Universidade Estadual de Maringá
Pós-Graduação em Física

Camilla Yara Langer Ogawa

Técnicas espectroscópicas para identificação e quantificação de compostos fenólicos sólidos

Orientadora: Profª. Dra. Francielle Sato

Maringá-PR, Janeiro de 2016

Universidade Estadual de Maringá

Pós-Graduação em Física

Camilla Yara Langer Ogawa

Técnicas espectroscópicas para identificação e quantificação de compostos fenólicos sólidos

Orientadora: Prof[a]. Dra. Francielle Sato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do título de Mestre em Física.

Maringá-PR, Janeiro de 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

O34t

Ogawa, Camilla Yara Langer
Técnicas espectroscópicas para identificação e quantificação de compostos fenólicos sólidos / Camilla Yara Langer Ogawa. -- Maringá, 2016.
57 f. : figs., tabs.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Francielle Sato.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Física, 2016.

1. Espectroscopia. 2. Espectroscopia fotoacústica. 3. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). 4. Espectroscopia Raman. 5. Compostos fenólicos. I. Sato, Francielle, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 23.ed. 535.84

GVS-003695

Aos meus amores

Sayuri e Jurandir

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por essa oportunidade.

À minha família, mãe (Lindamir), irmã (Paula) e meu cunhado (Hangel) obrigada pelo suporte emocional, paciência e carinho comigo e principalmente com minha filha nesta fase. Muito obrigada por todas as vezes que tiveram que deixar as própria vidas de lado para socorrer a minha.

Ao Jurandir, meu namorado amado, por todo apoio, compreensão, paciência e pelo carinho. Muito obrigada pelo seu amor e dedicação a nossa filha.

À minha orientadora Francielle Sato, a quem tenho enorme admiração, muito obrigada por toda dedicação, por confiar em mim e ser compreensiva com minhas limitações.

Muito obrigada ao professor Antonio Medina Neto por todo o auxílio e contribuição neste trabalho. A ele expresso meu respeito.

À professora Paula Pintro, do Departamento de Agronomia, pela colaboração desde o início desta pesquisa. Muito obrigada pelos materiais que forneceu e emprestou, por esclarecer minhas dúvidas sempre que precisei e por ter permitindo meu treinamento no HPLC do departamento de Zootecnia. Sua contribuição foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À Lidiane Vizioli pela amizade, por todo auxílio nas medidas de fotoacústica e por sempre estender uma mão quando precisei de ajuda.

Ao Gean Panizzon, do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela paciência em explicar a técnica de HPLC, e por toda contribuição e auxílio nas minhas medidas.

À Nadine Woruby, do programa de pós-graduação em Zootecnia, pelos valiosos esclarecimentos a respeito dos polifenóis e cromatografia.

Ao Fernando Enz, técnico do Comcap, pela amizade e por me ajudar nas medidas deste trabalho.

À minha amiga Adriane, pelo auxílio e amizade sincera.

Ao Gutierrez, por todo tempo dedicado a me ensinar os tratamentos matemáticos e pelas muitas discussões sobre espectroscopia.

À Giselly, por sua amizade e por toda contribuição nesta pesquisa.

Aos meus amigos de longa data Robson, Mayse, Jhionan e Mayara por estarem sempre ao meu lado nos piores e melhores momentos da minha vida.

Aos Professores do GEFF e do programa de pós-graduação em Física, pela colaboração, sugestões e importantes discussões.

À todos os funcionários do DFI/PFI-UEM, e em especial à Mônica.

Ao CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio financeiro

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa e a Universidade Estadual de Maringá por toda infraestrutura disponível para a realização deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições pessoais acerca desta dissertação.

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o potencial das espectroscopias no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Raman e fotoacústica (PAS), como técnicas a serem empregadas na identificação e quantificação de três compostos fenólicos: ácido gálico, catequina e quercetina em misturas físicas em pó. Após as caracterizações de todos os compostos separadamente, foram realizadas misturas físicas binárias e ternárias entre os mesmos a fim de avaliar a sensibilidade na separação dos compostos nas três espectroscopias. Primeiramente foram estudadas as misturas binárias (ácido gálico+catequina; ácido gálico+quercetina; catequina+quercetina) variando as concentrações em massa, e posteriormente foram misturados os três compostos (ácido gálico+catequina+quercetina). Para efeito de comparação as misturas físicas entre os polifenóis foram submetidos a análise de separação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) o qual é empregado de forma padrão para este tipo de análise. Para a técnica de FTIR foi possível obter uma curva de calibração, tal como procedimento para a técnica de HPLC. Comparando os resultados obtidos a técnica de FTIR mostrou-se promissora como metodologia a ser utilizada tanto na separação como na quantificação dos compostos fenólicos estudados. Já para espectroscopia Raman e PAS não foi possível construir uma curva de calibração adequada para cada técnica o que impossibilitou a utilização como técnicas de quantificação, entrentanto, tal como o FTIR, mostraram potencialidades na identificação de compostos fenólicos em misturas físicas.

ABSTRACT

In this work the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy and photoacoustic spectroscopy (PAS) were evaluated as potential techniques for identification and quantification of three phenolic compounds: Gallic acid, catechin and quercetin in physical mixtures. First of all the three compounds were characterized individually and then binary and tertiary physical mixtures were prepared with them in order to assess the three spectroscopies. Initially the binary mixtures were studied (gallic acid + catechin, gallic acid + quercetin, catechin + quercetin) varying the mass concentrations and then the three compounds were mixed (catechin + gallic acid + quercetin). The physical polyphenols mixtures were subjected to analytical separation and quantification using the high-performance liquid chromatography (HPLC), which is the standard technique for this kind of analysis to compare with spectroscopic techniques. For the FTIR technique it was possible to obtain a calibration curve, as well as procedure for the HPLC technique. Comparing on the obtained results, FTIR technique showed to be a promising methodology for separation and quantification. As for the Raman and PAS it was not possible obtain a suitable calibration curve making it impossible to use as quantification techniques, however such as FTIR they showed potential in identifying polyphenolic compounds in physical mixtures.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1: Concentrações (% em massa) das amostras utilizadas 25
Tabela 3-2: Concentrações (% em massa) das amostras testes. 25
Tabela 4-1: Caracterização dos picos mais relevantes de FTIR do ácido gálico. 30
Tabela 4-2: Caracterização dos picos mais relevantes de FTIR da catequina. 31
Tabela 4-3: Caracterização dos picos mais relevantes de FTIR da quercetina. 32
Tabela 4-4: Teste da curva de calibração do ácido gálico. 44
Tabela 4-5: Teste da curva de calibração da catequina 45
Tabela 4-6: Teste da curva de calibração da quercetina 46
Tabela 4-7: Teste da curva de calibração do ácido gálico para o grupo 1. 58
Tabela 4-8: Teste da curva de calibração da quercetina para o grupo 1. 58
Tabela 4-9: Teste da curva de calibração da catequina para o grupo 1. 59
Tabela 4-10: Teste da curva de calibração do ácido gálico para o grupo 2. 59
Tabela 4-11: Teste da curva de calibração da catequina para o grupo 2. 60
Tabela 4-12: Teste da curva de calibração da quercetina para o grupo 2. 60

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1: Estrutura química do ácido gálico. 14
Figura 2-2: Estrutura química da Catequina. 15
Figura 2-3: Estrutura química da quercetina 16
Figura 2-4: Esquema de um espectrômetro de FTIR utilizado. 17
Figura 2-5: Princípios de espalhamento Raman. 19
Figura 2-6: Representação de uma célula fotoacústica fechada 22
Figura 2-7: Representação das principais partes de um cromatógrafo líquido. 24
Figura 3-1: Aparato experimental da espectroscopia fotoacústica 28
Figura 4-1: Espectro de FTIR entre 4000 à 400cm^{-1} do ácido gálico. 29
Figura 4-2: Espectro de FTIR entre 4000 à 400cm^{-1} da catequina. 31
Figura 4-3: Espectro de FTIR entre 4000 à 400cm^{-1} de quercetina. 32
Figura 4-4: Espectro de FTIR (1900-400 cm^{-1}) de ácido gálico, catequina e quercetina. 33
Figura 4-5: Exemplo de ajuste gaussiano para a banda 1703 cm^{-1} do ácido gálico 34
Figura 4-6: Curva de calibração do ácido gálico, adquirida pela técnica de FTIR. 35
Figura 4-7: Exemplo de integração sob a banda 1145 cm^{-1} da catequina. 36
Figura 4-8: Curva de calibração da catequina, adquirida pela técnica de FTIR. 36
Figura 4-9: Exemplo de ajuste gaussiano para a banda 1671 cm^{-1} da quercetina 37
Figura 4-10: Curva de calibração para a quercetina, adquirida pela técnica de FTIR. 38
Figura 4-11:Espectros e misturas físicas entre ácido gálico e catequina. 40
Figura 4-12:Bandas analisadas na mistura entre ácido gálico) e catequina. 40
Figura 4-13: Espectros a mistura de ácido gálico com quercetina. 41
Figura 4-14: Picos analisados na mistura entre ácido gálico e quercetina 41
Figura 4-15: Espectros a mistura entre catequina e quercetina 43
Figura 4-16: Bandas de referência na mistura entre catequina e quercetina 43
Figura 4-17: Espectro Raman de ácido gálico, catequina e quercetina. 47
Figura 4-18: Espectro fotoacústico do ácido gálico, catequina e quercetina. 50
Figura 4-19: (A)Espectros fotoacústico das misturas binárias de ácido gálico + catequina; (B) Variação da intensidade da banda centrada em 468 nm 51
Figura 4-20: Cromatograma com excitação em 275 nm (50 µg/mL de cada substância). 53
Figura 4-21: Cromatograma com excitação em 365 nm (50 µg/mL de cada substância). 53
Figura 4-22: Espectro de absorção do ácido gálico na região de UV-Vis (200 – 800 nm). 53
Figura 4-23: Espectro de absorção da catequina na região de UV-Vis (200 – 800 nm). 54
Figura 4-24: Espectro de absorção da quercetina na região de UV-Vis (200 – 800 nm). 54
Figura 4-25: Curva de calibração para ácido gálico, utilizando a técnica HPLC. 55
Figura 4-26: Curva de calibração para catequina, utilizando a técnica HPLC. 56
Figura 4-27: Curva de calibração para quercetina, utilizando a técnica HPLC. 56

