

# Caracterização Fenólica de Extractos Tanínicos de Casca de *Pinus pinaster*

Paulo Brito<sup>1\*</sup>, Patrícia Coimbra<sup>1</sup>, Lina Pepino<sup>1</sup>, Fernando Caldeira Jorge<sup>2</sup>, Rui Pereira da Costa<sup>2</sup>, M. Helena Gil<sup>1</sup> e António Portugal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Pólo II – Pinhal de Marrocos, 3030-290 Coimbra – Portugal

<sup>2</sup> Bresfor, Indústria do Formol, S.A., Estrada da Sacor, 3830 Gafanha da Nazaré – Portugal

**Resumo:** Os Taninos são compostos polifenólicos naturais, divididos normalmente em dois grandes grupos, não relacionados estruturalmente entre si: Taninos Hidrolizáveis e Taninos Condensados (ou Proantocianidinas). A principal característica destes compostos consiste na sua capacidade de complexarem e precipitarem proteínas. Podem igualmente condensar com formaldeído ou mesmo autocondensar, sem a presença de qualquer agente reticulante externo. Desse modo, são potenciais intervenientes na síntese de adesivos sem recurso ao uso de aldeídos. Os taninos condensados são bastante comuns e apresentam teores razoáveis em vários tecidos vegetais de uma variedade considerável de espécies. Estes compostos são polímeros ou oligómeros complexos, de unidades flavanóides, nomeadamente flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis, que podem ser isolados em quantidades significativas da casca de algumas espécies de árvore, entre as quais, as do género *Pinus*. *Pinus pinaster* (ou Pinheiro Marítimo ou Bravo) é a principal espécie florestal em Portugal, e a sua casca é especialmente rica em taninos condensados (procianidinas e, com teores inferiores, prodelfinidinas). Portanto, a casca de *Pinus pinaster* pode-se constituir como uma fonte viável de compostos polifenólicos naturais, e pode ser utilizada com sucesso na substituição total ou parcial de fenol ou resorcinol em resinas sintéticas convencionais para a indústria de aglomerados de madeira. O objectivo deste trabalho consiste na caracterização dos compostos fenólicos presentes em extractos comerciais de diversas origens e em extractos de Pinheiro obtidos com diferentes tipos de solventes alcalinos através da conjugação de várias técnicas de análise, nomeadamente TLC e colorimetria.

**Palavras-chave:** Casca de Pinheiro, Extracção, Fenólicos, Taninos Condensados, Caracterização, Adesivos

## 1. Introdução

É essencial caracterizar a composição dos extractos fenólicos, de forma a assegurar o sucesso das suas aplicações. Assim, neste trabalho apresentamos os resultados obtidos no âmbito da caracterização desses mesmos extractos no que se refere aos seus componentes fenólicos, de extractos comerciais de diversas origens e de extractos de Pinheiro obtidos com diferentes tipos de solventes. Para tal, optou-se por usar TLC como técnica de separação dos componentes, que poderão ser posteriormente identificados através de técnicas mais sofisticadas (FTIR, RMN). No entanto, é possível reaplicar aquela técnica às fracções separadas, de modo a aumentar a resolução da análise. Em conjunto com as técnicas referidas, foram aplicados ensaios de quantificação de compostos fenólicos (Método de *Folin-Ciocalteu*, designado a partir de agora por F.-C., para fenóis totais - F.T.'s; e várias variantes do método da vanilina para proantocianidinas - P.A.'s). Pretende-se adaptar estes últimos métodos, já que a aplicação de um padrão único se revela inadequada para analisar extractos distintos, devido essencialmente aos diferentes padrões de hidroxilação e do grau de polimerização de extractos de diferentes origens<sup>1</sup>. Finalmente, usou-se análise elementar de enxofre, de forma a distinguir entre extractos sulfonados (polielectrólitos aniónicos) e não sulfonados (neutros) que obviamente apresentam características bastante distintas.

\* Autor para o qual a correspondência deve ser endereçada:  
Tel.: +351239798737; Fax: +351239798703; E-mail - brito@eq.uc.pt

## 2. Extractos Analisados

Analisaram-se extractos comerciais de taninos condensados, e extractos de Pinheiro alcalinos, cujas condições de extração e as principais características são apresentadas nas Tabelas 2.1 e 2.2:

Tabela 2.1 – Condições de extração dos extractos alcalinos.

