutífera que gera muito interesse, devido a sua alta produtividade e aplicação de seu fruto. A casca da Jabuticaba possui grande aplicação, que vai desde a produção de suco, corante a até mesmo a extração de compostos bioativos (ASCHERI; ASCHERI; CARVALHO, 2006)



**Figura 2.** Jabuticabeira

**Fonte:** Disponível em: < <http://thegreenestpost.com/cientistas-brasileiros-descobrem-uso-de-casca-de-jabuticaba-para-combate-a-diabete/> > Acessado em: 10/01/2019

O estudo dos compostos presentes na jabuticaba e também a sua atividade biológica já é relatado na literatura, onde foi constatado que a Jabuticaba possui um alto teor de compostos fenólicos tais como as antocianinas e taninos condensados. Sendo estes compostos os possíveis responsáveis pela atividade biológica observada neste fruto, tal como a atividade antioxidante (REYNERTSON et al., 2008; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2010).

Visto que a casca da Jabuticaba é descartada durante processos industriais, a extração de compostos fenólicos se mostra uma alternativa econômica para obtenção dos mesmos.

### 1.3- Umbu (*Spondias tuberosa* L)

O Umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) pertence à família Anacardiaceae. É uma árvore de origem do semiárido nordestino, encontrado principalmente na caatinga. O seu fruto em geral apresenta coloração amarela, casca fina e lisa, possuindo um endocarpo que é chamado de “caroço”, grande, branco e enrugado. Além disso, o seu fruto é conhecido por ser uma fonte de compostos bioativos (DUTRA et al., 2017).



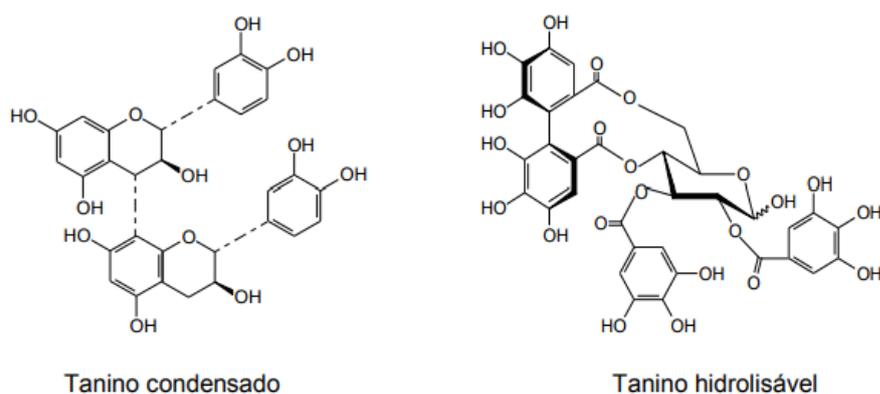
**Figura 3.** Fruto do Umbu

As cascas do fruto do Umbuzeiro contêm fitoquímicos em quantidades relevantes para a sua extração, com destaque para os compostos fenólicos. Sendo estes, os possíveis responsáveis pela atividade biológica que o fruto exhibe (MELO; ANDRADE, 2010). Santos e colaboradores (2018) realizaram a quantificação dos compostos fenólicos presentes na casca do Umbu e encontraram um valor médio de  $1,65 \pm 0,47 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de Antocianinas, atribuindo assim ao fruto o seu grande potencial para a extração destes compostos fenólicos.

## 1.4- Taninos

Os taninos são compostos polifenólicos, e podem ser caracterizados pela presença de unidades de hidroxila ligados ao anel benzênico e podem ter outros grupos contidos em sua estrutura tais como alguns ácidos orgânicos e glicosídeos (PAES et al., 2013).

Comumente, são classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Ambas possuem propriedades estruturais e químicas características, e podem ser encontrados em grande parte do reino vegetal (GRASEL; FERRÃO; WOLF, 2016). Suas estruturas estão representadas na Figura 4.



**Figura 4.** Estrutura característica de um tanino condensado e hidrolisável  
(GRASEL; FERRÃO; WOLF, 2016)

Os compostos fenólicos são formados a partir do metabolismo secundário das plantas, sendo originados nas vias bioquímicas do ácido chiquímico e fenilpropanoídico, além disso, são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas (DIAS et al., 2016). A sua presença no reino vegetal está associada principalmente a fatores de proteção da planta, porém também podem ser originados através de condições como: estresse, pela ação de uma infecção, fermentos e radiação ultravioleta (NACZK; SHAHIDI, 2004). Os fenóis constituem um grupo bastante heterogêneo e dentre esse grupo destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, ligninas e taninos, onde cada classe possui uma estrutura característica e propriedades físico-químicas distintas (SARTORI et al., 2014).

Os taninos hidrolisáveis são facilmente degradados por ação enzimática ou química. A sua estrutura é formada por uma parte central constituído por uma unidade de carboidrato ligada por ligações ésteres a partes fenólicas. A parte fenólica de sua estrutura é formada de um ácido fenólico como o ácido gálico e outros originados da oxidação deste ácido. Apesar de serem encontrados em grande parte dos vegetais, os taninos hidrolisáveis não são tão abundantes quanto os condensados.

Os taninos condensados são formados por polímeros de flavan-3-ols (catequina) ou flavan 3,4 diols (leucoantocianidina), sendo que a formação específica de um tanino condensado vai conferir propriedades diferentes aos alimentos, tais como: adstringência, odor e cor (MONTEIRO et al., 2005).

A extração destes compostos é relativamente simples, visto que possuem uma boa solubilidade em solventes orgânicos polares, ou em água, sendo muitas vezes a água utilizada em por ser economicamente viável. A extração de taninos em água é geralmente realizada em temperatura na faixa de 70 a 100°C para facilitar a solubilidade com a fase extratora. A quantificação destes compostos é realizada geralmente por ensaios colorimétricos, já oferecem características estruturais para tal fim (SARTORI et al., 2014).

A obtenção de taninos por formas economicamente viáveis é de grande interesse, pois possuem um alto valor econômico agregado. Comercialmente, os taninos podem ser utilizados como agentes de curtimento na indústria de couro, além de poderem ser voltados para a indústria de corantes. Outros usos incluem: fabricação de adesivos, utilização em formulações de fármacos, e também na indústria farmacêutica (GRASEL; FERRÃO; WOLF, 2016). Além disso, a extração de taninos através de resíduos vegetais, tais como a casca de determinada árvore e/ou fruto que por ventura não seja aproveitada em algum procedimento industrial, é alternativa viável para obtenção de taninos e possível aplicação em setores industriais (MAMET et al., 2018).

## 1.5- Métodos para extração de Taninos

Os taninos são extraídos principalmente da casca ou do caule de algumas espécies (MORI et al., 2003). A utilização de solventes orgânicos em métodos de extração tem sido relatada como a principal forma para a extração de compostos fenólicos (SARTORI et al., 2014). Apesar de apresentar bons resultados de rendimento de extração destes compostos, a utilização de solventes como fase extratora ainda não é um método economicamente viável, devido à grande quantidade de solvente utilizado durante o procedimento, além de ir contra conceitos estabelecidos da Química Verde. Para resolver este problema, a extração com água quente torna-se um meio alternativo que apresenta resultados similares aos obtidos pelas extrações com solventes. Yuliana e colaboradores (2014) realizaram o estudo da extração de taninos na planta mogno das Índias ocidentais, usando diferentes solventes. Encontrando o rendimento para a extração: 100% de água: 26,6%; 75% água + 25% metanol: 30,4%; 100% de metanol: 31,0% e 100% de acetona: 3,7%.

Apesar da utilização da água como fase extratora ser eficiente, algumas plantas apresentam dificuldades na extração dos constituintes. Para resolver este problema, foram relatados trabalhos onde optou-se por fazer a adição de algumas substâncias para a extração mais eficiente de taninos. Substâncias como sulfito de sódio e carbonato de sódio foram relatados em trabalhos (MORI et al., 2003; CARNEIRO et al., 2009) e (FERREIRA et al., 2009) respectivamente. Além disso, Mori et al., (2003) empregaram soluções de hidróxido de sódio e de sulfito de sódio, obtendo os valores de rendimento de 19,18% e 21,49% respectivamente.

Futuras análises desses compostos extraídos, demonstram dificuldades para a obtenção de resultados que não sofram tanto com a ação de interferentes presentes na amostra. Técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (LC- High Performance Liquid Chromatography) não permitem análises diretas para algumas amostras e ou estão suscetíveis a resultados errôneos ou imprecisos devido à presença de interferentes na matriz. Desta forma, técnicas de preparo de amostras tal como a extração em fase sólida (SPE) permite pré-concentrar e extrair o analito e ainda eliminar interferentes (LOPES, 2009). A

técnica SPE tem sido utilizada como uma forma de pré concentração e extração do analito antes da análise propriamente dita.

### **1.6- Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction-SPE)**

A SPE é considerada uma técnica de separação líquido-sólido rápida, sensível e eficiente. É utilizada com o intuito de: extrair, concentrar ou purificar um ou mais analito(s) semi-voláteis e não voláteis presente em amostras complexas. Os mecanismos físico-químicos que atuam nesta técnica são o de retenção dos analitos de interesse na fase sólida por adsorção, partição (fase normal e fase reversa), troca iônica e exclusão. Sendo relatado ainda a possibilidade de envolver interações não polares, polares e iônicas (JARDIM, 2010).

O procedimento da SPE é relativamente simples, barato e requer pouca utilização de solvente o que viabiliza economicamente a utilização da técnica. A técnica emprega a utilização de cartuchos, colunas, ponteiras e demais outros materiais. Sendo que o suporte mais utilizado para a SPE é o cartucho, onde consiste em um recipiente na forma de seringa preenchido com o material utilizado como sorvente (EIROA et al., 2016). As etapas envolvidas no procedimento da SPE podem ser compreendidas por 4 etapas principais: **1-** Ativação e condicionamento dos sítios ativos no material utilizado como sorvente. **2-** Percolação da amostra. **3-** Lavagem ou eliminação de interferentes. **4-** Eluição dos compostos de interesse (LANÇAS, 2004). Sendo assim, a técnica é excelente para concentrar analitos de uma matriz líquida e apresenta como vantagens a redução do volume de solvente utilizado, eliminação das formações de emulsões e enriquecimento de analitos presentes em uma matriz no nível traço (HE et al., 2017).

O material utilizado como adsorvente é comumente chamado de sorvente, e seu papel é fundamental para a técnica de SPE, pois é este material que irá reter seletivamente alguns dos componentes presentes na amostra. A escolha do sorvente deve ser feita com cautela, pois depende do analito de interesse.

Ou seja, para a escolha do material ideal utilizado como sorvente, deve ser estudado: a estrutura química do analito, as propriedades do material sorvente e a composição da matriz (JARDIM, 2010). Apesar de poder ser confeccionado manualmente, vários cartuchos SPE contendo sorventes diferentes já são encontrados comercialmente. O material mais utilizado como sorvente e que vem em cartuchos é a fase C18 (RODRIGUEZ; LOPEZ; BARCELÓ, 2007). Porém, ainda assim, existe uma grande disponibilidade de outros sorventes comerciais e para aplicação de uma variedade de matriz. A Tabela 1, mostra algumas das fases mais comumente utilizadas e comercializadas.