Sumário

1 INTRODUÇÃO 9
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 12
2.1 Compostos fenólicos 12
2.1.1 Ácido gálico 13
2.1.2 Catequina 14
2.1.3 Quercetina 15
2.2 Técnicas experimentais 16
2.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR 16
2.2.2 Espectroscopia Raman 18
2.2.3 Espectroscopia fotoacústica 21
2.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC 23
3 MATERIAIS E MÉTODOS 24
3.1 Técnicas utilizadas para identificação e quantificação de compostos fenólicos 25
3.1.1 FTIR 25
3.1.2 HPLC 26
3.2 Técnicas utilizadas para caracterização dos compostos fenólicos 27
3.2.1 Espectroscopia Raman 27
3.2.2 PAS 28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 29
4.1 FTIR 29
4.1.1 Caracterização dos espectros 29
4.1.2 Bandas de referência dos compostos fenólicos utilizados para análise 33
4.1.3 Curva de calibração 34
4.1.4 Mistura física dos compostos 38
4.1.5 Teste das curvas de calibrações 44
4.2 Espectroscopia Raman 47
4.3 PAS 49
4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC 51
4.4.1 Cromatogramas 52
4.4.2 Curvas de calibrações para o HPLC 55
4.4.3 Mistura física entre os compostos fenólicos 57
4.4.4 Teste das curvas de calibrações 57
5 CONCLUSÕES 62
6 REFERÊNCIAS 64

1 INTRODUÇÃO

Os polifenóis ou compostos fenólicos são substâncias que estão difundidas por todo o reino vegetal. Encontrados facilmente em frutas, legumes, cereais, raízes e nos produtos derivados desses, como em chás, vinhos e chocolate. Atuam nas plantas como metabólitos secundários[1], e nos alimentos contribuem na cor, sabor e na estabilidade oxidativa [1].

No final do século XX, estudos epidemiológicos sugeriram que dietas ricas em polifenóis vegetais oferecem proteção contra o desenvolvimento de cânceres, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e doenças neurodegenerativas [1, 2]. Com isso, houve um aumento no interesse científico em pesquisas sobre esses compostos com objetivo de entender os efeitos biológicos dos polifenóis na dieta e sua importância na saúde humana. Atualmente, estudos sobre alguns flavonoides e ácidos fenólicos, que são classes de polifenóis, propõem que a atividade antioxidante desses compostos são responsáveis pela proteção contra doenças [2-6].

Os compostos fenólicos, além de propriedades antioxidantes, podem apresentar propriedades pró-oxidativa dependendo da concentração em que são utilizadas, ou seja, as mesmas características que favorecem a proteção contra doenças podem colaborar para o estresse oxidativo e causar danos às células [7, 8]. Por essa razão, é de grande importância conhecer a estrutura química do composto fenólico, desenvolver e aprimorar técnicas de identificação e quantificação que possam ser acrescentadas à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), considerada uma técnica consolidada na quantificação de compostos fenólicos.

A espectroscopia é uma área científica que busca estudar a interação da radiação com a matéria. A resposta do material excitado pode ser monitorada em diferentes regiões do espectro de radiação eletromagnética, tais interações podem resultar em transições eletrônicas (região do ultravioleta-visível), vibrações moleculares (região do infravermelho) ou orientações de spin nuclear (região das ondas de rádio). Estas respostas podem, por exemplo, se dar em forma de absorção ou espalhamento da radiação incidente. Assim as técnicas espectroscópicas fornecem informações sobre ligações moleculares a partir do estudo das transições energéticas induzidas na amostras pela radiação eletromagnética incidente, podendo ser empregadas em diversos

[1] Os metabólitos secundários são compostos responsáveis em proteger as plantas dos patógenos, podem atuar como antibióticos, antifúngicos, antivirais, além de absorverem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas [56].

materiais. Além de serem técnicas minimamente destrutivas e que demandam pequena quantidade de amostra.

Devido a estas propriedades, os compostos orgânicos são amplamente estudados por técnicas espectroscópicas, pois oferecem muitos mecanismos de interação com os diferentes comprimentos de onda do espectro de radiação eletromagnético [9-12]. Sendo crescente a necessidade de aprimoramento e desenvolvimento de métodos para compreensão dos mecanismos bioquímicos mediados por polifenóis [9], sendo estes diretamente correlacionados a efeitos celulares no corpo humano, vem se fazendo uso das técnicas espectroscópicas para identificar e quantificar compostos fenólicos em alimentos, plantas e até em cultura de células [9, 11 e 13]. Em comparação com métodos bem estabelecidos utilizados com este propósito, como por exemplo, métodos cromatográficos, as técnicas espectroscópicas mostram-se vantajosas em termos da relação custo-benefício, menor tempo de medida [10, 14], e maior versatilidade com relação a detecção dos mecanismos de interação radiação-matéria, o que facilita trabalhar tanto com amostras sólidas como líquidas.

Dentre as técnicas espectroscópicas que vem sendo aplicadas no estudo de polifenóis destacam-se as espectroscopia no infravermelho e no ultravioleta-visível (UV-vis). A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a espectroscopia Raman, por envolverem respostas, mediante a interação da radiação incidente com o material, fornecem informações sobre os modos vibracionais e/ou rotacionais das moléculas. A técnica de FTIR depende da absorção de radiação no infravermelho e variação do momento de dipolo da molécula, com esses dois requisitos atendidos é possível obter espectros que correlacionam a quantidade ou concentração de um dado grupo funcional que vibra na mesma frequência que a radiação incidente. Sendo a radiação infravermelha composta de diferentes frequências, nos espectros é viável observável diferentes frequências associados a modos normais vibração. Cada frequência de vibração é única, o que garante o caráter promissor da técnica na identificação de diferentes compostos em um mesmo material [15, 16].

Na espectroscopia Raman utiliza-se o monitoramento do espalhamento inelástico que a radiação incidente sofre ao interagir com as moléculas da amostra. Tal fenômeno é dependente da absorção da radiação incidente, neste caso uma luz monocromática, ou seja, uma única frequência, e variação da polarizabilidade da molécula, sendo esta a regra de seleção para que haja espalhamento Raman. Satisfazendo estas condições e detectando este efeito na região do infravermelho, pode-se estudar também por meio de espectros a relação entre a intensidade do espalhamento Raman em função da frequência, que também fornece frequências únicas para

cada tipo de modo vibracional detectado. Como a técnica de FTIR e a espectroscopia Raman, são métodos que monitoram a interação radiação-matéria na região do infravermelho e que atendem condições físicas diferentes, considera-se que ambas são complementares uma da outra. A possibilidade de empregar estas duas técnicas em estudos de caracterização e quantificação de compostos em misturas físicas permite uma vasta gama de pesquisa, principalmente em compostos orgânicos, os quais por técnicas analíticas tradicionais necessitam de ampla preparação dos materiais.

Ainda no estudo de materiais orgânicos, a espectroscopia na região do ultravioleta-visível é empregada pois a maioria dos cromóforos são absorvedores neste intervalo espectral [17]. Usualmente emprega-se medidas de transmissão na espectroscopia ultravioleta-visível, entretanto a saturação do sinal de transmitância devido à alta concentração destes compostos, muitas vezes se torna um empecilho na utilização desta técnica. Na espectroscopia fotoacústica (PAS) o sinal fotoacústico depende da absorção da radiação incidente e da geração de calor na amostra, sendo assim altas concentrações de um composto afetam menos a medida, podendo elevar o nível de detecção dos compostos em misturas. O sinal fotoacústico é diretamente proporcional ao coeficiente de absorção óptico da amostra, o que pode ser comparado a espectros de absorção obtidos por espectrômetros convencionais [18]. A detecção da PAS na região do UV-vis é sensível, pois geralmente são empregadas fontes de excitação com grande emissão nesta região. A maioria dos cromóforos dos compostos fenólicos estão na região do UV-vis, desta maneira utilizando a sensibilidade da PAS é possível também identificar diferentes polifenóis em misturas em pó, independendo do uso de solventes.

Associando as técnicas de FTIR, espectroscopia Raman e PAS este trabalho tem o objetivo, visando à aplicabilidade e o interesse científico, de testá-las como métodos de separação e quantificação de compostos fenólicos sólidos em misturas físicas. Comparando os resultados obtidos com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, consagrada como umas técnicas de caracterização e quantificação de compostos orgânicos.

Esta dissertação está dividida em 5 capítulos, no qual o primeiro capítulo é a introdução sobre o que será desenvolvido. No segundo capítulo tem-se uma revisão teórica dos materiais estudados e das técnicas utilizadas para caracterizá-los e quantificá-los. O terceiro capítulo dispõe-se de uma descrição dos materiais e métodos utilizados nessa pesquisa. No quarto capítulo apresenta-se as análises e discussões dos resultados. E por fim, no capítulo 5 a conclusão e perspectivas futuras.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Compostos fenólicos

A estrutura de um fenol consiste em uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático, diferenciando pela associação com outros compostos, como grupos carboxílicos, ácidos orgânicos, aminas, lípidos e ligação com outros fenois. Existem mais de 8.000 compostos polifenólicos identificados em várias espécies de plantas [1]. Os polifenóis podem ser classificados em pelo menos 10 classes diferentes com base em suas estruturas químicas gerais, como uma função do número de anéis de fenol que eles contêm e com base nos elementos estruturais que se ligam a estes anéis entre si. As principais classes incluem ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas [2].

Os flavonóides, tais como a quercetina e catequina, apresentam estrutura química C_6-C_3-C_6 e são gerados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina e ácido acético. São responsáveis pelas cores das pétalas de flores, e na maioria das vezes emitem uma fluorescência intensa quando excitados por radiação ultravioleta (UV), além de controlar o nível de auxinas, que são hormônios que regulam o crescimento nas plantas [19]. Sua formação nos vegetais depende da incidência de radiação UV, portanto plantas produzidas em estufas possuem menos flavonoides que as cultivadas em campos abertos. Como consequência, estudos apontam que os vegetais que crescem na Espanha ou na África do Sul contem 4 a 5 vezes mais flavonoides que os cultivados no Reino Unido, diferença causada pela incidência dos raios solares nesses países [20]. As principais classes de flavonoides são os flavonóis, flavonas, antocianidinas e isoflavonas.