Concentração em NaOH (%)	Concentração em Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (%)	Proporção casca:licor (g/ml)	Temperatura (°C)	Tempo de extração (h)	#
2	0	1:5	100	0,5	I
1	1	1:5	100	2	II
1	1 (*)	1:5	100	0,5 + 2 (*)	III
0	2	1:5	100	2	IV
0	0	1:5	100	0,5	eH <sub>2</sub> O

(\*) Extração em 4 etapas: 1) extração com NaOH 1% durante 0,5 h; 2) ajuste do pH a 8-9; 3) adição de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> para obter 1% em solução; 4) sulfitação durante 2 h.

Tabela 2.2 – Extractos comerciais de taninos.

Extracto	#	S (Análise Elementar)	Comentários
Acácia	A		Extracto de Casca de Acácia Negra ou Mimosa ( <i>Acacia mearnsii</i> ), composto por taninos condensados do tipo resorcinólico de baixo peso molecular – Extracto comercialmente mais importante para aplicações no campo dos adesivos <sup>2</sup> .
Quebracho	Q	✓	Extracto de Madeira de Quebracho ( <i>Schinopsis balansae</i> ), composto por taninos condensados do tipo resorcinólico de médio peso molecular – Segundo extracto comercialmente mais importante para aplicações no campo dos adesivos <sup>2</sup> .
Gambir	G	✓	Extracto de Casca de Gambir ( <i>Uncaria gambir</i> ), composto por taninos condensados do tipo procianidina de baixo peso molecular <sup>3</sup> .

## 3. Técnicas de Análise

3.1 – Cromatografia de Camada Fina (Thin-Layer Chromatography - TLC) - A separação dos componentes fenólicos de cada extracto foi realizada por TLC. Este tipo de análise de fenólicos é preferencialmente realizada em suportes de celulose<sup>4-5</sup> bidimensional, usando essencialmente os sistemas de solventes<sup>5</sup>: n-Butanol-Ácido Acético-Água com diversas proporções globais v/v/v (fase superior) – BAW; e Ácido Acético - AcOH.

Tabela 3.1 – Regentes reveladores utilizados nos ensaios de TLC.

Reveladores	Tipo de Compostos Detectáveis	Comentários
Luz UV <sup>6</sup>	Fenólicos com fluorescência.	Antes e depois de ser exposto a vapores de amónia.
Cloreto de Ferro III/ Ferrocianeto de Potássio <sup>6</sup>	Fenólicos no geral.	Manchas azuis <sup>7</sup> .
Cinamaldeído/HCl <sup>6</sup>	Catequinas e Felobataninos com um núcleo catequínico <sup>7</sup> ; derivados floroglucinol e resorcinol não conjugados; compostos pirogalol.	Catequinas e Galocatequinas: ácido gálico; floroglucinol e pirogalol – amarelo-castanho. Leucocianidinas e Leucodelfinidinas – vermelho-castanho.
Vanilina/HCl <sup>5</sup>	Flavanóis.	Taninos condensados, monómeros, dímeros, etc <sup>8</sup> .

Optou-se por usar BAW 4-1-5 v/v/v (fase superior) como primeiro eluente, e soluções aquosas AcOH de concentrações: 6, 30 ou 50 %, dependendo da mobilidade aparente das

manchas de cada amostra. Utilizaram-se placas de poliéster com revestimento em celulose microcristalina com 0.1 mm de espessura e dimensões 10×10 cm.

As amostras foram comparadas com os desenvolvimentos (em condições equivalentes) de diversos padrões: (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido gálico, que correspondem a unidades estruturais fenólicas de Taninos Condensados, do tipo flavonóide (os dois primeiros) e de Taninos Hidrolizáveis (o último). Utilizaram-se para a detecção de fenólicos, os agentes reveladores apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.2 – Resultados dos diversos ensaios de TLC para os padrões.

	$R_f$				Cores		
	BAW	AcOH 6 %	AcOH 30 %	AcOH 50 %	NH <sub>3</sub>	Van./HCl	Cin./HCl
(+)-catequina	0.65-0.73	0.45	0.64-0.73	0.73	cast. claro	rosa	laranja
Ácido Gálico	0.58-0.65	0.45	0.60	0.68	cast. escuro	-	-
(-)-epicatequina	0.53-0.62	0.34	0.51-0.59	0.63	cast. claro	rosa	laranja

Os resultados obtidos para a calibração dos ensaios de TLC, usando os diversos padrões são resumidos na Tabela 3.2. Verifica-se uma separação nítida de todos os padrões, incluindo uma distinção entre os isómeros ópticos (+)-catequina e (-)-epicatequina para todos os sistemas de eluentes.