**Tabela 1.** Fases de SPE comumente comercializadas, e suas aplicações

<b>Fase</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Modo de interação</b>	<b>Compostos</b>	<b>Matriz</b>
<b>C18</b>	Hidrofóbico	Fase reversa	Compostos polares a apolares	Fluídos biológicos, amostra aquosas
<b>Fenil (PH-S)</b>	Hidrofóbico	Fase reversa	Compostos Não polares e de Média-polaridade	Fluídos biológicos
<b>Sílica (SI-S)</b>	Hidrofílico	Fase normal	Compostos não polares e compostos aromáticos de polaridade média	Orgânicos apolares, óleos, lipídios
<b>Amino (NH<sub>2</sub>-S)</b>	Hidrofílico	Fase normal	Compostos polares	Fluídos biológicos, amostra aquosas, orgânicos tamponados
<b>Troca intensa de cátions (SAX)</b>	Troca de íons	Troca de íons	Compostos aromáticos polares a compostos aromáticos de polaridade média	Fluídos biológicos, amostra aquosas, orgânicos tamponados
<b>Troca fraca de cátions (WCX)</b>	Troca de íons	Troca de íons	Compostos básicos	Fluídos biológicos, amostra aquosas
<b>Troca intensa de ânions (SAX)</b>	Troca de íons	Troca de íons	Compostos básicos fortes	Fluídos biológicos, amostra aquosas
<b>Ciano (CN-S)</b>	Hidrofílico	Fase normal	Compostos polares a compostos de polaridade média	Orgânicos apolares, óleos, lipídios
<b>Pesticida Florisil (FL-S)</b>	Hidrofílico	Fase normal	Compostos polares	Ideal para compostos polares em matriz apolar
<b>Poliamina (P6)</b>	Hidrofílico	Fase reversa	Ácidos carboxílicos, fenólicos e nitro aromáticos	Matrizes aquosas e de polaridade média

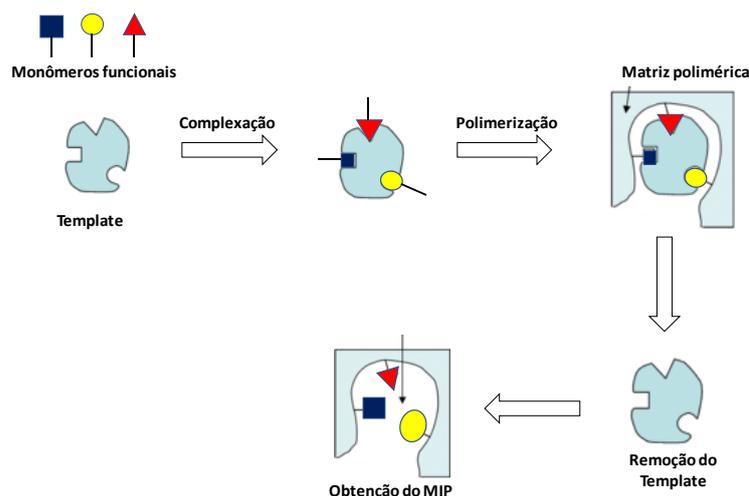
Fonte: Disponível em < <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/phase-selection.html> > Acessado: 29/11/2018

O desenvolvimento de novos sorventes para aplicação na técnica de SPE é uma área de grande destaque. Cujo o principal objetivo é uma maior seletividade e específica para os compostos de interesse. Sendo assim, a utilização de MIP'S (Molecular Imprinted Polymers) apresenta-se como uma forma alternativa para a extração em cartuchos de SPE.

### **1.7- Polímeros de Impressão Molecular (Molecular Imprinted Polymer-MIP)**

Os polímeros de impressão molecular (MIP) foram desenvolvidos com o intuito de aplica-los em processos de detecção, separação e catálise em diferentes matrizes (SHAHAR; TAL; MANDLER, 2016). Os MIPs são como uma rede polimérica 3D onde são utilizados para a ligação seletiva e posterior detecção de moléculas alvo em diferentes matrizes. Após a sua síntese, o MIP obtido contém em si cavidades tridimensionais específicas. Ou seja, o espaço onde se localizava a molécula molde servirá de armadilha, quando o polímero for submetido em uma amostra complexa, podendo interagir especificamente com a molécula que apresentar as mesmas características que a molécula molde e assim realizar a extração do analito (MIDDELEER; DUBRUEL; SAEGER, 2016).

A reação de polimerização ocorre na presença de uma ou mais molécula(s) molde, chamada de *template*, este *template* representa o analito alvo. São adicionados monômeros funcionais para formar o complexo de polimerização. As moléculas de reticulação são aplicadas para estabilizar a estrutura tridimensional do MIP. O processo da polimerização ocorre na presença de um solvente com a ação de um iniciador. Após a completa polimerização do MIP, a(s) molécula(s) *template* é/são removida(s) através de processos adequados de lavagem, e essas cavidades antes ocupadas pela molécula *template* ficam disponíveis para interação com novas moléculas alvo (MIDDELEER; DUBRUEL; SAEGER, 2016). A Figura 5 ilustra o processo de síntese de um MIP.



**Figura 5.** Representação esquemática da síntese do Polímero Molecularmente impresso (MIP), adaptado

(SCHWEITZ; ANDERSSON; NILSSON, 1998)

Alguns parâmetros requerem uma maior atenção antes e durante a síntese do polímero molecularmente impresso, sendo alguns destes: a escolha do(s) monômero(s) funcional(is) e de reticulação, solvente, temperatura de polimerização e também o *template* utilizado (SCHWEITZ; ANDERSSON; NILSSON, 1998). A polimerização em torno da molécula ligante de modelagem constitui o passo chave para a síntese do MIP, pois a mesma, vai influenciar na estrutura tridimensional do polímero sintetizado. Além disso, após a síntese do MIP é recomendado que o mesmo seja submetido a procedimentos de lavagem utilizando solventes, ou mesmo a água (TAMAYO; TURIEL; ESTEBAN, 2007). Devido à dificuldade em remoção da molécula *template* em procedimentos de lavagem, é relatado a utilização de uma molécula que seja um análogo estrutural como *template* na síntese, com o intuito de diminuir a possibilidade de falsos positivos (PICHON, 2007).

É juntamente com a SPE que se encontra a sua maior aplicação. As partículas de MIP são bastante utilizadas para extrações em SPE como forma de pré tratamento de amostras antes da cromatografia líquida (LC). A utilização do MIP nesta técnica já é chamada de Extração de fase sólida impressa molecularmente (MISPE). Sendo a mesma já amplamente aplicada na literatura para a extração de compostos fenólicos, mostrando-se assim uma técnica auxiliar para a diminuição de interferentes presentes em matrizes naturais e

demonstrando uma grande aplicação como preparo de amostras para várias técnicas analíticas (MIDDELEER; DUBRUEL; SAEGER, 2016). A Tabela 2 apresenta algumas aplicações dos polímeros molecularmente impressos para diferentes compostos fenólicos e em diferentes matrizes.

**Tabela 2.** Aplicações de MIP para extração de compostos fenólicos em diferentes matrizes

<b>Matriz</b>	<b>Analito</b>	<b>Técnica de Análise</b>	<b>Referência</b>
<b>Vinho Tinto</b>	Ácido Gálico e Ácido protocatecuico	LC-MS	(DENDERZ; LEHOTAY, 2014)
<b>Chá Vermelho e Chá Branco</b>	Catequina	LC-PDA-FL	(LÓPEZ et al., 2012)
<b>Resíduos de Uva e Cacau</b>	Catequina	LC-PDA-FL	LÓPEZ, et al. 2012
<b>Extrato de Herba Lysimachiae</b>	Quercetina	LC-UV	(HONG; CHEN, 2013)
<b>Extrato de Opúntia</b>	Quercetina	LC-UV	(PAKADE; MOLEFE; TAVENGWA, 2017)

**LC-PDA-FL:** Liquid Chromatography- photodiode array detector and fluorescence detector

**LC-UV:** Liquid Chromatography-UV-vis

**LC-MS:** Liquid Chromatography-mass spectrometry

A casca de muitos frutos são grandes fontes de compostos fenólicos, bem como as cascas do gênero *Anadenanthera*, onde a mesma tem sido relatada na literatura por apresentar considerável quantidade de taninos (PAES et al., 2010; PAES et al., 2013). Sendo assim, é de suma importância o estudo do potencial de extração de compostos fenólicos nestas mesmas para possível emprego em escala industrial, devido ao valor comercial agregado a estes compostos. Desta forma, neste estudo se propõe uma metodologia de extração de catequina visando maior rendimento de extração.

# OBJETIVOS

## 2.0- Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu na síntese de um polímero molecularmente impresso e emprego do mesmo em dispositivos de extração em fase sólida na extração e pré-concentração de taninos condensados de cascas do Angico Vermelho, Jabuticaba e Umbu.

### 2.1- Objetivos específicos

- Avaliação do teor de taninos de duas amostras de Angico vermelho
- Quantificação do teor de taninos condensados das amostras;
- Síntese de MIP empregando o extrato de Angico vermelho como *template*;
- Síntese do MIP empregando a molécula de catequina como *template*;
- Síntese do polímero sintetizado na ausência de uma molécula molde (*template*);
- Comparação morfologia dos MIP's e do NIP sintetizados e do desempenho destes polímeros como fase extratora dos compostos de interesse;
- Caracterização dos MIPs e NIP sintetizados por Espectroscopia de Infravermelho;
- Desenvolvimento e otimização da metodologia MISPE para a extração e concentração de Catequina no extrato da casca do Angico vermelho, Jabuticaba e Umbu;
- Comparação da seletividade dos MIPs e do NIP desenvolvidos;

# MATERIAIS E MÉTODOS

### **3.0 - Materiais e Métodos**

#### **3.1 - Padrões e Reagentes**

Para realização deste trabalho foram utilizados os seguintes padrões e reagentes: metanol, ácido clorídrico e acetona grau HPLC, adquiridos do fornecedor J.T. Baker (Phillipsburg, USA); cartucho de SPE C-18 do fornecedor Supelco (São Paulo, Brasil). Padrão de Catequina, fabricante Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Sílica Gel pelo fornecedor Maxherey-Nagel, fabricado na Alemanha. Tetraetilortosilicato (TEOS) pela Sigma Aldrich (Alemanha). (3-aminopropil) trietoxissilano adquirido pela Sigma Aldrich (Alemanha). Hidróxido de amônio adquirido pela fabricante Sigma Aldrich (Alemanha). Ácido Fórmico adquirido pela Sigma Aldrich (Alemanha). A água empregada neste trabalho foi de grau ultrapurificada (MS2000 WFI, Gehaka).

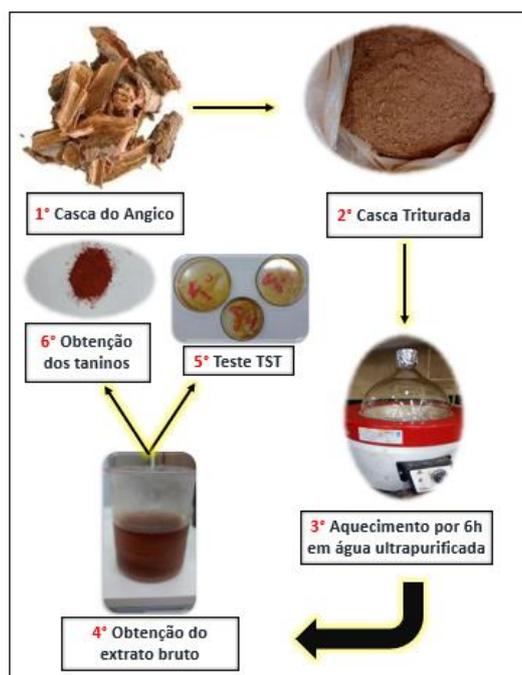
#### **3.2 - Obtenção do extrato aquoso**

Para a realização deste trabalho, optou-se por fazer a utilização de duas amostras de cascas de angico vermelho. A primeira foi coletada no Sítio Recanto Verde, município de Nazário, em 11 de outubro de 2013, sendo que para este trabalho, foi nomeada de ANG-1. A segunda amostra foi coletada na fazenda Samambaia, a 1,5 km da Escola de Agronomia no dia 2 de março de 2017, sendo nomeada de ANG-2. Apesar de serem coletadas em datas diferentes, as amostras foram relatadas possuindo idades próximas.

As amostras foram previamente secas e rigorosamente trituradas em um moinho de facas da marca Tec Mill TE-633. Para a extração, utilizou-se 50 gramas da amostra. O material foi transferido para um balão de fundo redondo de para extração por refluxo, utilizando-se 1000 mL de água ultrapurificada. O procedimento de extração foi conduzida à aquecimento em 105 °C por 6 horas. Após este procedimento, foi possível a obtenção do extrato aquoso das amostras de angico vermelho.

O mesmo procedimento de extração foi utilizado para as amostras de casca de Jabuticaba e Umbu.

Após este período, filtrou-se o extrato ainda quente. O filtrado foi transferido para um béquer, coberto com papel filme e devidamente armazenado sobre refrigeração (4°C). O procedimento descrito é representado na Figura 6.