Os compostos fenólicos não flavonoides podem ser derivados das estruturas químicas C_6-C_1 (ácidos gálico, hidroxi benzóico, e elágico), C_6-C_3 (ácido cafêico, p-cumárico e hidroxi ciamatos) e C_6-C_2-C_6 (trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídio) [21].

As propriedades antioxidantes[2] atribuídas aos compostos fenólicos e seus diversos benefícios a saúde humana, como por exemplo proteção ao desenvolvimento de cânceres, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e doenças neurodegenerativas, deve-se a sua estrutura química e a suas propriedades redutoras que neutralizam os radicais livres e quelam

[2] Os antioxidantes são compostos que podem diminuir ou inibir a oxidação das moléculas, atuando principalmente no início ou na propagação das reações em cadeia de oxidação [21].

metais de transição[3], além de decompor o oxigênio triplete e singlete em peróxidos [1, 22]. Os organismos vivos sofrem constantemente à ação oxidativa do oxigênio. As doenças citadas podem estar ligadas aos danos causados pela interação das substâncias, chamadas de reativas oxigenadas *(ROS)* ou de substâncias extremamente reativas ao oxigênio que são as principais responsáveis pelo envelhecimento do corpo [23].

Os alimentos também passam pelo processo de oxidação, que é uma das principais causas dos prazos curtos de validade de produtos alimentícios industrializados. As reações oxidativas nesses produtos são principalmente o escurecimento enzimático e a reação de oxidação de lipídeos, que altera o sabor, cheiro e textura. Os antioxidantes adicionados aos produtos alimentícios estabilizam os ácidos graxos por meio da reação com radicais livres, além de quelar íons metálicos evitando assim a propagação da oxidação lipídica. A resolução nº 04 de 24/11/88 aprova e regulariza a quantidade permitida de substâncias antioxidante em diversos tipos de alimentos, entretanto os antioxidantes sintéticos mais empregados, têm demonstrado em alguns estudos que podem favorecer os efeitos mutagênicos e carcinogênicos, tornando-se preocupante a utilização dos mesmos [21, 24].

Em geral, estudos sugerem que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos pode acarretar em uma grande variedade de benefícios à saúde, dada a sua atividade antioxidante, porém algumas das mesmas características estruturais que otimizam a capacidade antioxidante, também podem acentuar o estresse oxidativo e causar danos funcionais e estruturais nas moléculas celulares, por isso torna-se fundamental estudos aprofundados sobre essas substâncias, assim como desenvolver e aprimorar métodos eficientes para identificar e quantificar compostos fenólicos, como por exemplo em extratos, e assim avaliar o efeito antioxidante ou pró-oxidativo à cada composto [7, 25].

2.1.1 Ácido gálico

O ácido gálico (Fig. 2-1), também conhecido como ácido 3,4,5-triidróxi-benzóico, é uma substância fenólica com fórmula molecular $C_7H_6O_5$, derivada do ácido benzóico e componente de taninos hidrolisáveis, dos quais são liberados por hidrólise ácida. É oxidável tanto por meio de enzimas vegetais quanto por influência de metais, luz, calor e meio alcalino.

[3] Metais de transição são um conjunto de átomos que possuem orbital "d" totalmente preenchido, ou que possa vir a formar cátions com o orbital "d" incompleto [57].

Sua oxidação causa um escurecimento da substância, independentemente se estiver em estado sólido ou em solução [8].

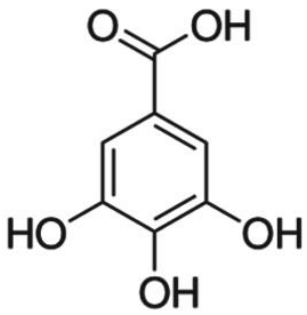

Figura 2-1:Estrutura química do ácido gálico [3]**.**

Assim como todos os compostos fenólicos o ácido gálico pode formar ligações de hidrogênio, pois contém hidroxilas polarizáveis pertencentes aos grupos fenólico e carboxílico do material. O ácido gálico age como antioxidante inibindo radicais livres, e também tem atividade analgésica comparável à do ácido acetilsalicílico e do paracetamol, além de possuir atividade citotóxica para alguns tipos de células tumorais. Segundo outros estudos [3, 26], o ácido gálico em baixas concentrações pode estimular o efeito oxidativo, por possuir nessas condições maior habilidade redutora podendo inclusive causar danos ao DNA por meio da redução de cobre.

2.1.2 Catequina

A catequina, (2R, 3S) -2- (3,4-di-hidroxifenil) -3,4-di-hidro-2H-cromeno-3,5,7-triol, é um composto polifenólico com fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ pertencente ao grupo dos flavonoides, sua estrutura química pode ser conferida na Fig. 2-2. É encontrada comumente em frutas, folhas de chá, vinhos, batatas e em outros vegetais e plantas. A sua atividade antioxidante tem atraído a atenção devido ao seu efeito preventivo eficaz no combate a oxidação de alimentos, limitando a reação em cadeia de ácidos graxos e aumentando a proteção contra doenças em humanos, como doença cardíaca coronária e o crescimento de células cancerigenas [27]. Dentre os benefícios a saúde incluem-se as propriedades antimutagênica , anticancerígena, antiviral, antimicrobiana e anti-inflamatória [4, 28].

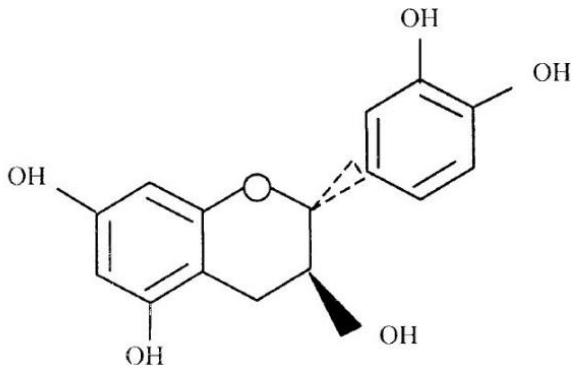

Figura 2-2: Estrutura química da Catequina [27]**.**

Alguns estudos constam que nos países ocidentais, uma em cada dez mulheres irá desenvolver câncer de mama, enquanto no Japão, um país em que beber chá verde (*Camellia sinensis*) é parte integrante do estilo de vida, apenas uma a cada quarenta mulheres irão desenvolver câncer de mama. Isso devido ao chá verde conter uma grande quantidade de catequina [29], entretanto a catequina também pode oferecer, assim como o ácido gálico, propriedades pró-oxidativas [28]. Em outro estudo feito com pessoas entre 25 a 55 anos de idade, com índice de massa corpórea (IMC) entre 24 a 30 kg/m^2 e com a circunferência da cintura medindo entre 80 à 94 cm, foi constatado que após o acompanhamento de 12 semanas, ingerindo uma bebida com grande quantidade de catequina diariamente, tiveram a circunferência do quadril e da cintura diminuídas significantemente, assim como o aumento da massa magra, sugerindo que o consumo de catequina, especialmente em quantidades elevadas, reduz gordura corporal, os níveis de colesterol e pressão arterial em mulheres e homens sem a necessidade de uma dieta complementar ao consumo da bebida [5].

2.1.3 Quercetina

A quercetina (3,3',4',5',7 - pentaidróxi-flavona), é um flavonoide pertencente a classe dos flavonóis, possui coloração amarela e fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$. É o mais consumido dos compostos fenólicos, pois representa cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos na dieta humana, seu consumo está estimado entre 50 a 500 mg /dia. A cebola, maçã e brócolis são as fontes que possuem o maior teor de quercetina [25]. A estrutura química da quercetina está representada na Fig. 2-3, e ela consiste em dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano.

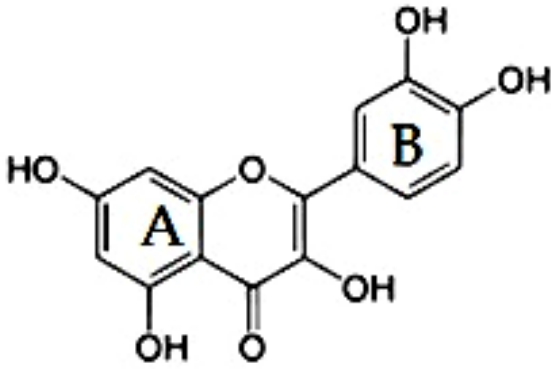

Figura 2-3: Estrutura química da quercetina [30]

Alguns testes em ratos mostraram que a quercetina incorporada a matrizes de colágenos, retarda a lesão oxidante e morte celular por sequestro de radicais de oxigênio, auxiliando na cura de feridas na pele de ratos, além de proteger contra a peroxidação lipídica [31]. Outros estudos também em ratos, sugeriram que o uso da quercetina ajuda de maneira significante a diminuir as alterações bioquímicas provocadas por cirrose, aumentando o tempo de sobrevivência dos animais [6].

2.2 Técnicas experimentais

2.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

A radiação infravermelha foi descoberta por Herschel, em 1800, mas somente 100 anos mais tarde foi utilizada por Coblentz para se obter espectros de absorção no infravermelho, o qual obteve espectros de um grande número de compostos orgânicos em estado sólido, líquido e vapor. A absorção no infravermelho ocorre quando a frequência da radiação incidente estiver em ressonância com a frequência de vibração da molécula, desde que haja variação de seu momento de dipolo elétrico [15].

O instrumento fundamental em um espectrômetro de FTIR é o interferômetro, que pode ser conferido na Fig. 2-4. Um interferômetro é constituído de um divisor de feixes que reflete e transmite parcialmente a radiação que o atinge e de dois espelhos, sendo um fixo e outro que se movimenta constantemente com uma frequência fixa. A fonte de excitação emite radiação no infravermelho composta de diferentes frequências, que incide no divisor de feixes, sendo parcialmente refletida ao espelho fixo e parcialmente transmitida ao espelho móvel, após as reflexões nos espelhos estas se recombinam novamente no divisor de feixes e se propagam até a amostra, e então a radiação não absorvida pela amostra é direcionado ao detector. A utilização

do interferômetro ao invés de elementos dispersivos dinamiza o processo de medida, já que todas as frequências transmitidas pela amostra são detectadas simultaneamente [32].