3.2 – Análises Químicas – Foram os seguintes os ensaios colorimétricos usados neste trabalho para avaliação dos teores de fenólicos: fenólicos totais - F.T. (*Folin-Ciocalteu*) e m-difenóis, principalmente P.A.'s (Vanilina em meio ácido – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou HCl). A cinética e natureza das reacções de oxidação-redução que originam os complexos coloridos cuja intensidade de cor permite estimar o teor de fenólicos dos extractos dependem de vários factores importantes (que são consideravelmente mais críticos para o ensaio da vanilina)<sup>1</sup>, nomeadamente os padrões de hidroxilação dos fenólicos existentes na amostra, (que variam consideravelmente com a origem dos extractos) e o grau de polimerização dos polímeros flavonóides. De facto, no que diz respeito aos padrões de hidroxilação, verifica-se que diferentes tipos de fenólicos apresentam coeficientes de extinção ( $\epsilon$ ) molares distintos, tanto para a reacção de F.-C., como principalmente para a Vanilina<sup>1</sup>. No caso do método de *Folin-Ciocalteu*, as diferenças não são muito significativas. Infelizmente, o método da vanilina é bastante mais sensível às condições de operação. No entanto, para todos os ensaios das variantes deste método foi usada (+)-catequina como padrão, que apresenta diferenças consideráveis de afinidade com a vanilina em relação a outros compostos polifenólicos.

A reacção da vanilina varia consideravelmente com as condições de operação (Temperatura, concentrações dos reagentes, etc) e apresenta diferenças significativas, em termos de sensibilidade, para diferentes catalisadores, meios de dissolução e graus de polimerização das amostras. Os trabalhos de *Butler et al*<sup>9-11</sup> com taninos de extractos de acetona, de grão de sorgo (*sorghum grain*) permitiram estabelecer que neste caso, os polímeros de P.A.'s apresentavam  $\epsilon$ 's superiores à catequina no ensaio vanilina-HCl em metanol, o que conduzia a uma sobrestimativa razoável do valor dos teores, quando se usava esta como padrão. No entanto, quando a reacção se realizava em ácido acético glacial, a sensibilidade era muito superior com a catequina, em relação aos P.A.'s, numa razão que sugeria que, neste caso, a vanilina apenas reagia com os grupos terminais dos polímeros de P.A., permitindo realizar uma estimativa do grau de polimerização destes.

Considerando estes resultados, optou-se então por analisar os extractos em estudo, utilizando todas as variantes do método da vanilina, de forma a se obter uma ideia do verdadeiro teor das amostras, da forma como estas se comportam em diferentes condições e, se possível, estimar

o seu grau de polimerização. Porém, a utilização de um padrão comum limita o alcance destes objectivos.

As calibrações para todos os métodos foram realizadas com 5 soluções de padrão (ácido gálico - F.C. e (+)-catequina - vanilina; depois de descontada a massa de hidratação - 1.5 %) de concentração conhecida. Desse modo foram obtidas as curvas de calibração para todos os ensaio por regressão linear dos resultados com passagem pela origem, e os declives  $\alpha$  das rectas obtidas encontram-se resumidos na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3 – Curvas de calibração para os ensaios colorimétricos,  $Abs=\alpha \times Conc.$**

Ensaio	Amostras dissolvidas em	$\alpha$	$R^2$
<i>Folin-Ciocalteu</i>	Água	0.0111	0.9993
Vanilina/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Água	0.0415	0.9999
	Metanol	0.0460	0.9999
Vanilina/HCl-Metanol	Água	0.0029	0.9931
	Metanol	0.0034	0.9984
Vanilina/HCl-Ácido Acético Glacial	Água+Ácido Acético Glacial <sup>*</sup>	0.0298	0.9975
	Metanol+ Ácido Acético Glacial <sup>*</sup>	0.0367	0.9967

\* As amostras, no geral, não são solúveis em ácido acético (AcOH) glacial e portanto são inicialmente solubilizadas em Água ou Metanol e posteriormente diluídas em AcOH glacial numa proporção 1:99.