**Figura 6.** Representação esquemática do processo de extração e precipitação de taninos condensados

Fonte: Elaborada pelo autor

### 3.3 - Rendimento em sólidos totais (TST)

Para a determinação do teor de sólidos totais, foram utilizadas três alíquotas com aproximadamente 10 mL do extrato aquoso. Estas alíquotas foram levadas a aquecimento em estufa (FANEM modelo 315) a uma temperatura de  $\pm 100^{\circ}\text{C}$  até que a massa estivesse constante. Sendo assim, o teor de sólidos totais (TST) pôde ser determinado através da Equação 1:

$$\text{Eq. 1} \quad \text{TST}(\%) = \frac{M2}{M1} \times 100$$

**M2:** Massa da alíquota após secagem

**M1:** Massa adicionada na alíquota

### 3.4- Precipitação dos Taninos (Índice de Stiasny)

A precipitação dos taninos foi realizada em um balão de 50 mL, reagindo-se 20 mL do extrato aquoso, 10 mL de água, 4 mL de formaldeído e 2 mL de ácido clorídrico 10 N. O balão foi submetido a aquecimento em uma temperatura de  $\pm 110$  °C por 30 minutos, sob agitação constante. A solução foi filtrada em cadinho com 3 mm de porosidade previamente pesado. Após a secagem o cadinho foi colocado em estufa a 100 °C até atingir massa constante. O índice de Stiasny (IS) foi determinado através da Equação

:

$$\text{Eq. 2} \quad \text{IS}(\%) = \frac{M2}{M1} \times 100$$

**M2:** Massa do precipitado de taninos.

**M1:** Massa de 20 mL do extrato aquoso

Através do índice de Stiasny, foi possível determinar o teor de taninos contidos (RT) no extrato da casca ANG-1 e da casca ANG-2, a partir da Equação.

$$\text{Eq. 3} \quad \text{RT}(\%) = \text{TST} \times \text{IS}$$

**TST:** Totais de sólidos.

**IS:** Índice de Stiasny

### 3.5 - Determinação do teor de Taninos Condensados

Os taninos condensados foram determinados pelo método de reação com a vanilina. Para isso, utilizou-se 1 mL do extrato aquoso das amostras de ANG-1 e ANG-2, reagindo-se com 5 mL de mistura Vanilina:HCl 8% 1:1, v:v. Essa mistura foi colocada em tubos falcon e coberta com papel alumínio, para reação por 20 minutos em banho maria a uma temperatura de 30 °C. Após este período, as soluções foram analisadas por espectroscopia UV-vis usando o equipamento Lambda 45 da PerkinElmer com o comprimento de onda de 500 nm, disponível na Central Analítica do Instituto de Química da UFG.

O mesmo procedimento foi realizado para a construção da curva de calibração, utilizando solução padrão de catequina, em faixa de concentração de 0,0002 a 0,0010 g/mL<sup>-1</sup>.

### 3.6 - Varredura Infravermelho

As análises de espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier, foram realizadas na central analítica localizada no IQ-UFG empregando o equipamento PerkinElmer, modelo Spectrum 400.

Os espectros foram obtidos dos precipitados de tanino das amostras de ANG-1 e ANG-2, na faixa de 450 a 4500  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.7 - Síntese do MIP e NIP

Os polímeros molecularmente impressos foram sintetizados segundo protocolo adaptado (ARABI et al., 2016). Para tanto, reagiu-se 0,5 g de sílica, dispersos em 160 mL de água deionizada, com 20 mL de Hidróxido de Amônio a 25% e 100 mL de Metanol.

Em seguida foram misturados 8,0 mL de tetraetilortossilicato, 1,0 mL de APTS (3-Aminopropil-trietoxisilano) e como *template*, foi usado 0,534 g do precipitado de tanino obtido pelo extrato da amostra de ANG-2. A mistura reacional foi mantida em agitação por 24h à (25 °C). Após esse tempo a mistura foi filtrada e o filtrado foi colocado em estufa à aproximadamente 100 °C por 24 horas. Após seco, o MIP foi submetido a lavagem com acetona em sistema soxhlet por 24 horas. Após a lavagem o MIP foi retirado do soxhlet e seco em temperatura ambiente por mais 24 horas e então armazenado sobre papel filtro e vidro de relógio.

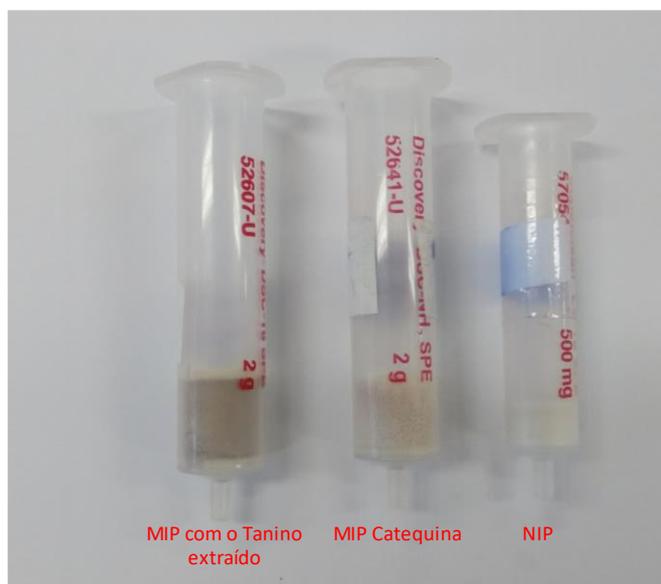
A síntese do MIP de catequina foi realizada utilizando-se a mesma metodologia, porém usando-se 5 mL de uma solução de 1 mg/mL de catequina. A síntese do Polímero não Impresso (NIP), foi realizada de forma similar ao MIP, porém não houve adição do tanino (*template*) na síntese. Após a síntese do NIP, o mesmo foi submetido ao mesmo procedimento de lavagem que o MIP.

### 3.8- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS fabricado pela Thermo Scientific NSS Spectral Imaging. Os experimentos foram realizados no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic).

### 3.9- Cartuchos SPE

Para a confecção dos cartuchos do MIP do extrato e da catequina, foram utilizados cartuchos brancos (sem fase extratora) com volume de 6 mL, a cada cartucho foi adicionada a massa de MIP de 2,0 g. O mesmo procedimento foi realizado para a confecção do cartucho contendo o NIP. Após este processo, o cartucho ainda foi submetido a uma lavagem utilizando-se acetona, e posteriormente acondicionado, utilizando metanol. Na Figura 7 é possível observar o aspecto dos cartuchos produzidos segundo procedimento experimental descrito.



**Figura 7.** Cartuchos SPE confeccionados

Fonte: Elaborada pelo autor

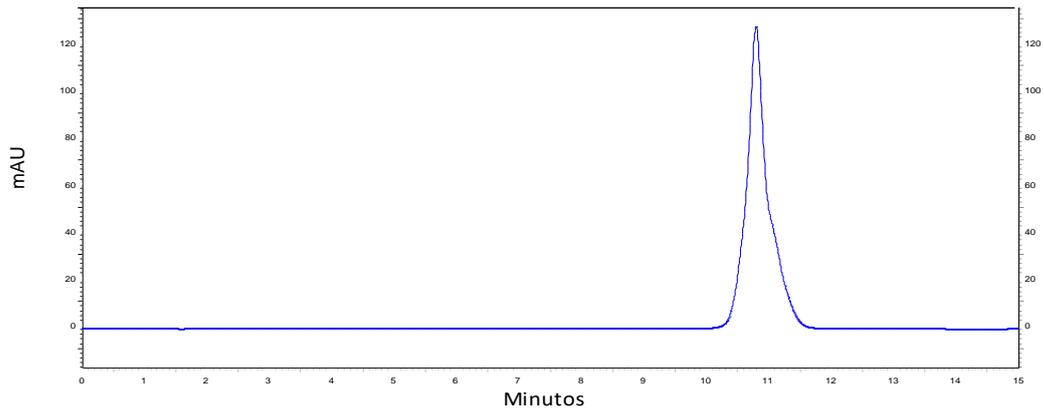
### **3.10- Extração em Fase Sólida com Polímero Molecularmente Impresso**

As extrações foram realizadas com a solução padrão de catequina. Para esse fim, 5 mL de uma solução de  $1 \text{ mg/mL}^{-1}$  do padrão de catequina foi eluído nos cartuchos e, em seguida, 5 mL de metanol, onde foi coletado e levado para análise cromatográfica. Também foi proposta a avaliação dos MIP's realizados na extração de taninos condensados no próprio extrato do Angico Vermelho, Jabuticaba e do Umbu. Para isso, 2 mL do extrato aquoso foram eluídos pelo MIP e NIP, como lavagem foi usado 1 mL de água e, finalmente, 1 mL de metanol usado para eluir os compostos e levar para análise cromatográfica.

### **3.11- Condições Cromatográficas**

Para otimização das condições cromatográficas utilizou-se solução padrão de catequina como referência. A extração SPE no extrato do Angico Vermelho, Jabuticaba e Umbu foi realizada de acordo com o item 3.9. As análises cromatográficas foram feitas por um cromatógrafo líquido acoplado a detector UV-Vis (LC-UV) da Agilent Technologies 1220 infinity. A coluna utilizada para a separação foi uma C18 4.6 x 150mm 5 $\mu\text{m}$  (Agilent, EUA). A condição cromatográfica utilizada foi um gradiente de eluição composto por: solvente A, água/ácido fórmico (249,7:0,3, v/v) e solvente B, metanol/ácido fórmico (249,7:0,3, v/v). A programação utilizada foi a seguinte: 90% A em 14 min, 70% A de 14,00 a 20 min, 55% A em 20 a 25 min, e de 25 a 30 min retornou à condição inicial de 90% A. A temperatura utilizada do forno foi mantida a 25°C. A vazão foi de 1,0 mL/min e o volume injetado de amostra foi de 10 $\mu\text{L}$ .

Nesta condição o tempo de retenção observado para a molécula da catequina foi de 11min. A Figura 8 apresenta o cromatograma obtido nas condições otimizadas.



**Figura 8.** Cromatograma obtido e otimizado para a solução de catequina 1mg/mL<sup>-1</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor

### 3.12- Validação Analítica

A validação analítica para o método de MISPE/LC-UV foi realizada com amostras de água fortificadas com solução padrão de catequina. A linearidade foi avaliada utilizando a regressão linear da área obtida no cromatograma.

A exatidão e precisão intra-dias foi determinada como descrito pela ANVISA (2017), pelas curvas analíticas onde foi comparado a concentração teórica e concentrações determinadas pela curva de calibração analítica em três níveis de concentração (200, 400 e 600 mg L<sup>-1</sup>). Sendo cada ensaio realizado em quintuplicada (n=5). A exatidão e precisão foram calculadas pelas seguintes equações:

**Equação 4:** 
$$Pi(\%) = \frac{dpe}{CME} \cdot 100$$

**Onde:**

Pi (%) = Precisão intra-dias

dpe = Desvio padrão experimental

CME = Concentração média experimental

**Equação 5:** 
$$Ei(\%) = \frac{CME-CT}{CT}$$

**Onde:**

Ei (%) = Exatidão intra-dias

CME = Concentração média experimental

CT = Concentração teórica

A precisão e exatidão inter-dias foi determinada como descrito pela ANVISA (2017), pelas curvas analíticas em ensaios em quintuplicata das soluções das amostras a 200, 400 e 600 mg L<sup>-1</sup> e foram calculadas a partir das equações 6 (precisão) e 7 (exatidão).

**Equação 6:** 
$$Pe(\%) = \frac{dpe}{cme} \cdot 100$$

**Onde:**

Pe(%) = Precisão inter-dias

dpe = Desvio padrão experimental

CME = Concentração média experimental

**Equação 7:** 
$$Ee(\%) = \frac{CME-CT}{CT} \cdot 100$$

**Onde:**

Ee (%) = Exatidão inter-dias

CME = Concentração média experimental

CT = Concentração teórica

Para os cálculos de recuperação, três níveis de concentração foram avaliados: baixa, média e alta. A recuperação relativa foi estimulada de acordo com a equação 8.

**Equação 8:** 
$$Rec(\%) = \frac{CT}{CR} \cdot 100$$

**Onde:**

Rec(%)= Recuperação

CT= Concentração teórica

CR= Concentração real

Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram determinados de acordo com a resolução da ANVISA Art.50 e Art. 57. Onde a mesma diz que a determinação do LOD pode ser realizada por método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco, sendo essa razão maior ou igual a 2:1. O LOQ pode ser avaliado da mesma forma, porém a razão sinal-ruído deve ser no mínimo 10:1.