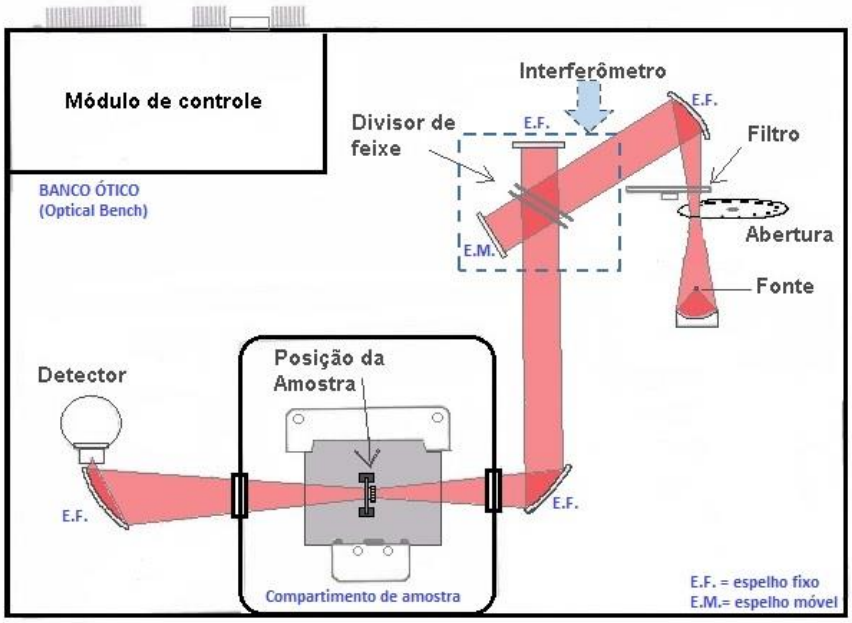

Figura 2-4: Esquema de um espectrômetro de FTIR utilizado.
Adaptado do manual de usuário [33]**.**

Com a variação constante da posição do espelho móvel os feixes combinados podem estar em fase ou defasados resultando em um interferograma com máximos e mínimos de intensidade. Entretanto, o interferograma é uma função descrita no espaço temporal, não fornecendo diretamente informações com relação aos modos vibracionais das moléculas da amostra, sendo assim é realizada a transformada de Fourier no sinal detectado convertendo o interferograma em espectro no espaço das frequências, que mostra a variação da intensidade transmitida pela amostra em função da frequência, sendo esta proporcional a energia. Cada pico em um espectro de absorção no infravermelho indica um modo vibracional da amostra, que pode ser chamado de infravermelho ativo, nem todas as ligações químicas presentes na amostras mostram picos no espectro de infravermelho, pois para isso é necessário que o momento de dipolo da ligação entre os átomos varie durante a interação com o campo elétrico da radiação incidente [15].

O FTIR é uma técnica muito versátil permitindo a medida em materiais opticamente opacos e transparentes, e ainda em fase líquida, sólida ou gasosa, pois os espectrofotômetros podem ser acoplados a acessórios de reflectância, esferas integradoras, microscópios, células com fluxo de gás ou líquidos, entre outros. Além de ser minimamente destrutiva e demandar uma pequena quantidade de amostra. É muito utilizada para a identificação tanto de compostos

orgânicos como inorgânicos, pois cada pico referente a um número de onda é o modo vibracional em frequências discretas. Por depender diretamente da absorção da radiação incidente na amostra, os picos nos espectros podem ser correlacionados a quantidade/concentração de um determinado compostos da amostra. Se cada composto mostrar um pico infravermelho ativo no espectro da amostra em números de onda diferentes, é possível identificar compostos diferentes em uma mesma amostra.

No processo de quantificação utilizando espectros no infravermelho pode ser avaliado as intensidades dos picos diretamente do espectro, entretanto é importante tomar um pico de referência e analisar a intensidade relativa, pois a intensidade também depende de condições experimentais. Tratamentos matemáticos como cálculo da área de picos por integração ou decomposição espectral também são bastante utilizados na quantificação de componentes. Em relação as técnicas que obrigatoriamente necessite de diluição em solventes para identificação e quantificação, a espectroscopia no infravermelho pode ser realizada em materiais sólidos, evitando a contribuição de solventes e garantindo as propriedades nesta fase. Fenômenos de luminescência, por exemplo, não tem contribuição direta aos espectros, tal como na espectroscopia Raman.

No caso de soluções aquosas ou de amostras higroscópicas a técnica de FTIR é influenciada, pois os modos vibracionais da água estão presentes, principalmente, na região do infravermelho médio, sobrepondo possíveis picos das amostras de interesse.

2.2.2 Espectroscopia Raman

O efeito de espalhamento inelástico de fótons (efeito Raman) foi descoberto em 1928, pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman, agraciado com o Prêmio Nobel de Física em 1930 por suas descobertas sobre a "difração molecular da luz" em líquidos e a "difusão de gases". A espectroscopia Raman é uma técnica baseada na detecção do espalhamento Raman, a qual fornece informações sobre os modos vibracionais da molécula em estudo, permitindo a caracterização da sua estrutura molecular [34].

Técnicas espectroscópicas dependem da interação da radiação incidente com a matéria atingida, no caso da espectroscopia Raman, uma fração da energia absorvida é retransmitida na forma de luz espalhada sendo também, composta por frequências diferentes da incidente; este fenômeno é chamado de espalhamento Raman [34]. Para tanto, a molécula analisada sofre uma transição de estado, que passa do estado fundamental para um estado vibracional excitado, com absorção simultânea de um fóton incidente e emissão de um fóton espalhado. O fóton espalhado

pode resultar em espalhamento elástico (Rayleigh), no qual tem a mesma energia do fóton incidente ou em espalhamento inelástico, sendo espalhado com menor (Stokes) ou maior (Anti-Stokes) energia que o fóton incidente, como está apresentado na Fig. 2-5. Assim a espectroscopia Raman é uma técnica que mede essas transições de estados [15].

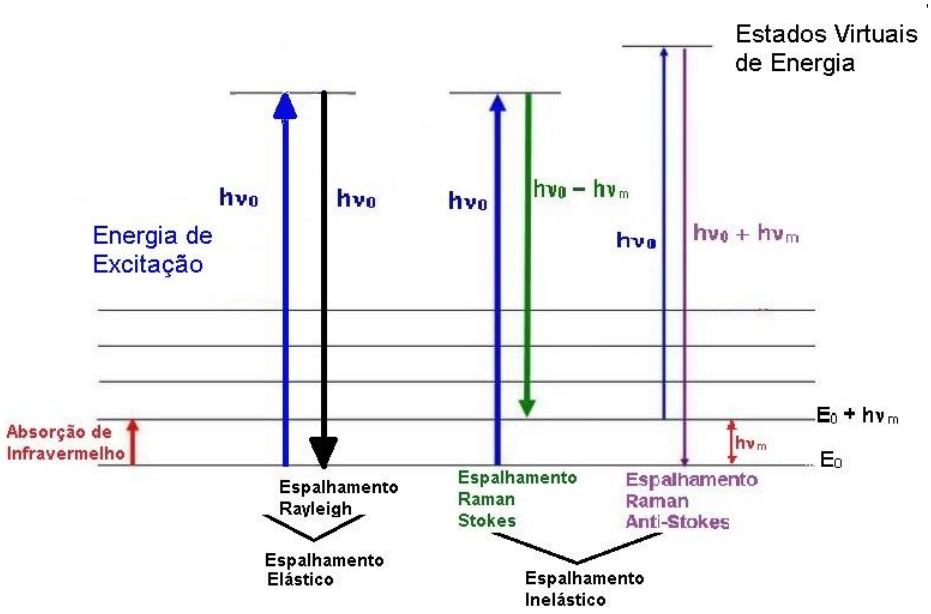

Figura 2-5: Princípios de espalhamento Raman, sendo $h\nu_0$ a energia do fóton que colide com a molécula, $h\nu_m$ é a energia de vibração da molécula, E_0 é estado fundamental de energia vibracional e $E_0 + h\nu_m$ é um estado excitado de energia vibracional. Adaptado de [35]**.**

Nota-se que no espalhamento Raman Stokes, a molécula após colidir com o fóton, passa de um estado fundamental para um estado virtual de energia e decai para um nível excitado. No espalhamento Rayleigh, após interagir com o fóton, ela sobe para um nível virtual, mas decai em seguida para o nível de energia inicial, enquanto no espalhamento Raman anti-Stokes, o fóton colide com a molécula, que já estava em um estado excitado, e decai para o estado fundamental e possui intensidade menor que o Stokes, pois no estado excitado da molécula (onde o fóton incidente encontra a molécula no anti-Stokes) a sua população decresce de acordo com a distribuição de Boltzmann [15].

Para que o modo de vibração seja Raman ativo, ou seja, apresente espalhamento Raman é necessário que durante a interação da radiação incidente (luz monocromática) com a molécula seja satisfeita a regra de seleção no efeito Raman, na qual deve haver uma variação da polarizabilidade na molécula causada pelo campo elétrico incidente. Quando ocorre uma mudança maior na polarizabilidade na nuvem de elétrons, como encontrado em uma dupla ligação carbono-carbono, a nuvem é facilmente distorcida, pois o vínculo estiramento e/ou

flexão provoca uma mudança significativa na densidade da nuvem eletrônica induzindo um momento de dipolo. Assim, a ligação OH possui polarizabilidade baixa, por causa da distribuição não uniforme da nuvem de elétrons favorecendo o átomo de oxigênio. Isso é devido ao fato de que a ligação OH, tem uma vibração fraca, que é ideal para sistemas aquosos [34]. O momento de dipolo induzido na molécula pode ser representado como $\mathbf{P}=\alpha\mathbf{E}$, sendo $\boldsymbol{\alpha}$ é a polarizabilidade da molécula e **E** o campo elétrico da radiação incidente [15, 36].

Entre as vantagens da espectroscopia Raman destaca-se a aplicação em diferentes amostras, podendo ser utilizada desde à identificação de substâncias em misturas físicas ou até mesmo em processos que haja interações químicas entre elas [16]. Diferentemente da técnica de FTIR os modos vibracionais da água contribuem minimamente nos espectros Raman, pois a molécula de água apresenta baixa variação na polarizabilidade.

Usualmente a espectroscopia Raman não fornece diretamente análise quantitativa, entretanto em estudos comparativos, como por exemplo, em função do tempo de algum processo ou variação de concentração de algum composto pode ser empregada em caráter que quantificação. Ou até mesmo, se possível for, obter uma curva de calibração[4] para um determinado composto presente em uma mistura a espectroscopia Raman pode ser utilizada para identificação e quantificação de compostos Raman ativos.