Verifica-se a baixa sensibilidade do método Vanilina/HCl-metanol com valores de  $\alpha$  muito reduzidos. No entanto, a dificuldade em obter relações lineares para este método com a catequina já foi reportada na literatura<sup>11</sup>. Por outro lado, constata-se que a dissolução das amostras em metanol aumenta a sensibilidade do método da vanilina. Todos os ajustes são aceitáveis e as constantes  $\alpha$ , proporcionais aos coeficientes de extinção específicos de cada meio, foram utilizadas para os cálculos dos teores em equivalentes de ácido gálico ou de catequina.

#### 4. Análise e Comentário dos Resultados

4.1 – TLC - Nesta secção apresentamos um resumo das características típicas verificadas para os desenvolvimentos TLC de cada um dos extractos analisados.

**Tabela 4.1 – Resultados dos diversos ensaios de TLC para o extracto G.**

	$R_f$		Cores	
	BAW	AcOH 6 %	Van./HCl	FeCl <sub>3</sub> /K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
①	0.91	0.62	rosa	-
②	0.61	0.37	rosa	azul escura
③	0.45	0.36	rosa	azul escura

Na Tabela 4.1 estão resumidas as principais características do TLC do extracto G. Pelo seu posicionamento é possível que a mancha ② corresponda a catequina. Este cromatograma é muito semelhante aos correspondentes aos extractos de A, e H<sub>2</sub>O. As manchas ② e ③ são nitidamente constituídas por compostos fenólicos do tipo flavonóide, apesar de não parecerem muito polimerizadas, dado o seu deslocamento.

Na Tabela 4.2 estão resumidas as principais características do TLC do extracto A. O reagente azul prússia só detecta a mancha ③ que deve estar consideravelmente mais concentrada. É nítido que o nível mínimo de detecção para este reagente é maior do que para os restantes. Algumas manchas são detectadas com Van./HCl, mas não com FeCl<sub>3</sub>/K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, sendo este o mais geral, o que indicia limitações em termos de concentrações. Aparentemente é um extracto relativamente homogéneo em termos de fenólicos, com um baixo peso molecular. É possível que a mancha ② corresponda a catequina. No geral, é um cromatograma muito

semelhante ao obtido para o extracto G. O extracto A é o mais rico em fenólicos, seguido de Q. Estes são os extractos que necessitam da aplicação de menores quantidades de amostra para detecção de manchas.

**Tabela 4.2 – Resultados dos diversos ensaios de TLC para o extracto A.**

	R <sub>f</sub>		Cores	
	BAW	AcOH 6 %	Van./HCl	FeCl <sub>3</sub> /K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
①	0.89	0.61	rosa	-
②	0.60	0.40	rosa	-
③	0.50	0.40	rosa	azul escura

Na Tabela 4.3 estão resumidas as principais características do TLC do extracto Q. O posicionamento das manchas é algo diferente aos obtidos para os extractos G e A. É clara a existência de uma mancha ③ mais deslocada para baixo e uma mancha ④ com R<sub>f</sub> muito baixo em relação a BAW, o que pode indiciar oligómeros de taninos condensados de PM superior<sup>12</sup>. As manchas ① e ② ocupam posições semelhantes aos dos cromatogramas anteriores, podendo a segunda corresponder a catequina.

**Tabela 4.3 – Resultados dos diversos ensaios de TLC para o extracto Q.**

	R <sub>f</sub>		Cores	
	BAW	AcOH 6 %	Van./HCl	FeCl <sub>3</sub> /K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
①	0.91	0.56	rosa	-
②	0.67	0.38	rosa	azul escura
③	0.43	0.79	rosa	azul escura
④	0.06	0.91	rosa	azul escura

Na Tabela 4.4 estão resumidas as principais características do TLC do extracto eH<sub>2</sub>O. A cor na origem é mais intensa do que nos casos anteriores e aparece um arrasto imóvel em BAW, positivo quer à Van./HCl, como ao reagente azul-prússia, que pode corresponder a taninos condensados<sup>12</sup>. A mancha ② coincide com a posição da catequina.