### 3.13- Teste de Seletividade do MIP

A seletividade do MIP para a catequina na presença de quercetina foi estudada. Para o experimento, um volume de 2 mL de uma mistura binária de catequina/quercetina 500 mg L<sup>-1</sup> foi passado através do cartucho MIP e NIP. Em seguida, foi utilizado um volume de lavagem de 1 mL de água ultrapurificada e, finalmente, 1 mL de metanol foi eluído através dos cartuchos do MIP e levado para análise. O coeficiente de distribuição (Kd), a porcentagem de remoção (%R) e o Imprinting fator (IF) dos MIPs foram calculados de acordo com as equações 8, 9 e 10 (PAKADE; MOLEFE; TAVENGWA, 2017).

$$\text{Equação 8:} \quad Kd = \frac{Ci - Cf}{Cf} \cdot \frac{V(mL)}{\text{Massa do mip MIP ou NIP}}$$

$$\text{Equação 9:} \quad \%R = \frac{Ci - Cf}{Ci} \cdot 100\%$$

$$\text{Equação 10:} \quad IF = \frac{\%R \text{ MIP}}{\%R \text{ NIP}}$$

**Onde:** Ci = Concentração inicial

Cf = Concentração final

V= Volume de solução utilizada

Kd= Coeficiente de distribuição

%R= Porcentagem de remoção

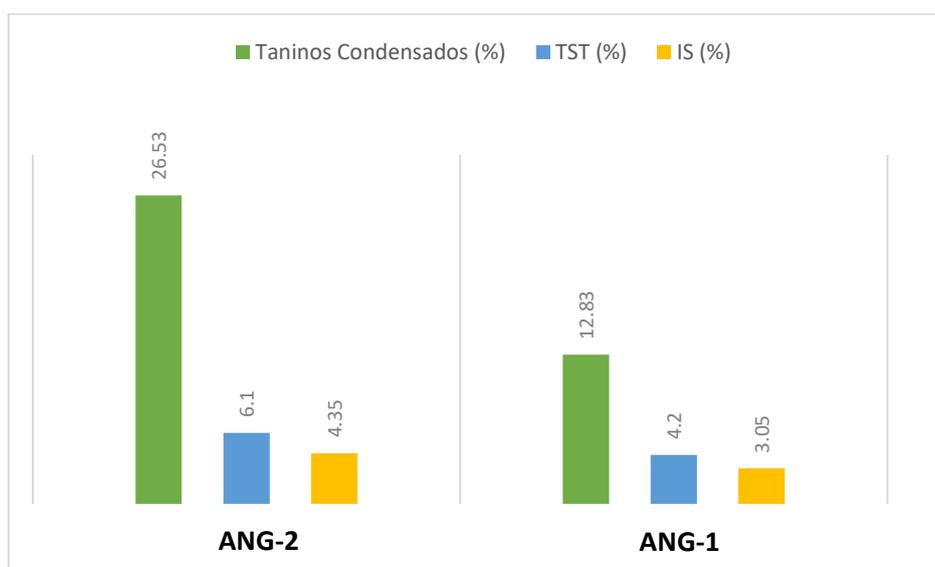
# RESULTADOS E DISCUSSÕES

## 4.0 - Resultados e Discussões

Em etapa inicial as amostras de Angico Vermelho, Jabuticaba e Umbu, foram previamente processadas para auxiliar na extração de taninos. Este processo aumenta a área superficial do sólido e facilita o processo de extração.

### 4.1 - Extração de taninos condensados das amostras de Angico Vermelho

Após o procedimento descrito na sessão 3.2 e exemplificado na Figura 6. O tanino filtrado foi utilizado para o cálculo do índice de sólidos totais (TST), e o índice de Stiasny (IS), segundo as Equações 1 e 2. Sendo assim, foi possível determinar o teor de taninos condensados de acordo com a Equação 3 descrita no procedimento experimental. Os valores obtidos para estes parâmetros são apresentados na Figura 9:



**Figura 9.** Valores obtidos na extração das amostras de Angico Vermelho

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir dos dados obtidos pelo total de sólidos (TST) e Índice de Stiasny (IS) foi possível constatar que a extração de taninos utilizando a casca ANG-2, ofereceu uma maior porcentagem de taninos condensados (26,53%) em relação a ANG-1 (12,83%).

Segundo Sartori e colaboradores (2014) a concentração de taninos em uma espécie vegetal pode variar de acordo com a idade, do órgão da planta coletado, da época ou, ainda, do local de coleta.

Na literatura já é relatada as possíveis influências no teor de compostos fenólicos, sendo trabalhos como o de Pinheiro et al., (2017), que investigaram a influência da radiação UV na produção de flavonoides, sendo constatado que as plantas que foram submetidas a uma alta incidência de raios UV, podem produzir taninos como um mecanismo de defesa contra a incidência desses raios UV. Além disso, o teor de taninos também é influenciado por fatores ambientais, tais como: composição do solo, local de plantio, técnicas de coleta e também armazenagem (TOMAK et al., 2018). O procedimento de armazenagem e secagem das folhas, cascas ou caules, também é um fator que pode vir a influenciar no teor de compostos fenólicos presentes. Negri e colaboradores (2009) investigaram a influência da temperatura de secagem no teor de metabólitos secundários da *Maytenus ilicifolia*, onde foi verificado uma diminuição nos teores médios de metabólitos secundários conforme aumenta a temperatura. Demonstrando que para essa espécie, a temperatura ideal de secagem para as folhas é de 40°C, onde por fim, obtiveram os maiores valores de princípios ativos.

As condições de solo, plantio e coleta para as amostras de angico vermelho utilizadas neste trabalho não foram relatadas, sendo que para um melhor entendimento do porquê as cascas terem apresentado diferentes valores médios de taninos condensados, seria necessário um estudo mais detalhado sobre as possíveis condições citadas anteriormente.

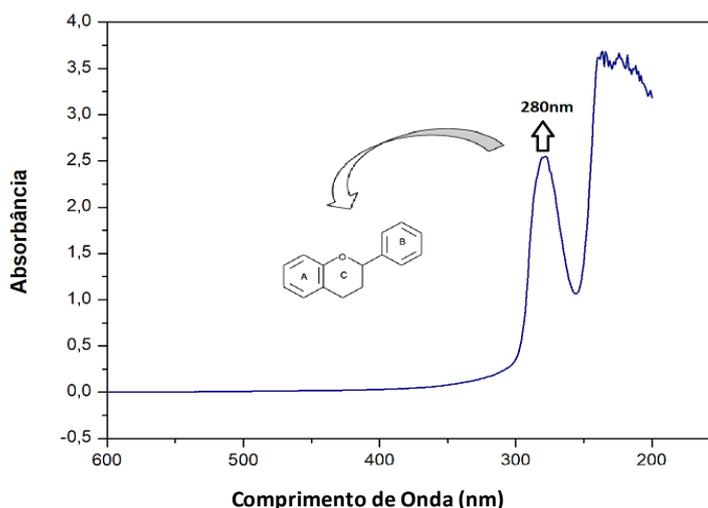
Uma característica típica dos taninos condensáveis é a sua precipitação com formaldeído em meio ácido (GONÇALVES et al., 2008). Os teores de taninos extraídos variam de acordo com a metodologia proposta para a extração. Neste trabalho, optou-se por fazer a extração utilizando água quente ( $\pm 100$  °C) e ainda assim foi constatada uma boa eficiência comparada com outros trabalhos na literatura. PAES e colaboradores (2013) utilizando a mesma metodologia de extração que este trabalho, obtiveram um valor de 15,99% de tanino condensado extraído da casca de *Anadenanthera colubrina*, sendo essa uma variação do angico vermelho. O mesmo autor e colaboradores também optaram por fazer o

estudo usando a adição de sais como sulfito de sódio e utilizando hidróxido de sódio, sendo os valores obtidos 19,18% e 21,49% respectivamente.

#### 4.2 - Análise por espectroscopia na região do UV-vis

Para se avaliar o comprimento de onda de máxima absorção dos compostos em estudo foi realizada análises por espectroscopia na região do UV-vis, o extrato aquoso obtido da amostra da casca de ANG-2 apresentou um maior teor de taninos condensados, sendo assim, optou-se por trabalhar e fazer os testes utilizando o mesmo. A partir destas análises, observou-se que os compostos presentes no extrato apresentavam absorbância máxima em comprimento de onda de 280 nm. Segundo a literatura, acredita-se que possa ser originada do anel A presente em sua estrutura (MAMET et al., 2018).

Outra possível banda que pode ser observada em flavonóides possui absorção máxima em 300-500 nm proveniente do anel B em sua estrutura (HUBER; AMAYA, 2008), porém a mesma não foi observada nas análises UV neste trabalho. A Figura 10 apresenta o espectro obtido para a análise realizada com o extrato de Angico Vermelho obtido da amostra ANG-2.



**Figura 10.** Varredura UV feita no extrato da amostra ANG-2

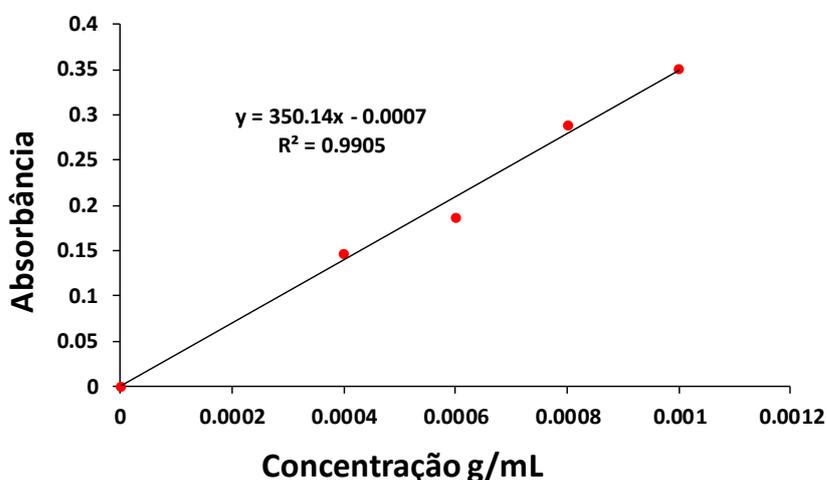
Fonte: Elaborada pelo autor

### 4.3 - Determinação do teor de taninos condensados pela curva padrão de Catequina

Os taninos condensados podem ser quantificados pelo método da proantocianidina, que utiliza a degradação ácida das cadeias poliméricas formando antocianidinas coloridas (SIMÕES; SCHENKEL; MELLO, 2017). Os métodos colorimétricos são amplamente utilizados para a quantificação de taninos condensados, devido a sua simplicidade e sensibilidade.

O método Vanilina-HCl fundamenta-se na reação da catequina com a vanilina, em presença de HCl produzindo uma solução de coloração avermelhada, que é levada para análise no UV, sendo este método específico para a quantificação de taninos condensados (GRASEL; FERRÃO; WOLF, 2016).

Através do método Vanilina-HCl foi possível fazer a quantificação do teor de taninos condensados da amostra de ANG-1 e ANG-2. Sendo a curva determinada por padrão de catequina apresentado na Figura 11. E os teores obtidos para as duas amostras, logo a seguir:



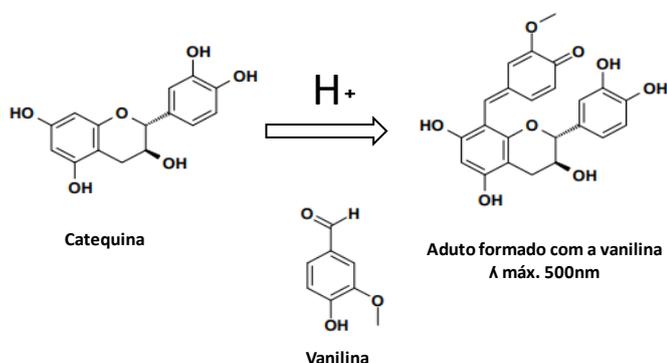
**Figura 11.** Curva de Calibração para a Catequina obtida pelo método Vanilina-HCl

Fonte: Elaborada pelo autor

**Tabela 3.** Valores obtidos de concentração obtidos para a Quantificação de taninos condensados das amostras de ANG-1 e ANG-2 pelo método UV-vis

Amostra	Concentração equivalente de Catequina em $\mu\text{g/mL}^{-1}$
ANG-2	740
ANG-1	310

É importante entender a estrutura química dos taninos condensados e dos flavonoides para o uso adequado do método usando a vanilina. A reação da vanilina envolve a interação de um aldeído aromático, vanilina com o anel de flavonóis metassubstituído para produzir um aduto vermelho. A reação envolvida neste procedimento é apresentada na Figura 12.