Tratamentos matemáticos nos espectros Raman são necessários na quantificação de substâncias em uma amostra, pois a intensidade depende diretamente das condições experimentais. Comumente são utilizadas funções matemáticas que descrevam a simetria da banda Raman, cálculo da área sob as bandas, razões entre intensidades do espectro, entre outros. Diretamente do espectro além obter a caracterização dos picos de acordo com seus modos vibracionais, é possível analisar deslocamentos destes. A partir dos deslocamentos pode se obter um método de quantificação, pois se o processo no qual a amostra for submetida variar o modo de vibração de suas moléculas, este parâmetro pode ser avaliado quando comparado ao estágio inicial deste processo.

A desvantagem mais conhecida da espectroscopia Raman é a contribuição da luminescência da amostra analisada que depende do comprimento de onda da fonte de excitação, em casos que a amostra absorva a radiação incidente reemitindo radiação no infravermelho. A luminescência do material pode sobrepor-se as bandas Raman, dificultando a análise espectral.

[4] Curva de calibração é a função obtida da relação entre o sinal observado (y) dada uma certa quantidade de analito (x). Em geral, é utilizada em um processo de comparação para predizer o valor de x.

É esperado que os picos de luminescência tenham maiores intensidades que os picos Raman, devido ao processo de recombinação dos portadores, entretanto nem sempre é trivial distinguir os dois fenômenos físicos em um espectro Raman. Como os espectros Raman mostram a diferença entre a frequência de radiação incidente e a espalhada, e os de luminescência mostram a energia da radiação emitida, que dependem dos estados eletrônicos, desde que a energia de excitação seja maior que a diferença de energia de dois estados, ao mudarmos o comprimento de onda de excitação o espalhamento Raman não se altera, enquanto que a luminescência apresenta contribuições diferentes para diferentes comprimentos de onda.

Outra particularidade da técnica é com relação ao espalhamento elástico da fonte de excitação que pode apresentar contribuição no espectro Raman, também prejudicando a análise espectral se sobrepondo as bandas Raman.

2.2.3 Espectroscopia fotoacústica

A PAS estuda a interação de uma radiação incidente modulada com a matéria por meio do efeito fotoacústico. A técnica fotoacústica se caracteriza pela obtenção de espectros fotoacústicos que são proporcionais ao coeficiente de absorção óptico da amostra e tem dependência com a frequência de modulação [37].

O efeito fotoacústico foi percebido acidentalmente em 1880 por Alexandre Graham Bell, que utilizava como detector o próprio ouvido enquanto trabalhava em um fotofone [38]. Percebendo que a célula de selênio do seu aparato, emitia um sinal audível quando era exposto a um feixe de luz modulado. Posteriormente, ele estudou o efeito fotoacústico em líquidos e gases chegando à conclusão de que os efeitos sonoros dependiam do tipo de substâncias que eram expostas à radiação, e que os sons eram específicos de cada raio do espectro que eram absorvidos pelo corpo [39, 40].

Na espectroscopia fotoacústica, a amostra pode ser condicionada em uma célula fechada que é preenchida por um gás, que pode ser o próprio ar, com um microfone acoplado. A amostra é então iluminada por um feixe de luz monocromático[5] modulado (Fig. 2-6), o microfone detecta a variação de pressão do gás na célula devido a absorção da luz modulada pela amostra, e o sinal analógico a partir do microfone é sintonizado a um amplificador que registra o sinal como uma função do comprimento de onda da luz incidente [37, 18, 41].

[5] A luz monocromática é dispersada anteriormente por um elemento dispersivo

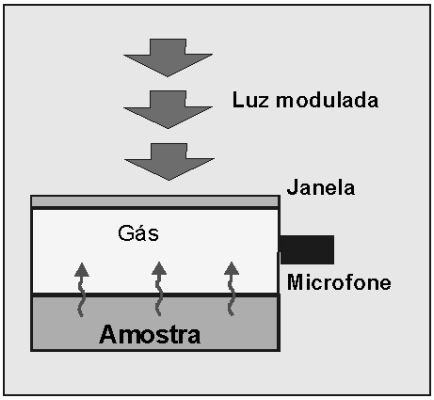

Figura 2-6: Representação de uma célula fotoacústica fechada [42]**.**

Os mecanismos de geração de sinal fotoacústico em sólidos podem ou não coexistir como por exemplo: a difusão térmica, a expansão térmica e a expansão termoelástica. Neste estudo apresentaremos um breve comentário somente sobre a difusão térmica, já que os compostos fenólicos analisados obedecem somente a este mecanismo.

A difusão térmica que ocorre quando existe um fluxo térmico gerado na amostra que se propaga até o gás circundante, provocando neste uma variação da temperatura com a mesma frequência de modulação da luz incidente. No entanto, apenas uma fina camada de gás, nas vizinhanças da amostra, é que responde termicamente às flutuações de temperatura da amostra. Esta camada irá expandir e contrair, funcionando como um pistão vibratório sobre o resto da coluna de gás, gerando assim o sinal fotoacústico [18, 43].

Uma das principais vantagens da PAS é a obtenção de espectros fotoacústicos de materiais sólidos, semi-sólidos, líquidos e gases. A luz espalhada ou efeitos de luminescência, que em outras técnicas pode ser um fator negativo, não contribui para a PAS. Entre outras aplicações, essa técnica é empregada também na caracterização das propriedades térmicas da matéria, como a medida de difusividade térmica, efusividade térmica, do tempo de relaxação não radiativo e perfil de profundidade, já que a técnica é passível de atuar em diferentes frequências dependendo da configuração experimental. Essa técnica permite a análise de amostras tanto opticamente opacas quanto transparentes e na maioria dos casos, não exige uma preparação rigorosa da amostra.

Na PAS usualmente é empregada uma fonte de excitação que abrange um grande intervalo espectral como, por exemplo, lâmpada de xenônio, sendo assim é possível realizar leituras desde o ultravioleta até o infravermelho, entretanto por geralmente empregar um sistema dispersivo a resolução espectral pode ser inferior na região do infravermelho quando comparada a técnicas de espectroscopias vibracionais como Raman ou FTIR.

2.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

A cromatografia como técnica analítica surgiu em 1906 com trabalhos do botânico russo Mikhail Semenovich Tswett, que utilizando uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel, para carregar os componentes de extrato de folhas verdes, separando pigmentos de cloroplastos e dando origem ao nome cromatografia (*chrom* = cor e *grafie* = escrita) [44].

Após técnica cromatográfica ser descoberta, não houve interesse em aprimorá-la até a década de 30, quando Kuhn e Lederer aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, utilizando um experimento semelhante ao de Tswett, com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel para separar e identificando as xantofilas da gema de ovo. Como consequência, a cromatografia foi aperfeiçoada em conjunto com os avanços tecnológicos elevando seu grau de sofisticação que resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas [45].

A cromatografia é uma técnica de grande relevância devido à capacidade de separação, de componentes químicos de uma mistura, e também de identificação e quantificação, utilizando padrões analíticos para comparação, e por isso é considerada padrão na separação de misturas [44].

Na HPLC, a separação de compostos ocorre por meio da distribuição dos componentes em duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase estacionária é responsável por reter os componentes que tem mais afinidade com a coluna, enquanto a fase móvel, ao passar pela fase estacionária carrega os componentes com os quais tem afinidade [45]. A fase estacionária pode ser normal (polar) ou reversa (baixa polaridade), sendo a de fase reversa a mais aplicada por permitir análise desde substâncias hidrossolúveis até lipofílicas.

A fase móvel é bombeada com vazão determinada através da coluna. A amostra é introduzida por uma válvula de injeção, e é arrastada pela fase móvel pela coluna. As substâncias com maior afinidade com a fase móvel, são eluídas primeiro na coluna, ficando retidos os compostos que interagem mais com a fase estacionária. Após a passagem pela coluna, a fase móvel, juntamente com as substâncias carregadas por ela, passam pelo detector que gera um sinal proporcional à concentração do soluto, e que ao ser enviado para um sistema de aquisição de dados produz um cromatograma [45]. A Fig. 2-7, ilustra as partes de um cromatógrafo líquido.

A técnica de HPLC possui vantagens atribuídas principalmente a sua precisão, repetibilidade e reprodutibilidade. É uma técnica muito eficiente na separação de misturas complexas, de compostos tanto orgânicos como inorgânicos, e necessita de uma quantidade pequena de amostra, na ordem de mililitros. Por isso foi considerada neste trabalho como uma técnica padrão na separação, identificação e quantificação de misturas entre polifenóis. A utilização de uma fase móvel pode se tornar um fator complicador para alguns materiais, pois para total eficiência da técnica a amostra deve solubilizar o máximo possível possibilitando assim o menor erro na quantificação dos compostos presentes na amostra.

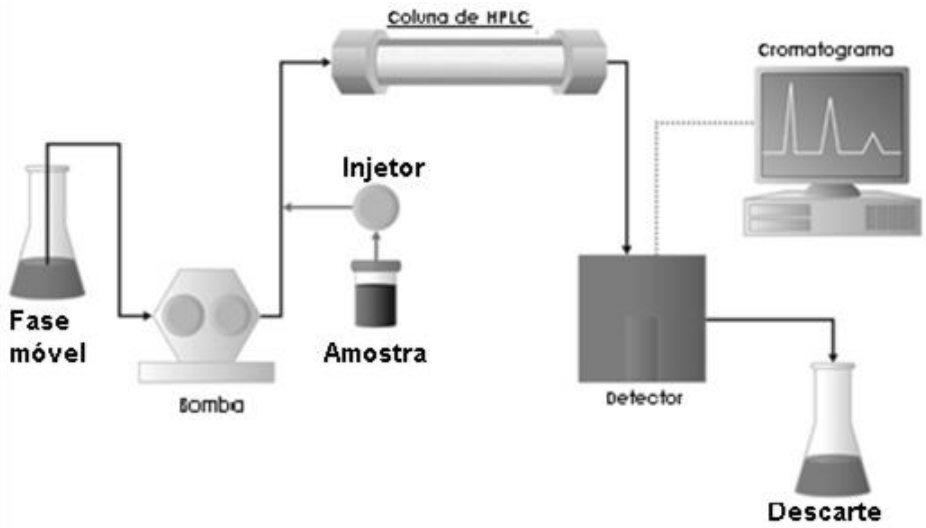

Figura 2-7: Representação das principais partes de um cromatógrafo líquido. Adaptado de [46]**.**

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para os testes com as técnicas de FTIR, Raman e PAS e comparação com a técnica de HPLC foram utilizadas compostos fenólicos puros: ácido gálico (Sigma), quercetina (Sigma) e catequina (Sigma), todas com grau de pureza HPLC, e misturas binárias entre os mesmos, a tabela 3-1 mostra as proporções entre eles. Para as medidas de FTIR, além dessas misturas binárias, foram confeccionadas misturas ternárias e duas amostras de misturas binárias adicionais, mostradas na tabela 3-2, preparadas pelo técnico do laboratório, da mesma maneira que as demais, para evitar cálculos tendenciosos das concentrações estimadas para adequação à curva de calibração, que será explicado no capítulo 4.1.5.