**Tabela 4.4 – Resultados dos diversos ensaios de TLC para o extracto eH<sub>2</sub>O.**

	R <sub>f</sub>		Cores
	BAW	AcOH 6 %	Van./HCl
②	0.61	0.40	rosa
③	0.35	0.46	rosa

Na Tabela 4.5 estão resumidas as principais características do TLC do extracto IV. Detectam-se várias manchas e um arrasto imóvel em BAW. Todas são positivas em relação à Van./HCl, exceptuando uma mancha designada por ① que apresenta uma coloração acastanhada, o que pode indiciar um tipo de estrutura diferente da flavonóide. A mancha ② situa-se na posição da catequina. As manchas ④ e ⑤ são menos móveis em BAW, o que pode significar maiores pesos moleculares. No entanto, as moléculas com PM ainda mais elevado devem situar-se no arrasto.

**Tabela 4.5 – Resultados dos diversos ensaios de TLC para o extracto IV.**

	R <sub>f</sub>		Cores
	BAW	AcOH 6 %	Van./HCl
②	0.70	0.67	rosa
③	0.51	0.59	rosa
④	0.47	0.73	rosa
⑤	0.20	0.65	rosa

No caso do extracto I, não são detectadas manchas positivas com Van./HCl, o que é confirmado pelo seu baixo teor em P.A.'s. Algumas manchas assumem uma coloração azul e as outras apresentam cor acastanhada, que no caso do arrasto até pode corresponder a nenhuma alteração na cor, já que esta já era visível durante o desenvolvimento do cromatograma.

**4.2 – Análises Químicas** - Na Tabela 4.6 estão resumidos os teores de fenólicos de extractos de diversas origens, ou seja compostos por taninos condensados caracterizados por unidades estruturais distintas e extractos de Pinheiro obtidos com condições de extracção muito diferentes (com e sem sulfonação; em condições alcalinas severas).

Tabela 4.6 – Teores de fenólicos calculados pelos diversos métodos colorimétricos.

Ext.	F.-C.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Água	HCl-MET Água	HCl-MET Metanol	HCl- AcOH A	HCl- AcOH M	R1*	R2*
I	28,7	2,7	5,7	0,7	3,1	0,3	1,84	2,46
II	29,6	3,6	4,8	0,8	3,4	0,4	1,41	2,10
III	27,2	3,2	5	0,7	3,2	0,5	1,56	1,96
IV	32,7	10,7	11,1	9,1	12,1	5,9	0,92	1,54
A	55,5	20,7	12,1	14,4	16,8	13,9	0,72	1,04
Q	55,3	17,2	14	20,9	18,2	12,4	0,77	1,69
G	17,6	3,9	4,3	3,7	3,9	3,3	1,10	1,12
eH <sub>2</sub> O	28,1	8,6	13	10,1	9,4	4,9	1,38	2,06

\*R1=HCl-MET\_A/HCl-AcOH\_A; R2=HCl-MET\_M/HCl-AcOH\_M

Os ensaios correspondentes aos extractos I, II e III em soluções de metanol não têm significado, já que estes extractos são pouco solúveis neste solvente, o que só por si pode justificar as descidas abruptas nos teores em relação aos ensaios efectuados com amostras dissolvidas em água.

Em geral, os teores obtidos através dos ensaios HCl em ácido acético com soluções dissolvidas em água são inferiores aos correspondentes em metanol, com a excepção dos extractos resorcinólicos A e Q. No caso dos ensaios em soluções metanólicas, verifica-se que os realizados em AcOH conduzem a resultados inferiores aos dos ensaios realizados em MeOH. No entanto, os valores das razões entre esses dois valores são relativamente baixos, o que indicaria que todos os extractos seriam muito pouco polimerizados. Tal é duvidoso, pelo que, não podemos concluir nada acerca da natureza da reacção de HCl-AcOH ser apenas dirigida a grupos terminais, pelo menos observando todos os extractos no geral. No entanto, os valores das razões poderão indicar uma tendência em relação à ordem de grandeza do grau de polimerização de cada extracto, se for possível comparar a reacção dos taninos purificados com a do padrão catequina. O ideal seria utilizar para cada extracto, o seu próprio tanino como padrão nos métodos colorimétricos.

Observa-se que os extractos aparentemente mais ricos em F.T. são o A e o Q com um teor de ≈55 %. O caso de A é interessante uma vez que, apesar das análises TLC indicarem que a sua fracção fenólica é relativamente homogénea, i.e., do tipo poliflavonóide, existe uma diferença significativa entre os valores de F.T. (55 %) e de P.A.'s (12-21 %). Tal pode ser explicado se o valor de F.T. estiver sobrestimado ou os valores de P.A.'s estiverem subestimados ou ambos. No entanto, tal só pode ser realmente verificado se se utilizar uma fracção tanínica purificada de extracto de Acácia como padrão neste ensaios, assim como para todos os outros extractos.