**Figura 12.** Reação envolvida durante o método Vanilina-HCl

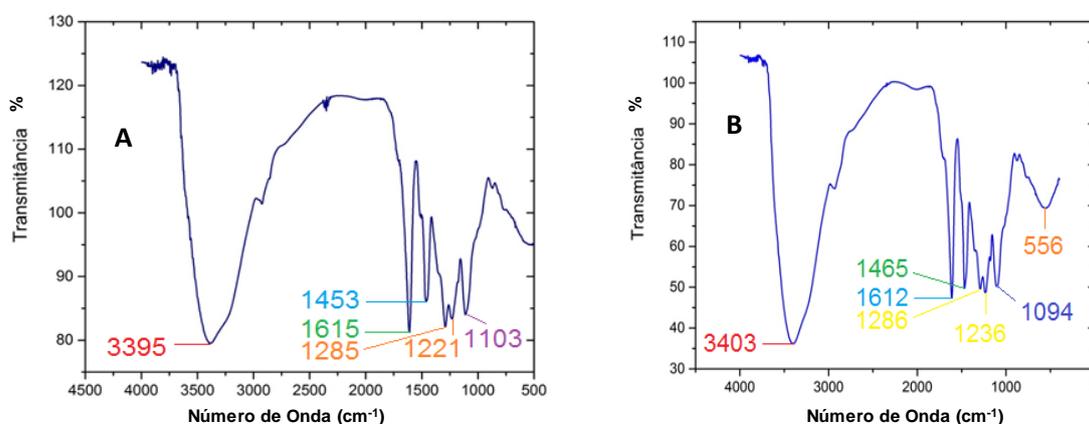
Fonte:Disponível em: <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/Vanillin%20Assay.pdf> Acessado: 11/01/2019

Através do método Vanilina-HCl foi possível confirmar que a amostra ANG-2 realmente possuiu um maior teor de taninos condensados em comparação à ANG-1.

#### 4.4 - Infravermelho do Tanino extraído

A caracterização por infravermelho de taninos condensados, apresentam uma forte banda característica em  $1288 - 1282 \text{ cm}^{-1}$  resultante da vibração de C-O assimétrico do anel pirano. Enquanto que os taninos hidrolisáveis apresentam bandas em  $1731-1704 \text{ cm}^{-1}$  resultantes da vibração de alongamento da função carbonila e  $1325-1317 \text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento simétrico da ligação C-O da função éster.

Os espectros de infravermelho dos taninos extraídos são apresentados na Figura 13 e suas principais atribuições exibidas na Tabela 4.



**Figura 13.** Infravermelho do tanino da ANG-2 (A) e Infravermelho do tanino da ANG-1 (B)

Fonte: Elaborada pelo autor

**Tabela 4.** Principais atribuições para absorções no infravermelho

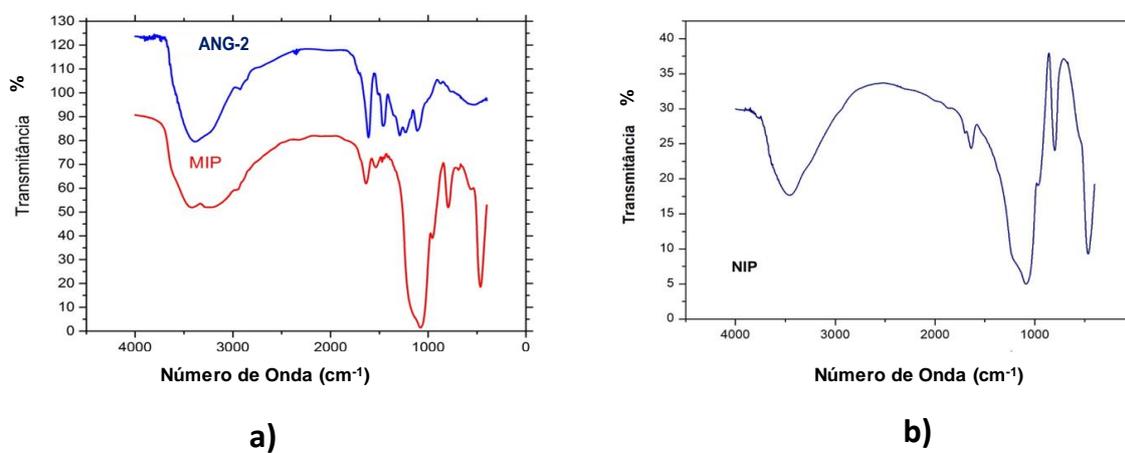
Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
<b>3395 e 3403</b>	<b>Grupos O-H</b>
<b>1453 e 1615</b>	Ligações <b>C-C</b> de anéis aromáticos
<b>1094 e 1103</b>	Deformações <b>C-O-C</b>
<b>1221 e 1286</b>	Deformações <b>C-H</b> e <b>O-H</b>

As bandas na região entre 3395 cm<sup>-1</sup> a 3303 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas as vibrações de grupos hidroxilas (MALACARNE et al., 2018). Já na região entre 1612 e 1462 cm<sup>-1</sup> são referentes ao estiramento das ligações carbono-carbono de anéis aromáticos. No caso de 1094 cm<sup>-1</sup> para a ANG-1 e 1103 cm<sup>-1</sup> para a ANG-2, podem ser atribuídas a deformação axial simétricas de ligações carbono-oxigênio-carbono de grupos metoxila. E por fim, bandas referentes a região entre 1221 a 1286 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas as deformações angulares de ligações carbono-hidrogênio de grupos metila e oxigênio-hidrogênio de grupos hidroxila (CHUPIN et al., 2013).

#### 4.5- Caracterização dos MIPs e do NIP

Os MIPs e NIP sintetizados foram submetidos a um procedimento de lavagem utilizando um sistema soxhlet, sendo o solvente de lavagem utilizado, a acetona. Posterior as suas respectivas lavagens, os mesmos foram caracterizados por infravermelho.

A Figura 14 apresenta os espectros obtidos para o MIP sintetizado a partir do extrato da amostra de ANG-2 e também o NIP.



**Figura 14.** a) Comparação dos espectros de infravermelho das amostras de ANG-2 e MIP b) Infravermelho obtido para o NIP

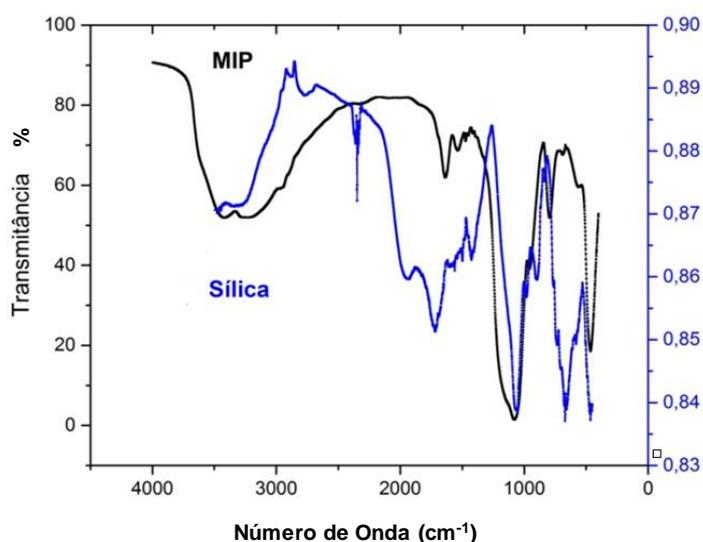
Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 14 descreve a comparação entre o MIP sintetizado e o tanino utilizado como *template* para a síntese do polímero. É possível notar que existe uma semelhança entre os espectros de infravermelho obtidos para ambos, indicando que o MIP sintetizado adquiriu as bandas características do tanino extraído da amostra de ANG-2.

A síntese do NIP é realizada da mesma forma que a do MIP, o que difere é a ausência do *template*, que no caso foi o tanino extraído. É relatado que os espectros de infravermelho do NIP e do MIP são bastante semelhantes (MIDDELEER; DUBRUEL; SAEGER, 2016). Entretanto conforme pôde ser observado na Figura 14, algumas bandas características das moléculas do tanino não são observadas no NIP.

A presença de grupos contendo hidroxila nos taninos pode ser confirmada no MIP ao observar a região de 3000 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  onde no NIP não é tão acentuada como observa-se na Figura 14.

A Figura 15 mostra a comparação com os espectros de IV da sílica pura com o MIP sintetizado utilizando-se o extrato do ANG-2. Com essa comparação pode-se notar que houve a formação de bandas antes inexistentes como as observadas na região de 3000 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  possivelmente proveniente da utilização do tanino extraído como *template* na síntese.

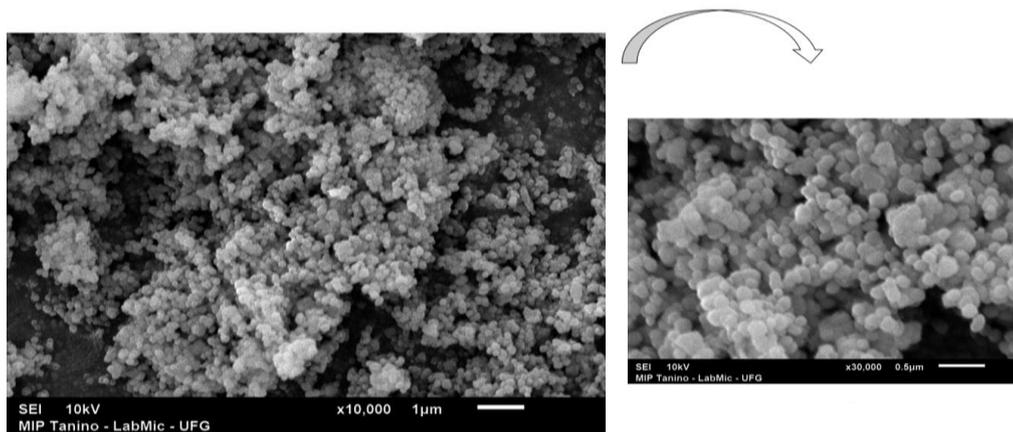


**Figura 15.** Comparação dos espectros de infravermelhos entre MIP do extrato e Sílica C-18 pura

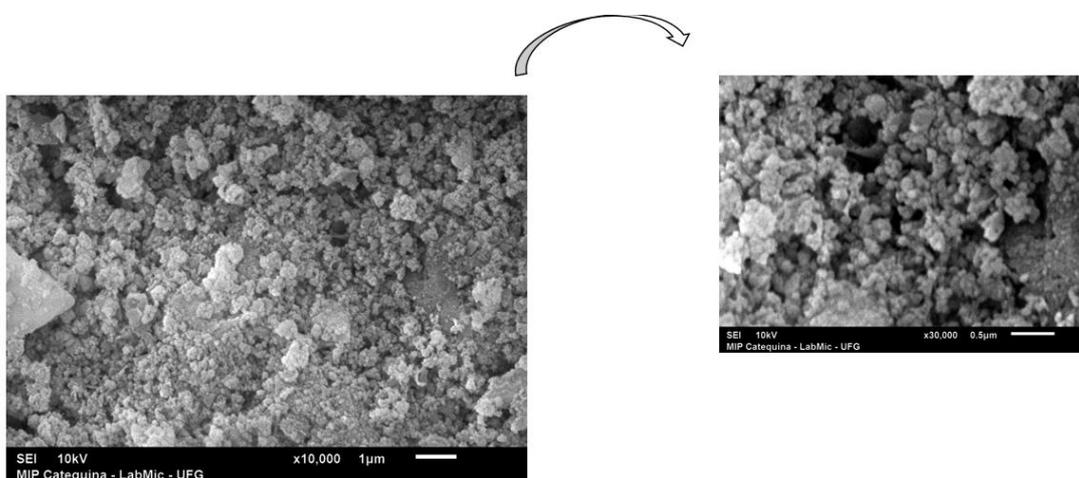
Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.6 – Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