Tabela 3-1: Concentrações (% em massa) das amostras utilizadas

Amostras puras					
100% Ácido Gálico		100% Quercetina		100% Catequina	
Amostras de misturas binárias					
Ácido gálico + quercetina		Quercetina + Catequina		Catequina + Ácido gálico	
Ácido gálico (%)	Quercetina (%)	Quercetina (%)	Catequina (%)	Catequina (%)	Ácido gálico (%)
90	10	90	10	90	10
70	30	70	30	70	30
50	50	50	50	50	50
30	70	30	70	30	70
10	90	10	90	10	90

Tabela 3-2: Concentrações (% em massa) das amostras testes.

Nome da Amostra	Ácido Gálico *(1704 cm^{-1})	Catequina *(1145 cm^{-1})	Quercetina *(1671 cm^{-1})
Amostra 1	40%	20%	40%
Amostra 2	42%	38%	20%
Amostra 3	70%	30%	-
Amostra 4	65%	-	35%
Amostra 5	-	60%	40%

* 1704, 1145 e 1671 cm^{-1} são os centros das bandas nos espectros de FTIR que caracterizam cada um dos compostos analisados.

3.1 Técnicas utilizadas para identificação e quantificação de compostos fenólicos

3.1.1 FTIR

As medidas de FTIR foram realizadas em um espectrômetro (Bruker, Vertex 70v, Alemanha) do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM. Os espectros de cada amostra, pura e mistura binária, foram adquiridos por meio do programa OPUS® 6.5, sendo cada espectro o resultado de uma média de 128 varreduras com resolução espectral de 4 cm^{-1}, obtidos no intervalo entre 4000 a 400 cm^{-1}. Os espectros são obtidos em transmitâncias e convertidos para absorbância pela lei de Beer-Lambert, considerando que as espessuras das amostras fossem todas iguais. Todos os espectros foram normalizados pelo espectro de brometo de potássio (KBr) puro, material utilizado para diluição das amostras por não apresentar

contribuição nos espectros de infravermelho no intervalo de medida utilizado, e submetidos à correção de linha de base.

As amostras foram pastilhadas para medidas no modo de transmitância, as quais foram padronizadas em massa, sendo a quantidade de amostra de 2 mg, em 198 mg KBr. Após aferidas as massas é feita uma homogeneização manual do KBr com a amostra em um almofariz de ágata, e então a mistura de KBr + amostra é condicionada em um pastilhador (Perkin-Elmer) e prensada em prensa hidráulica sob a pressão de ~9 ton por 3min, obtendo-se assim uma pastilha uniforme. Para a curva de calibração foram preparadas pastilhas com 1% (porcentagem em relação a quantidade de massa total da pastilha) de polifenol puro para o ponto em 100% da curva, e para os demais pontos diluiu-se o polifenol em KBr mantendo a pastilha com 200 mg, mas com concentrações de 50; 25; 12,5; 6,12 e 3%.

3.1.2 HPLC

Para identificação e quantificação dos compostos fenólicos por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado um sistema de HPLC (Waters 2695 Alliance, USA) da COMCAP, equipado com detector óptico de arranjo de diodos (DAD, Waters 2998), sendo a aquisição e processamento dos realizados com o programa Empower® 3, (Milford, MA, USA).

O sistema de detecção foi de UV-Vis monitorando de 210 a 800 nm, os cromatogramas para o ácido gálico e a catequina foram no comprimento de excitação em 275nm e para a quercetina em 365 nm. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, o fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min e a temperatura do forno de 30 °C. A fase móvel utilizada foi: Canal A: ácido acético 0,1% em água 18,2 MΩ/cm; e Canal B: ácido acético 0,1% em acetonitrila. O gradiente em relação ao Canal B utilizado foi: 5% (0,5 min), 5-70% (9,50 min), 70-5% (1 min), mantendo-se esta condição por 3 min.

A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em uma coluna C18 de fase reversa, com tamanho de partícula de 5 µm, e dimensões de 250 x 4,6 mm (Phenomenex Gemini). Todos os procedimentos de cromatografia foram realizados com a colaboração do aluno de doutorado, Gean Pier Panizzon, do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Para as amostras da curva de calibração foram preparadas soluções com concentração de (10 mg/mL) de cada polifenol em dimetilsulfóxido, e essas soluções foram diluídas em água

ultrapura e acetonitrila (50:50, v/v), para se obter concentrações de cada substância na faixa de 100 a 1,50 µg/mL.

As soluções das misturas binárias entre os compostos foram preparadas em 2 grupos. No grupo 1 foram feitas soluções individuais de cada polifenol e depois estas foram misturadas formando as misturas binárias (tabela 3-1). No grupo 2 as amostras sólidas foram misturadas em almofariz de ágata, variando as concentrações de massa de acordo com a tabela 3-1, e posteriormente dissolvidas da mesma maneira que as amostras da curva de calibração e do grupo 1. Ao grupo 2, também foi adicionado uma mistura da tabela 3-2, Amostra 1: 40% de ácido gálico + 20% catequina + 40% quercetina.

3.2 Técnicas utilizadas para caracterização dos compostos fenólicos

3.2.1 Espectroscopia Raman

Neste trabalho utilizamos a espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman). Os espectros Raman das amostras foram obtidos por meio de um espectrômetro FT-Raman (Bruker, Vertex 70v, Ram II, Alemanha), o sistema é constituído de um espectrômetro de FTIR acoplado a um módulo de detecção de espalhamento Raman. É utilizado um laser de Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm para excitação com potência nominal de 500 mW, o qual foi incidido na amostra via microscópio óptico (Olympus BX) utilizando uma lente com ganho de 40x. O espalhamento Raman da amostra é coletado por essa mesma lente e conduzido via fibra ótica até o detector de germânio mantido sob refrigeração de nitrogênio líquido, localizado no espectrômetro de FTIR. A aquisição dos dados é feita por um computador via programa OPUS® 6.5, no qual os interferogramas são convertidos em espectros Raman por transformada de Fourier. Cada espectro obtido é uma média de 128 varreduras com resolução espectral de 4 cm^{-1}, medidos entre 4000 a 400 cm^{-1}.

As amostras de polifenóis puros e das misturas binárias entre eles estão mostradas na tabela 3-1. Após serem maceradas as amostras foram prensadas em uma prensa hidráulica sob pressão de 9 ton, com o objetivo de se obter pastilhas com superfície homogênea minimizando os efeitos de espalhamento devido as partículas, principalmente nas amostras de quercetina.

3.2.2 PAS

Os espectros fotoacústicos foram adquiridos por meio de um aparato montado pelo Grupo de Estudos de Fenômenos Fototérmicos (GEFF) (Fig. 3-1). O aparato é equipado de uma fonte de luz de arco de Xenônio (Oriel, 68820), regulada para 800 W. A luz emitida pela lâmpada passa por um monocromador (1/8 m), (Oriel, 77250) com grade de difração para a região entre 200 a 800 nm e fendas de entrada e saída ajustadas em 3,16 mm. Um modulador mecânico (Stanford Research Systems, SR 540) controla a frequência de modulação da luz, ajustado em 25 Hz fornecendo um sinal de referência para o amplificador (*lock-in*). A luz monocromática é então focalizada, com o auxílio de duas lentes, excitando a amostra com o máximo de intensidade possível. A luz atinge o interior da célula fotoacústica após ser transmitida através de uma janela de quartzo, que é um material transparente na região espectral de emissão da lâmpada. O microfone (Brüel & Kjaer, BK 2669) conectado a uma fonte de alimentação é acoplado à célula fotoacústica e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é transferido para amplificador sincronizado (EG & G Instruments, 5110), que forneceu a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que são transferidos para um microcomputador.

O sinal é normalizado pelo sinal de referência obtido de uma amostra de pó de carvão ultrapuro, pois a lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos de onda.

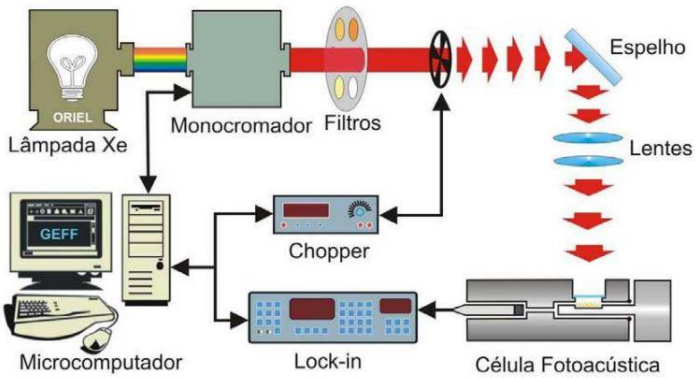

Figura 3-1: Aparato experimental da espectroscopia fotoacústica utilizado neste trabalho [47]

As amostras foram preparadas nas mesmas concentrações que nas demais espectroscopias (tabela 3-1). Os compostos foram pesados, misturados e homogeneizados utilizando um almofariz de ágata. As amostras são depositadas na célula fotoacústica (Fig. 3-1) de forma a preenche-la, assim ocupando o mesmo volume na célula.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FTIR

4.1.1 Caracterização dos espectros

A caracterização dos picos mais relevantes do espectro de FTIR do ácido gálico (tabela 4-1), foi realizada a partir de comparações com a literatura, após uma correção de linha base, na qual podemos identificar os picos de absorção na região 3365 cm^{-1} no espectro (Fig. 4-1) e o pico em aproximadamente 3284 cm^{-1} que são regiões referenciadas como vibrações de modo estiramento de OH. Em 1703 cm^{-1} observa-se a banda de estiramento de C=O, enquanto os picos encontrados em 1541, 1469 e 1440 cm^{-1} são associados ao estiramento da ligação dupla entre carbonos, C=C do anel aromático. O pico com centro em 1026 cm^{-1} é atribuído à deformação angular no plano, também conhecido como o modo de vibração de flexão, nas ligações de C-H nos anéis aromáticos. O pico em 867 cm^{-1} está associado à flexão angular nas ligações de C-H dos anéis aromáticos fora do plano [8, 26].