Os extractos alcalinos de NaOH apresentam teores muito baixos de P.A.'s, o que se pode dever a reacções de rearranjo com destruição do anel floroglucinólico<sup>13</sup>, que assim deixa de reagir com a vanilina. É possível também que tal se deva à extracção de muitos compostos não fenólicos. Deste modo, o elevado rendimento associado a este tipo de sistemas de extracção não traz qualquer vantagem, já que é conseguida à custa da solubilização de outros tipos de materiais. De qualquer modo, o teor em F.T. destes extractos não é demasiado baixo, o que nos leva a concluir que possivelmente, a primeira hipótese seja mais correcta.

Não se constata qualquer correlação visível entre os teores de F.T. e qualquer outra variável, apesar de no geral seguirem tendências crescentes.

É notória a divisão dos extractos em três grupos: 1º - A e Q que apresentam sempre valores típicos superiores; 2º - IV e eH<sub>2</sub>O com valores intermédios e 3º - I, II, III e G com valores mais baixos. Apesar de ocorrerem algumas variações, em geral, a ordem de grandeza dos teores obtidos para cada extracto mantém-se relativamente inalterada qualquer que seja a variante do método aplicada, tal facto dá-nos alguma confiança nos valores relativos apresentados.

## 5. Conclusões

Através da conjugação das análises referidas acima, podemos concluir que a utilização de meios de extracção alcalinos severos é contraproducente em relação à qualidade dos extractos. Origina extractos com teores de P.A.'s extremamente reduzidos que obviamente não compensam os possíveis benefícios obtidos pelo aumento do seu rendimento.

Os extractos comerciais A e Q são os mais ricos em F.T. e P.A.'s. Verifica-se que a composição fenólica do extracto A parece ser bastante homogénea e de baixo peso molecular. As fracções fenólicas dos extractos G e eH<sub>2</sub>O (Pinheiro não alterado) são relativamente semelhantes às da A. No entanto, os ensaios TLC indicam que o eH<sub>2</sub>O parece ser mais polimerizado. Por outro lado, os extractos G e eH<sub>2</sub>O apresentam teores fenólicos mais baixos.

A principal conclusão a retirar será o facto de se poder obter algumas certezas se estudarmos a afinidade dos taninos purificados em relação aos reagentes nos diferentes métodos estudados, cujas amostras serão posteriormente analisadas através de análise elementar de S (se o caso se justificar), SEC, TLC, FTIR e possivelmente RMN, para uma caracterização completa.

## Anexo - Parte Experimental

♦ **Reagentes e Materiais** - Nos ensaios de TLC foram usadas placas de celulose microcristalina com suporte de poliéster e fluorescência Polygram® CEL 400 UV254 da Macherey-Nagel, fornecidas pela Reagente 5. Usou-se ferrocianeto de potássio da Aldrich; (-)-epicatequina, cinamaldeído e reagente fenólico Folin-Ciocalteu da Fluka; Ácido Clorídrico 37 %, p.a. ISO, Reag. Ph. Eur. da Riedel-de-Haën; (+)-catequina hidratada, ácido gálico, vanilina da Sigma, fornecidos pela Sigma-Aldrich; e 1-butanol p.a. ACS, ISO, ácido sulfúrico 95-97 % p.a., carbonato de cálcio p.a., cloreto de ferro (III) p.a., ácido acético glacial 100 %, p.a. ACS, ISO da Merck e Metanol puro da Pronalab, estes dois últimos fornecidos pela Reagente 5.

♦ **Equipamento** - Para a análise elementar utilizou-se um aparelho - EA 1108 CHNS-O FISIONS INSTRUMENTS. Usou-se um espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-530 nos ensaios colorimétricos.