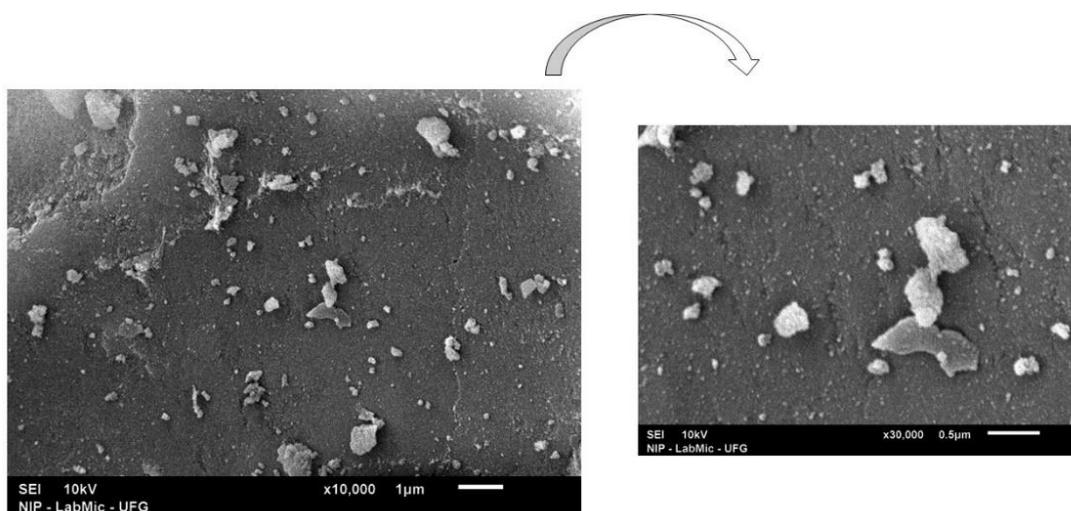
A MEV foi utilizada para avaliar a morfologia do MIP sintetizado, sendo que também foi realizada no NIP (polímero sem o *template*), para fins comparativos. As imagens foram obtidas com um potencial de aceleração de 10 kV e uma ampliação de 10000. As imagens obtidas são mostradas nas Figuras 16, 17 e 18.



**Figura 16.** Micrografias para o MIP sintetizado empregando o tanino extraído como template



**Figura 17.** Micrografias para o MIP sintetizado empregando a molécula de Catequina como template



**Figura 18.** Micrografias para o NIP

É relatado por Middeleer e Dubrueel (2016) que o tamanho das partículas produzidas pela síntese do MIP podem sofrer influência por vários parâmetros durante o seu preparo, tais como: temperatura, volume, concentração, tipo de reagente intercruzador e principalmente o *template*, podem influenciar na morfologia e porosidade do MIP resultante. O estudo da superfície do MIP é bastante importante, pois quanto maior for a área superficial do MIP, maior é a facilidade que ele vai ter de se ligar seletivamente com a molécula alvo (MIDDELEER; DUBRUEEL; SAEGER, 2016)

As micrografias apresentaram uma significativa diferença morfológica. O MIP feito com o tanino extraído do extrato da casca de ANG-2 e o MIP da catequina, apresentaram superfícies porosas. Arabi e colaboradores (2016), utilizando a mesma metodologia para a síntese de um polímero molecularmente impresso, também obtiveram uma morfologia porosa semelhante a obtida neste trabalho. Enquanto que o NIP apresentou superfície mais homogênea e menos porosa, embora possa ser visto alguns aglomerados que podem ser atribuídos à resíduos de síntese.

Na literatura ainda não está totalmente esclarecida quanto à influência que a molécula usada como *template* poderá causar no tamanho das partículas sintetizadas. Porém, segundo os estudos realizados por Manzoor e colaboradores (2015), que a área de superfície e a porosidade do MIP sintetizado são afetadas pela presença da molécula molde durante a polimerização.

#### **4.7- Estudo do Efeito Imprinting e Seletividade do MIP**

De acordo com as equações 8, 9 e 10 descritas na sessão de materiais e métodos, a seletividade dos MIP's e NIP confeccionados, foram avaliados. A seletividade dos mesmos foi estudada tendo em vista a catequina como solução padrão utilizada. Os resultados de seletividade obtidos para os MIP's e o NIP, são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros de Seletividade, Kd, R e IF, para o MIP's e NIP

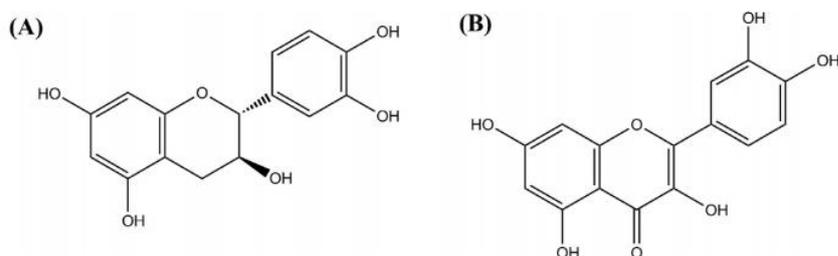
Mistura Binária	Polímero	Kd (mL g <sup>-1</sup> )	R (%)	IF
Catequina/ Quercetina	MIP do Tanino extraído	0,85	30,00	0,37
	MIP Catequina	0,40	16,70	0,21
	NIP	7,00	79,00	-

**KD:** Coeficiente de distribuição. **R:** Porcentagem de remoção. **IF:** Imprinting fator

Como mostrado na Equação 8, a capacidade de adsorção de um analito pelo MIP confeccionado é dependente de fatores tais como: (1) concentração inicial do analito, (2) volume da solução e (3) quantidade de adsorvente (MIP) utilizada.

De acordo com Pakede e colaboradores (2017) a capacidade de adsorção do polímero não está necessariamente ligada a concentração inicial da amostra. A capacidade de adsorção do polímero é possivelmente atribuída ao número de sítios de adsorção formados pelos monômeros funcionais e o *template* durante a síntese sendo o Imprinting fator (IF) relacionado com a capacidade que o polímero possui em se ligar com o analito alvo.

Segundo Sun e colaboradores (2014) um baixo valor de Kd e consequentemente de IF mostra uma alta seletividade para a molécula de extração. Como mostrado na Tabela 5, o MIP feito para a catequina usando o mesmo molde na síntese, mostrou uma maior seletividade (Kd= 0.40) para a extração de catequina. Este resultado já era esperado pelo fato de a molécula de catequina ter sido usada para a síntese do polímero, sendo assim, o mesmo apresenta uma maior seletividade para a extração de catequina.



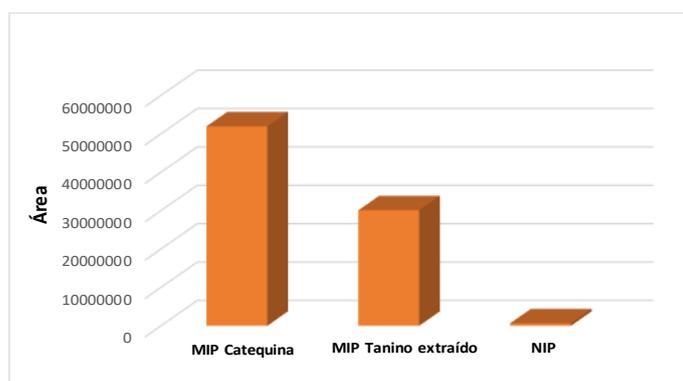
**Figura 19.** Estruturas químicas para (A) Catequina e (B) Quercetina

Contudo, o MIP sintetizado com o tanino extraído, apresentou uma boa seletividade para a extração da catequina sendo observado um valor de  $K_d$  de 0.85, mostrando que a síntese do polímero usando o tanino extraído, foi eficiente para a ligação seletiva com a catequina. A porcentagem de remoção do polímero (%R) refere-se à capacidade que o mesmo tem de se ligar com o analito alvo, sendo que quando menor o valor de %R maior é a capacidade que o polímero tem de reter o analito. Como esperado, o MIP de catequina foi o que apresentou o melhor percentual de ligação dentre os polímeros. A extração por MISPE de compostos fenólicos já é bastante encontrado na literatura. O valor de  $K_d$  obtido neste trabalho, foi próximo ao obtido por Pakede e colaboradores (2017), onde conseguiram um valor de  $K_d$  igual a 0.37 e IF de 1.07 para a extração de Quercetina (análogo estrutural da Catequina), utilizando a mesma metodologia de extração MISPE.

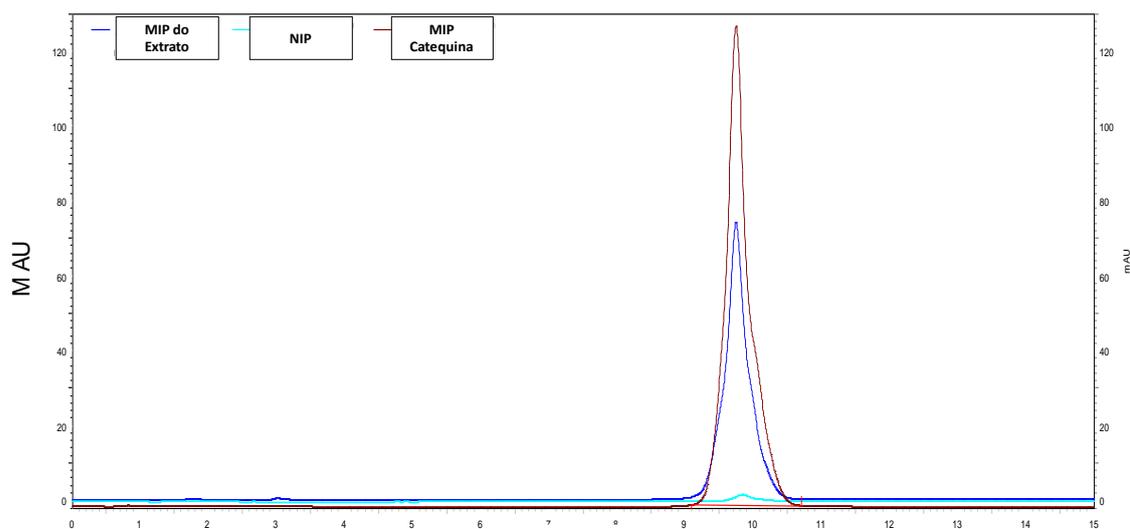
#### 4.8 – Extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso

##### 4.8.1- Teste de seletividade usando padrão de Catequina

Para avaliar a seletividade dos MIPs, foi realizado extrações com a solução padrão de catequina  $1 \text{ mg/mL}^{-1}$  nos três cartuchos preparados: MIP catequina, MIP tanino extraído e o NIP. Os resultados obtidos, mostraram que o MIP sintetizado usando o tanino extraído, resultou em menor eficiência para a extração da molécula da catequina, quando comparado ao MIP sintetizado com a própria molécula da catequina como *template*. Os resultados de área após processo de extração empregando o MIP da molécula de catequina, MIP de tanino condensado e NIP é apresentado na Figura 20. O cromatograma obtido para a extração com solução de catequina para os MIPs e NIP, é apresentado na Figura 21.