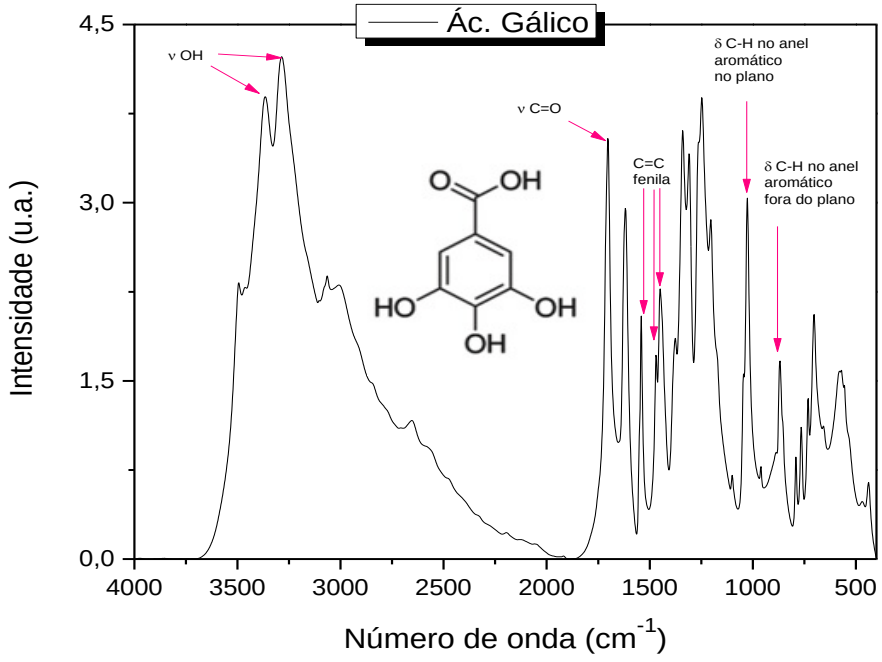

Figura 4-1: Espectro de FTIR entre 4000 à 400cm^{-1} do ácido gálico.

Legendas: ν: estiramento; δ: flexão.

Tabela 4-1: Caracterização dos picos mais relevantes de FTIR do ácido gálico.

Atribuições	Número de onda (cm^{-1})	
	Ácido Gálico neste trabalho	Ácido Gálico Ref. [8, 26]
Estiramento da ligação O-H, ligações de hidrogênio intramoleculares	~3365	3390
Estiramento da ligação O-H, de ácido carboxílico e ligações de hidrogênio entre hidroxilas fenólicas	3284	3290
Estiramento da ligação C=O de ácido carboxílico	1703	1715
Estiramento da ligação C=C de fenila	1541; 1469; 1440	1540; 1470; 1450
Flexão da ligação C-H do anel aromático no plano	1026	1025
Flexão da ligação de C-H do anel aromático para fora do plano.	867	870

As principais bandas caracterizadas no espectro de FTIR da catequina (Fig. 4-2), comparados com a literatura após uma correção de linha de base, foram os de estiramento das ligações de OH na região de 3300 cm^{-1}, estiramento das ligações de C-H em 2933 cm^{-1} e vibrações de estiramento do anel aromático (A e B), também conhecido como vibração de respiração (*Breathing*) por se tratar de distensões e contrações periódicas das ligações do anel que lembram o movimento de inspirar e expirar o ar para os pulmões, em 1629, 1611 e 1522 cm^{-1}. O pico em 1470 cm^{-1} foi atribuído a vibração de estiramento da ligação de C-OH no fenol (A), enquanto 1284 cm^{-1} foi referido ao estiramento do anel aromático A e ao estiramento de ligações COC e CC. Em 1145 cm^{-1}, atribuiu-se ao estiramento da ligação entre C-O. O estiramento do anel aromático B e de ligações de C-H foi associado ao pico 1018 cm^{-1} (tabela 4-2) [27, 48].

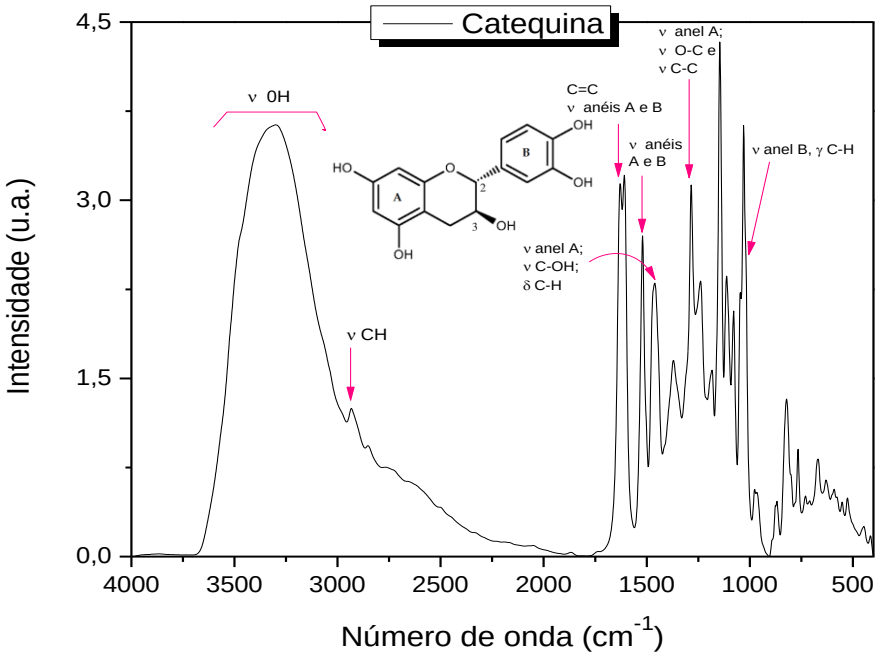

Figura 4-2: Espectro de FTIR entre 4000 à 400cm^{-1} da catequina.

Legendas: ν: estiramento; δ: flexão; ϒ: vibração fora do plano.

Tabela 4-2: Caracterização dos picos mais relevantes de FTIR da catequina.

Atribuições	Número de onda	
	Catequina neste trabalho	Catequina Ref. [27, 48]
Estiramento das ligações de O-H	~3300	3600 - 3200
Estiramento das ligações de C-H	2933	3000-2850
Estiramento do anel aromático (A e B)	1629; 1611; 1522	1626; 1611; 1522
Estiramento C-OH no fenol (A)	1470	1470
Estiramento do anel (A) e estiramento de C-O-C e C-C	1284	1287
Estiramento das ligações entre C-O	1145	1150-1070
Estiramento do anel aromático (B) e C-H	1018	1021

As bandas mais relevantes de FTIR da quercetina (Fig. 4-3) foram caracterizados após uma correção de linha de base no espectro. Atribui-se ao estiramento das ligações de OH (tabela

4-3), a banda com centro em ~3400 cm^{-1}. O pico 1660 cm^{-1} referente a vibração de C=O da banda de valência da arilcetona. Os picos 1612, 1560 e 1514 cm^{-1} estão associados à vibração de estiramento de C=C dos anéis aromáticos. O espectro também apresentou picos de flexão de C-OH, em 1361 cm^{-1} e de OH no fenol em 1377 cm^{-1}, além de flexão de CH no plano, em 1317 cm^{-1}. Em 1200 cm^{-1} e 1165 cm^{-1}, picos referentes a vibração de estiramento C-O no anel aromático e flexão de C-H fora do plano em 817 cm^{-1} [49, 50].

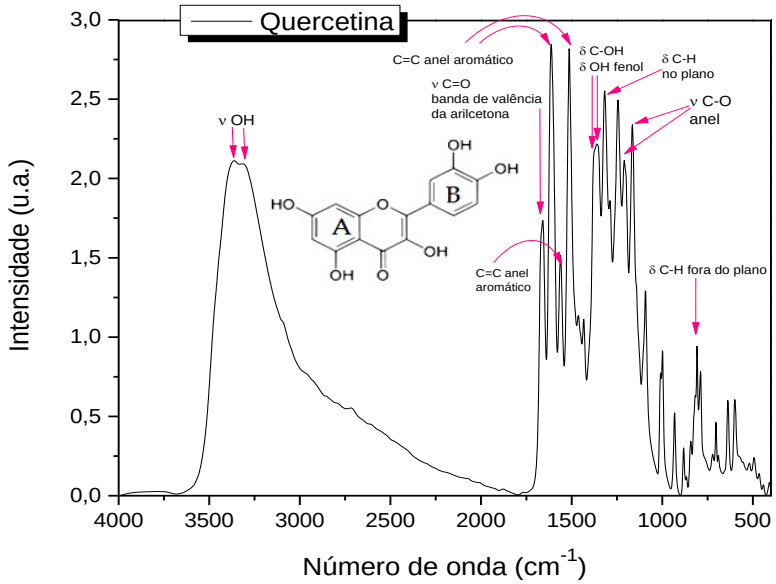

Figura 4-3: Espectro de FTIR entre 4000 à 400cm^{-1} de quercetina.

Legendas: ν: estiramento; δ: flexão.

Tabela 4-3: Caracterização dos picos mais relevantes de FTIR da quercetina.

Atribuições	Número de onda (cm^{-1})	
	Quercetina neste trabalho	Quercetina Ref. [49], [50]
Estiramento das ligações de OH	~3400	3406; 3263
Estiramento das ligações de C=O	1660	1666
Estiramento de C=C do anel aromático	1612; 1560; 1514	1610; 1560; 1510
Flexão das ligações de C-OH	1361	1368; 1355
Flexão das ligações de OH no fenol	1377	1379
Flexão C-H no plano	1317	1317
Estiramento de C-O no fenol	1200	1200
Estiramento e deformação de C-CO-C; Estiramento C-OH	1165	1165
Flexão de C-H fora do plano	817	820

4.1.2 Bandas de referência dos compostos fenólicos utilizados para análise

Ao comparar os três espectros dos compostos fenólicos, pode-se notar algumas diferenças, tais como, na banda mais larga presente entre 3700-2000 cm^{-1}. Entretanto, a região de maior interesse é a compreendida entre 1800-400 cm^{-1}, por se tratar de uma região conhecida como impressão digital da molécula (*fingerprint*). A Fig. 4-4 mostra em detalhes a, região de impressão digital. Alguns picos e bandas podem ser diferenciadas entre as três amostras, como por exemplo, a banda do ácido gálico em ~1703 cm^{-1}, não é encontrada na catequina ou na quercetina, enquanto as bandas em 1660, 1560 e 930 cm^{-1} presentes na quercetina, não são encontrada nas demais, e na catequina o mesmo acontece com as bandas 1145 e 1110 cm^{-1}.