♦ **Procedimentos Experimentais** - Extracções Alcalinas Aquosas: Foi extraído 1 kg de casca (base seca) para cada condição com 5 l de licor. O resíduo sólido foi separado da solução-extracto por centrifugação. O resíduo sólido sedimentado foi lavado com água quente e centrifugado de novo, 3 vezes, e as águas de lavagem foram adicionadas à solução-extracto original. As condições de atomização foram uma temperatura do ar à entrada de 200 °C e uma temperatura à saída de 90 - 95 °C; TLC: O procedimento aplicado para o desenvolvimento de TLC dos padrões foi semelhante ao dos extractos. As soluções de amostra foram preparadas de forma a que os limites de detecção dos reagentes cromogénicos sejam ultrapassados; no caso dos extractos foi necessário levar em conta os teores em F.T. e P.A.'s de cada um deles estimados pelos métodos colorimétricos. Devido à espessura muito reduzida das placas foi necessário aplicar quantidades muito baixas de amostra na placa, de forma a que a mancha inicial não se espalhe demasiado, o que iria comprometer a separação dos vários componentes. Foi aplicado 1 µl de amostra na posição inicial, 5 vezes, sendo a placa seca entre cada aplicação, até se atingir um total de 5 µl. Posteriormente as placas foram introduzidas num reservatório fechado com a atmosfera saturada, e sujeitas a eluição ascendente dos dois sistema de solventes escolhidos: 1º BAW; 2º AcOH aquoso; em direcções perpendiculares. As placas foram secas em estufa (50-60 °C) entre as eluições e no final. Em seguida foram sujeitas à aplicação de um revelador, sendo as manchas detectadas, assinaladas e os respectivos R<sub>f</sub>'s registados. Para o ensaio com amónia, as placas foram expostas a vapores de uma solução de hidróxido de amónio a 30 %. As manchas são

visíveis mesmo sem recurso a luz UV. O reagente Cloreto de Ferro III/Ferrocianeto de Potássio foi preparado através da junção de volumes iguais de soluções aquosas 1 % de  $\text{FeCl}_3$  e 0.6 % de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  e foi utilizado de imediato. O reagente cinamaldeído/HCl foi preparado com 5 ml de cinamaldeído, 95 ml de etanol e 5 ml de Ácido clorídrico concentrado. Depois de aplicado sobre a placa, esta foi aquecida a 65 °C durante 3-10 minutos<sup>7</sup>. O ensaio da Vanilina/HCl foi realizado com uma solução fresca 10 g de vanilina em 100 ml de HCl 37 %. Após a pulverização, as placas foram aquecidas até 120 °C de 5-10 min<sup>7</sup>; Métodos de Análise Química: O método de Folin-Ciocalteu usado foi desenvolvido por Singleton & Rossi<sup>14</sup>. A reacção da amostra com o reagente de Folin-Ciocalteu foi efectuada a uma temperatura de 50° C, durante 5 min e sob agitação magnética. Adicionou-se a 0.50 ml de amostra, 2.50 ml de reagente Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes), após 3 min adicionou-se 2.00 ml de carbonato de sódio de concentração 75 g/l. Ao fim dos 5 min de reacção deixou-se a solução atingir a temperatura ambiente, colocando o tubo de ensaio primeiro, num banho de água fria durante 5 min e depois à temperatura ambiente durante 15 min. Após este tempo foi medida a absorvância, para comprimento de onda de 760 nm, contra um branco constituído por reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio. O método da Vanilina/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  é baseado no proposto por Swain & Hillis<sup>15</sup>, apesar de o mesmo método ser agora também realizado com as amostras solubilizadas em metanol. Colocou-se 1 ml de solução de amostra num tubo de ensaio e adicionou-se 2 ml de reagente vanilina (1g/100ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Esta mistura foi colocada num banho de água à temperatura ambiente durante 15 min ao fim dos quais se leu a absorvância para um comprimento de onda de 500 nm contra um branco constituído por ácido sulfúrico e água. A absorvância do reagente vanilina e água nas mesmas proporções que a mistura reaccional foi medida também contra o mesmo branco. Este valor foi subtraído ao obtido para a mistura reaccional. O método Vanilina/HCl em metanol é baseado na variante melhorada proposta por Broadhurst & Jones<sup>8</sup>, cujo procedimento é o seguinte: juntaram-se 0.5 ml de solução de amostra (em água ou metanol) a 3 ml de reagente de vanilina (4 % (w/v) de vanilina em metanol) e a 1.5 ml de HCl concentrado. A reacção decorreu durante 15 min. num banho à temperatura ambiente e com os tubos protegidos com papel de alumínio do efeito da luz. A absorvância da mistura reaccional foi medida a  $\lambda = 500$  nm contra um branco de uma amostra de água. Os ensaios do método Vanilina/HCl em ácido acético glacial foram realizados exactamente da mesma forma do que os anteriores, apenas com a alteração do solvente metanol por ácido acético glacial e da absorvância passar a ser medida a 510 nm<sup>9</sup>. Como algumas amostras não se solubilizam em ácido acético, optou-se por realizar ensaios em que são dissolvidas num mínimo de água ou metanol e posteriormente diluídas em ácido acético glacial, numa proporção fixada em 1:99. Todos os ensaios químicos de análise de padrões ou amostras foram realizados em duplicado, sendo considerado o valor médio, no caso de ensaios concordantes; Análise Elemental: Uma parte da amostra foi moída num almofariz de ágata até se obter um pó homogéneo. Posteriormente, foi seca numa estufa de vácuo na presença de pentóxido de fósforo. Pesou-se 2 a 3 mg de amostra seca e colocou-se dentro de cápsulas de estanho à qual se adicionou também pentóxido de vanádio. A cápsula foi fechada e pressionada para remoção do ar no interior da mesma. O padrão com um teor de S de 7.44 % foi preparado de modo idêntico, tendo sido utilizados para calibrar o aparelho. Utilizou-se uma coluna S (apenas para quantificação de enxofre).