**Figura 20.** Gráfico de barras referente a área obtida nos cromatogramas para o pico referente as amostras de água enriquecidas com solução padrão catequina após extração SPE empregando as fases extratoras MIP catequina, MIP extrato de tanino e NIP



**Figura 21.** Cromatograma obtido para extrações de amostras de água fortificadas com solução padrão de catequina

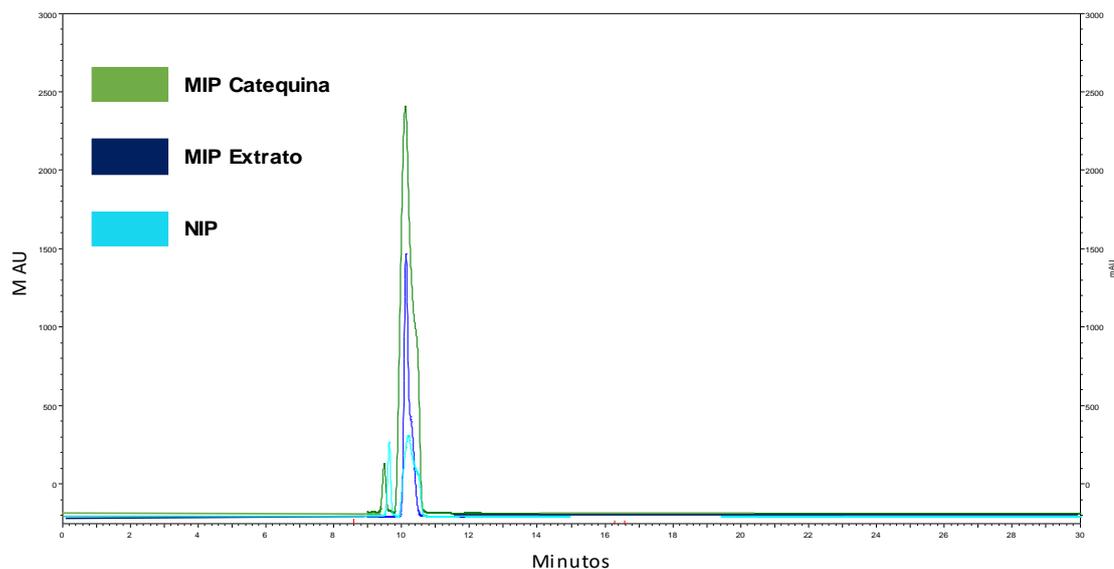
Fonte: Elaborada pelo autor

Como relatado no trabalho de Pichon 2007, realizar extrações com soluções que contém a molécula utilizada como *template* podem superestimar os resultados obtidos, uma vez que não podemos assegurar a total remoção da molécula durante o processo de lavagem do polímero. Assim, de acordo com o cromatograma obtido na Figura 21, podemos inferir, que o MIP sintetizado a partir da molécula da catequina apresenta boa especificidade para a mesma, mas não foi avaliada a remoção do *template* para avaliar se este resultado possa vir a estar superestimado. Entretanto, o MIP sintetizado a partir da solução de taninos condensados também apresentou considerável seletividade e especificidade para a molécula de catequina.

#### **4.8- Extração e detecção de tanino condensado do extrato aquoso do Angico Vermelho, Jabuticaba e Umbu**

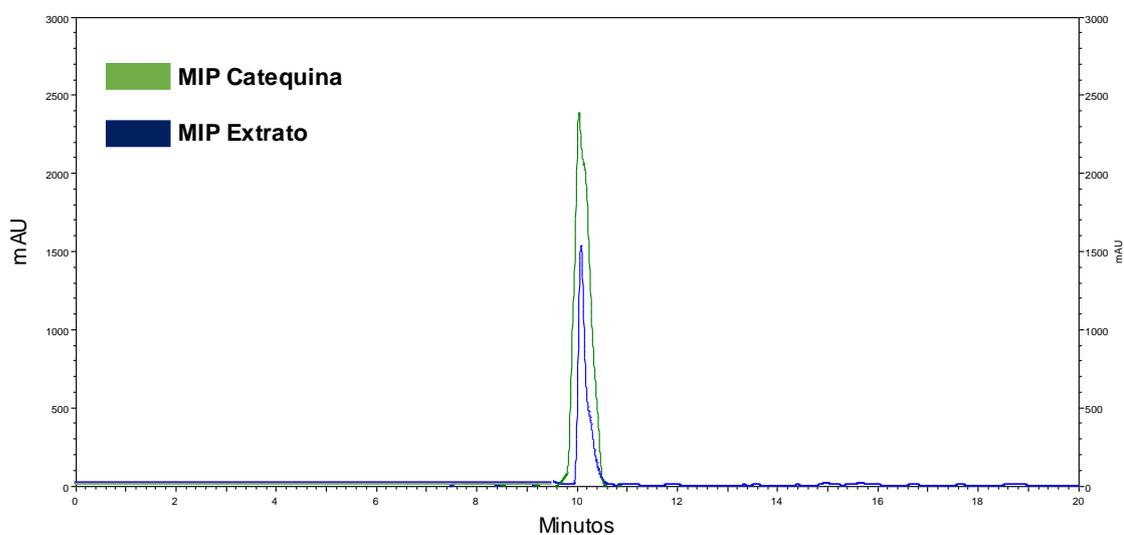
O extrato vegetal em si é uma matriz bastante complexa, sendo assim, análises por LC-UV podem sofrer com a ação de interferentes indesejáveis presentes na amostra. Neste trabalho, foi proposto a utilização dos MIP's sintetizados para a eliminação de interferentes do extrato do Angico Vermelho, Jabuticaba e Umbu e a concentração de catequina nestas amostras.

O cromatograma obtido após a aplicação do extrato pelo cartucho contendo a fase dos polímeros sintetizados é apresentado na Figura 22, 23 e 24.



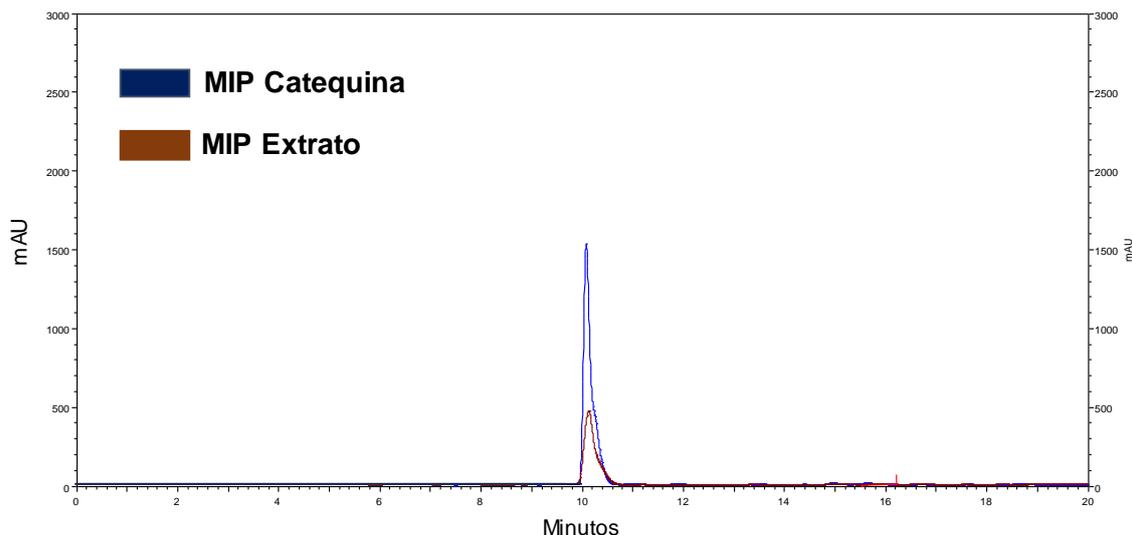
**Figura 22.** Cromatograma obtido após a etapa de extração para amostras reais do extrato aquoso da amostras da casca do Angico Vermelho

Fonte: Elaborada pelo autor



**Figura 23.** Cromatograma obtido após a etapa de extração para amostras reais do extrato aquoso da amostras da casca do Umbu

Fonte: Elaborada pelo autor



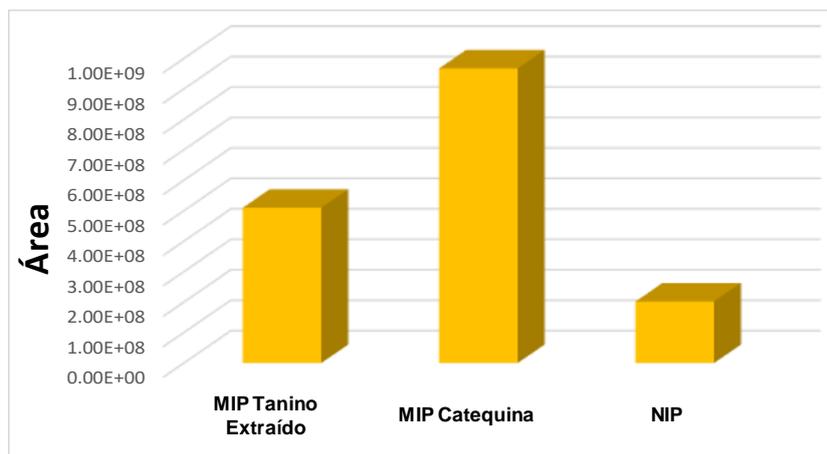
**Figura 24.** Cromatograma obtido após a etapa de extração para amostras reais do extrato aquoso das amostras da casca da Jaboticaba

Fonte: Elaborada pelo autor

De acordo com a Figura 22, 23 e 24, observa-se que através da técnica de SPE juntamente com a utilização dos MIP's sintetizados, foi possível com sucesso fazer a concentração da catequina no extrato aquoso do Angico vermelho, Jaboticaba e do Uambu, e ainda eliminar os interferentes presentes na matriz, sendo os mesmos imperceptíveis no cromatograma obtido.

Como esperado, o MIP sintetizado utilizando a catequina como molécula *template* foi o que apresentou um melhor resultado para a concentração de catequina no extrato aquoso, justamente pela mesma ter sido utilizada durante a síntese do polímero, apresentando assim a maior especificidade observada nas extrações.

Ainda assim, o MIP sintetizado usando o tanino condensado extraído da amostra de Angico Vermelho apresentou considerável seletividade para a catequina no extrato aquoso, considerando que este extrato possua interferentes que possam atrapalhar na detecção e quantificação da catequina em uma matriz complexa como esta. Uma melhor observação deste resultado pode ser visto na Figura 25, onde apresenta os resultados de área após processo de extração empregando o MIP da molécula de catequina, MIP de tanino condensado e NIP.

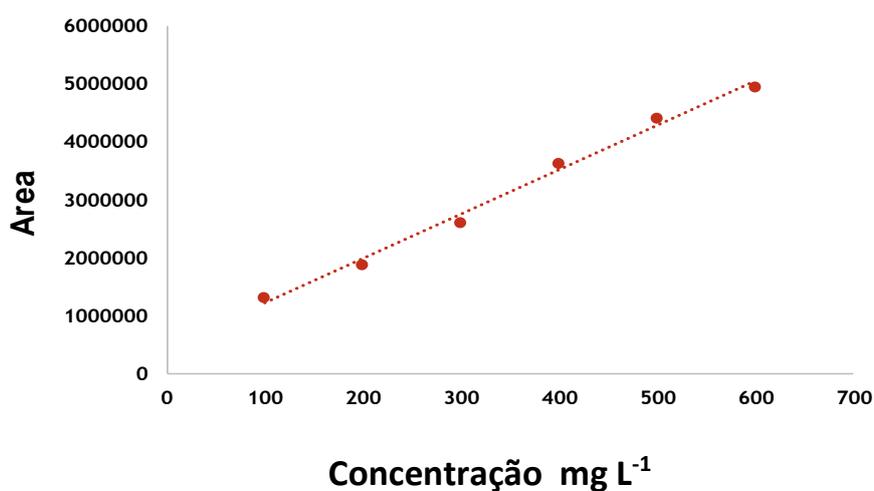


**Figura 25.** Gráfico de barras para a área obtida nos cromatogramas das amostras de extrato de Angico Vermelho após extração de SPE usando fases extrativas MIP catequina, extrato de tanino MIP e NIP

Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.9- Figuras de Mérito

A curva de calibração foi realizada utilizando a área obtida dos cromatogramas em sete níveis de concentração variando de 100 a 700 mg L<sup>-1</sup>. A curva obtida é mostrada na Figura 26. A equação de regressão obtida, coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ), é mostrada na Tabela 6.



**Figura 26.** Curva de calibração para a catequina na faixa de concentração de 100 a 700 mg L<sup>-1</sup>.

A linearidade do método de MISPE/LC-UV foi determinada utilizando-se amostras de água fortificadas com solução padrão de catequina nas concentrações de 100 a 700 mg L<sup>-1</sup>. O intervalo avaliado apresentou-se linear com o coeficiente de correlação maior que 0,990 (Tabela 6) e os coeficientes de variação dos pontos da curva de calibração foram menores que 15%, conforme estabelece a ANVISA.