## Referências

- [1] Scalbert, A.; "Quantitative Methods for the Estimation of Tannins in Plant Tissues", in *Plant Polyphenols* (Hemingway, R. W., Laks, P. E., eds.) Plenum Press, New York (1992) p. 259-280.
- [2] Pizzi, A.; "Tannin Based Adhesives", *J. Macromol. Sci. - Rev. Macromol. Chem.*, C18 (2), 1980 p. 247-315.
- [3] Masson, E., Pizzi, A., Merlin, M.; "Comparative Kinetics of the Induced Radical Autocondensation of Polyflavonoid Tannins. II. Flavonoid Units Effects", *J. Appl. Polym. Sci.*, 64, 1997, p 243-265.
- [4] Fried, B., Sherma, J.; *Thin-Layer Chromatography: Techniques and Applications*, Chromatographic Science Series, Vol. 66, 3<sup>rd</sup> Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, (1994).
- [5] Koupai-Abyazani, M. R., Bohm, B. A.; "The Condensed Tannins of *Leptarrhena pyrolifolia*", *Phytochemistry*, 33 (6), 1993, p. 1485-1487.
- [6] Hergert, H. L.; "Chemical Composition of Tannins and Polyphenols from Conifer Wood and bark", *For. Prod. J.*, Nov. 1960, p. 610-617.
- [7] Browning, B. L.; *Methods of Wood Chemistry*, Vol. 2, Interscience Publishers - John Wiley & Sons, New York, (1967).
- [8] Broadhurst, R. B., Jones, W. T.; "Analysis of Condensed Tannins Using Acidified Vanillin", *J. Sci. Food Agric.*, 29, 1978, p. 788-794.
- [9] Butler, L. G., Price, M. L., Brotherton, J. E.; "Vanillin Assay for Proanthocyanidins (Condensed Tannins): Modification of the Solvent for Estimation of the Degree of Polymerization", *J. Agric. Food Chem.*, 30 (6), 1982 p. 1087-1089.
- [10] Butler, L. G.; "Relative Degree of Polymerization of Sorghum Tannin during Seed Development and Maturation", *J. Agric. Food Chem.*, 30 (6), 1982 p. 1090-1094.
- [11] Price, M. L., Van Scoyoc, S., Butler, L. G.; "A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain", *J. Agric. Food Chem.*, 26 (5), 1978 p. 1214-1218.
- [12] Feeny, P. P., Bostock, H.; "Seasonal Changes in the Tannin Content of Oak Leaves", *Phytochemistry*, 7, 1968, p. 871-880.
- [13] Hemingway, R. W.; "Opportunities to Use Bark Polyphenols in Specialty Chemical Markets", in *Proc. 2<sup>nd</sup> Residual Wood Conference - Wood Residues into Revenue*, Richmond, BC (1997) p. 80-85
- [14] Singleton, V. L., Rossi, Jr., J. A.; "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents", *Am. J. Enol. Viticul.*, 16, 1965 p. 144-158.
- [15] Swain, T., Hillis, W. E.; "The Phenolic Constituents of *Prunus domestica*, I. - The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents", *J. Sci. Food Agric.*, 10, 1959 p. 63-68.