**Tabela 6.** Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação para o método MISPE/LC-UV

Equação	r <sup>2</sup>	LOQ	LOD
<b>y = 7625x + 467434</b>	0.9935	80 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação

LOQ: Limite de Quantificação

LOD: Limite de Detecção

A exatidão, precisão intra e inter-dias e recuperação foram avaliados em três níveis de concentração em réplicata (n = 5), conforme recomendação da ANVISA Art.25. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Exatidão, Precisão e Recuperação para o MIP confeccionado com o Tanino extraído

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Precisão		Exatidão		Recuperação (%)
	Intra	Inter	Intra	Inter	
<b>200</b>	4,8	8,5	90,7	93,5	108,5
<b>400</b>	4,6	6,7	95,6	100,7	101,9
<b>600</b>	8,3	10,1	94,1	98,2	103,9

A recuperação representa a estimativa direta da capacidade do método em extrair o soluto de interesse. As variações entre os resultados de diferentes análises representam o coeficiente de variação geralmente expresso em %. Segundo a ANVISA, são desejáveis valores de recuperação próximos a 100%, porém outros valores são aceitáveis, desde que a recuperação seja precisa e exata. Conforme as normas, valores de exatidão entre 80 e 120% são desejáveis.

O método padronizado apresentou valores de exatidão de 90 a 94% De acordo com a validação analítica do método MISPE, realizada em diferentes concentrações de Catequina em água. Conforme pode ser observado, nas condições otimizadas o método MISPE/LC-UV empregando a fase MIP desenvolvida apresentou valores de precisão inter-dias e exatidão dentro dos parâmetros recomendados pela ANVISA ( $\leq 15\%$  e  $\geq 80\%$ ). Assim, podemos inferir que a metodologia desenvolvida apresenta sensibilidade, repetitividade e exatidão adequadas para a análise de compostos fenólicos.

# CONCLUSÕES

## 5.0- Considerações Finais

Neste estudo, foi possível realizar a extração de taninos condensados da casca do Angico Vermelho, coletadas em locais diferentes, sendo a casca ANG-2, a que apresentou um maior teor de taninos condensados (26,53%) em relação à casca ANG-1 (12,83%).

A caracterização do MIP sintetizado utilizando o extrato, indicou a presença de bandas no infravermelho características de compostos fenólicos, o que não foi observado no NIP (polímero sem *template*). Além disso, a caracterização dos MIPs e NIP por Microscopia eletrônica de varredura, mostrou uma diferença morfológica entre estes.

Os MIPs sintetizados foram empregados como fase extratora para técnica SPE na extração de catequina em sistema mimetizado, água enriquecida com solução padrão de catequina. Os testes de seletividade dos cartuchos SPE contendo os MIPs e o NIP foram realizados com o padrão de Catequina, sendo que o MIP sintetizado a partir do extrato do angico vermelho, apresentou uma boa intensidade no cromatograma obtido, ainda assim, o MIP de catequina foi o que apresentou uma maior seletividade por conter a própria catequina como molécula *template* em sua síntese. O NIP apresentou uma baixa seletividade em relação aos demais, como esperado. Os testes em amostras do extrato aquoso do Angico Vermelho, Jabuticaba e Umbu mostraram-se eficientes para a concentração e detecção de catequina, sendo possível a eliminação de interferentes presentes na matriz, auxiliando assim técnicas como a LC que sofrem pela presença destes interferentes.

O método MISPE/LC-UV otimizado apresentou linearidade com  $R^2 = 0.994$ , LOD ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e LOQ ( $80 \text{ mg L}^{-1}$ ). Além disso, o método apresentou valores de precisão inter-dias e exatidão dentro dos parâmetros recomendados pela ANVISA ( $\leq 15\%$  e  $\geq 80\%$ ). E recuperação com valores desejáveis próximos a 100% como prevê a ANVISA. Sendo assim, a técnica MISPE/LC-UV desenvolvida neste trabalho, mostrou a diminuição do preparo de amostra, bem como a diminuição da utilização de solvente, visando a escala industrial e laboratorial mostrando-se uma forma de diminuição de interferentes presentes em amostras complexas tais como um extrato vegetal.

REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

## 6.0- Referências Bibliográficas

ANVISA - RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017.

ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 80, p. 641–654, 1 jun. 2016.

ARABI, M. et al. Novel strategy for synthesis of magnetic dummy molecularly imprinted nanoparticles based on functionalized silica as an efficient sorbent for the determination of acrylamide in potato chips: Optimization by experimental design methodology. *Talanta*, v. 154, p. 526–532, 1 jul. 2016.

ASCHERI, D. P. R.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. DE. Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 4, p. 897–905, dez. 2006.

ASQUIERI, E. R.; SILVA, A. G. DE M. E; CÂNDIDO, M. A. Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 4, p. 896–904, dez. 2009.

BENIGNO PAES, J. et al. *Scientia ForeStaliS*. Disponível em: <<https://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr87/cap11.pdf>>. Acesso em: 7 mar. 2019.

CARNEIRO, A. DE C. O. et al. Efeito da hidrólise ácida dos taninos de *Eucalyptus grandis* w. hill ex Maiden nas propriedades dos adesivos tânicos. *Revista Árvore*, v. 33, n. 4, p. 733–739, ago. 2009.

CASTRO LÓPEZ, M. DEL M. et al. Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins. *Analytica Chimica Acta*, v. 721, p. 68–78, 6 abr. 2012.

CHUPIN, L. et al. Characterisation of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark tannins extracted under different conditions by spectroscopic methods, FTIR and HPLC. *Industrial Crops and Products*, v. 49, p. 897–903, 1 ago. 2013.

GONÇALVES, A. C., e et al. “Produção de chapas de madeira aglomerada com adesivo Uréia-Formaldeído modificado com tanino de *Mimosa caesalpiniaefolia* Bentham (SABIÁ).” *Ciência Florestal*, v.10, p.18-26, 2 ago. 2003

MIDDELEER, G.; DUBRUEL, P.; SAEGER, S. Characterization of MIP and MIP functionalized surfaces: Current state-of-the-art. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 76, p. 71–85, 1 fev. 2016.

DENDERZ, N.; LEHOTAY, J. Using of molecularly imprinted polymers for determination of gallic and protocatechuic acids in red wines by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1372, p. 72–80, 12 dez. 2014.

DIAS, M. I. et al. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, v. 82, p. 9–22, 1 abr. 2016.

DIAS, P. C. et al. Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por miniestaquia. *Revista Árvore*, v. 36, n. 3, p. 389–399, jun. 2012.

DUTRA, F. V. et al. Características físicas e químicas de acessos de umbuzeiros (*Spondias tuberosa* Arr. Cam). *Revista de Ciências Agrárias*, v. 40, n. 4, p. 814–822, dez. 2017.

EIROA, et al. “Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I).” *Trends in Analytical Chemistry* v.80, p.641-654, 2016

FERREIRA, É. et al. Teores de taninos da casca de quatro espécies de pinus. *FLORAM*, vol.16, p.30-39, 2009

FIGUEREDO, F. G. et al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1–5, 2013.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, n. 2, p. 395–406, jun. 2010.

GONÇALVES, E. DE O. et al. Crescimento de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) sob diferentes doses de macronutrientes. *Revista Árvore*, v. 32, n. 6, p. 1029–1040, dez. 2008.

GONÇALVES, E. DE O. et al. Nutrição de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) submetidas a doses de N, P, K, Ca e Mg. *Revista Árvore*, v. 36, n. 2, p. 219–228, abr. 2012.

GRASEL, F. S.; FERRÃO, M. F.; WOLF, C. R. Ultraviolet spectroscopy and chemometrics for the identification of vegetable tannins. *Industrial Crops and Products*, v. 91, p. 279–285, 30 nov. 2016.

HE, M. et al. Advanced functional materials in solid phase extraction for ICP-MS determination of trace elements and their species - A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 973, p. 1–24, 22 jun. 2017.

HONG, Y.; CHEN, L. Extraction of quercetin from *Herba Lysimachiae* by molecularly imprinted-matrix solid phase dispersion. *Journal of Chromatography B*, v. 941, p. 38–44, 15 dez. 2013.

HUBER, S. L., e AMAYA. R. B. D. “Flavonoides e Flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos.” *Alim. Nutr.*, v.1, p.97-108, 2008.

JARDIM, I. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas Resumo. *Scientia Chromatographica*, v. 2, p. 13–25, 2010.

LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE). 2004.

LOPES, C. G., e et al. “Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência.” *Pharm. Sci.* v.45, p.55-66, (2009)

MALACARNE, M. et al. Botanical origin characterisation of tannins using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, v. 267, p. 204–209, 30 nov. 2018.

MAMET, T. et al. Interactions between highly galloylated persimmon tannins and pectins. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 410–417, 1 jan. 2018.

MELO, A. E., ANDRADE, S. M. A. R. “Compostos Bioativos e Potencial Antioxidante de Frutos do Umbuzeiro.” *Alim. Nutr.* v.21, p.453-457, 2010.

MIDDELEER, G., e P., SAEGER, S. DUBRUEL. “Characterization of MIP and MIP functionalized surfaces: current state-of-the-art. *Trends in Analytical Chemistry*, v.1, p.85-89, 2016.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892–896, out. 2005.

MORI, F.A., C.L.S.O. MORI, L.M. MENDES, J.R.M. SILVA, e V.M. MELO. “Influência do sulfito e hidróxido de sódio na quantificação em taninos da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*).” *Floresta e Ambiente*. v.10 p.86-92. 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 29 out. 2004.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 2b, p. 553–556, jun. 2009.

PAES, J. B. et al. “Substâncias tânicas presentes em várias partes da árvore angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. var. *cebil* (Gris.) Alts.)” *Scientia Forestalis* v. 38, p.441-447. 2010

PAES, J. B. et al. “Taninos condensados da casca de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio.” *Revista Caatinga* v.26, p.22-27. (2013)

PAKADE, V. E.; MOLEFE, E. D.; TAVENGWA, N. T. Quantitative determination of trace concentrations of quercetin from prickly pear skin complex sample

extracts by application of molecularly imprinted polymers. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 5, n. 1, p. 1186–1195, 1 fev. 2017.

PICHON, V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, v. 1152, n. 1–2, p. 41–53, 8 jun. 2007.

PINHEIRO, H. S. et al. Avaliação do desenvolvimento e da produção de flavonoides de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae) em diferentes condições de luz e nutrição. *Revista Fitos*, v. 10, n. 4, p. 404–416, 23 maio 2017.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, p. 45–61, maio 2002.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food chemistry*, v. 109, n. 4, p. 883–890, 15 ago. 2008.

RODRIGUEZ, S.; LOPEZ, M. J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, v. 1152, n. 1–2, p. 97–115, 8 jun. 2007.

S. HUBER, L.; B. RODRIGUEZ, D. Flavonóis e flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. [s.l: s.n.]. v. 19

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. *Journal of Food Engineering*, v. 101, n. 1, p. 23–31, 1 nov. 2010.

SANTOS, E. F. et al. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM FRUTOS DE UMBU (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.) e CAJÁ (*Spondias mombin* L.) NATIVOS DE ALAGOAS. *Revista Ciência Agrícola*, v. 16, n. 1, p. 21, 23 maio 2018.

SARTORI, J. C., F. H. A. CASTRO, e A. F. MORI. “Teores de Fenóis Totais e Taninos nas Cascas de Angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*).” *Floresta e Ambiente*, p.394-400. 2014

SCHWEITZ, L.; ANDERSSON, L. I.; NILSSON, S. Molecular imprint-based stationary phases for capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 817, n. 1–2, p. 5–13, 21 ago. 1998.

SHAHAR, T.; TAL, N.; MANDLER, D. Molecularly imprinted polymer particles: Formation, characterization and application. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 495, p. 11–19, 20 abr. 2016.

MANZOOR, S.; BUFFON, R.; ROSSI, A.V; “Molecularly imprinted solid phase extraction of fluconazole from pharmaceutical formulations.” *Talanta* v.134. p.1-7. 2015.

SIMÕES, C.; SCHENKEL, E.; MELLO, J. Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. 5. ed. Porto Alegre 2017

SUN, X. et al. Highly selective dummy molecularly imprinted polymer as a solid-phase extraction sorbent for five bisphenols in tap and river water. *Journal of Chromatography A*, v. 1343, p. 33–41, 23 maio 2014.

TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A*, v. 1152, n. 1–2, p. 32–40, 8 jun. 2007.

TOMAK, E. D. et al. Influence of tannin containing coatings on weathering resistance of wood: Water based transparent and opaque coatings. *Polymer Degradation and Stability*, v. 151, p. 152–159, 1 maio 2018.

YULIANA, P., e et al. “Extraction of tannins and Saponins from plant souces and their effects on in vitro Methanogenesis and rumem fermantation.” *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* p. 91-97. 2014.