Para as análises dos espectros obtidos por FTIR foram utilizados os picos presentes na banda de 1703 cm^{-1} para o ácido gálico, em 1660 cm^{-1} para a quercetina e em 1145 cm^{-1} para a catequina. Observando os espectros outros picos mais bem definidos poderiam ter sido escolhidos para esta análise, entretanto buscou-se manter sempre as mesmas bandas de referência característicos para cada uma das amostras independente das misturas entre elas.

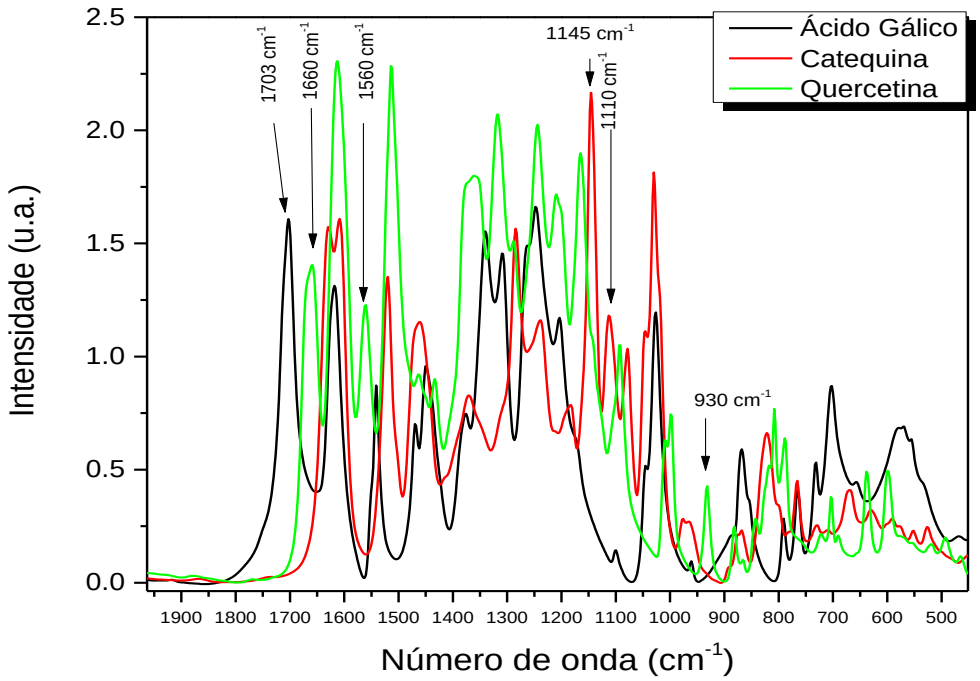

Figura 4-4: Espectro de FTIR (1900-400 cm^{-1}) de ácido gálico, catequina e quercetina.

4.1.3 Curva de calibração

4.1.3.1 *Ácido Gálico*

Para a curva de calibração do ácido gálico foram utilizadas as áreas da banda em 1703cm^{-1}, pois como citado anteriormente essa banda ocorre apenas para esse composto quando comparado os outros dois compostos. As áreas foram obtidas realizando um ajuste teórico de funções gaussianas nos espectros das amostras de ácido gálico diluídas em KBr, apresentada no exemplo da Fig. 4-5, no qual cada amostra possui a metade da concentração em massa da anterior, por exemplo, a amostra "Ácido Gálico-100%" contém a quantidade padrão (1% da massa da pastilha de 200 mg) utilizada para realizar as medidas de FTIR (2 mg de amostra diluídas em 198 mg de KBr), enquanto a amostra "Ácido Gálico-50%" apresenta a metade da massa padrão utilizada (1mg de amostra em 199 mg de KBr), e dessa mesma forma seguem-se as demais diluições. As áreas encontradas estão apresentadas na Fig. 4-6, juntamente com o ajuste polinomial usado para adquirir a curva de calibração para o ácido gálico.

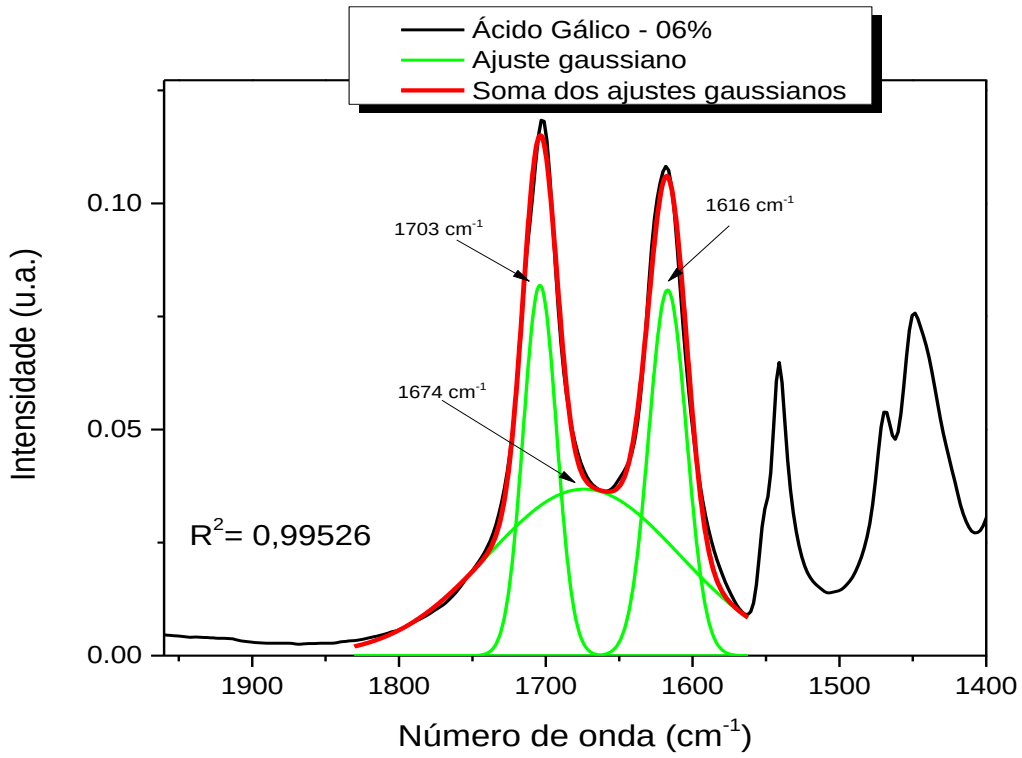

Figura 4-5: Exemplo de ajuste gaussiano para a banda 1703 cm^{-1} do ácido gálico, na região de 1960 à 1400 cm^{-1}.

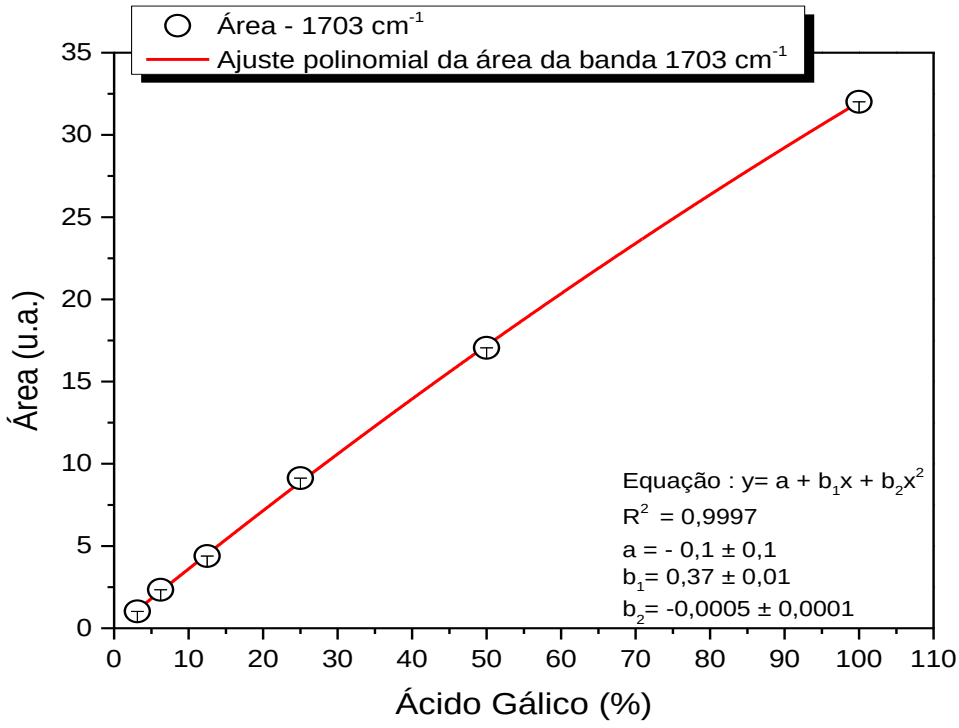

Figura 4-6: Curva de calibração do ácido gálico (1703 cm^{-1}), adquirida pela técnica de FTIR.

O ajuste polinomial foi realizado com uma equação de segunda ordem para obter a curva de calibração do ácido gálico. Na equação (Fig.4-6), *y* representa a área da banda 1703 cm^{-1} e *x* as concentrações em porcentagem de massa.

4.1.3.2 *Catequina*

A curva de calibração para a catequina, foi obtida de forma semelhante à curva do ácido gálico, porém não foi utilizado ajuste gaussiano. A amostra de catequina também foi diluída em KBr, sempre obtendo a metade da concentração da amostra anterior (100%, 50%, 25%, 12%, 06% e 03%). A banda utilizada para realizar a curva de calibração foi o 1145 cm^{-1}, e diferente da curva do ácido gálico (Fig.4-5) e da quercetina (Fig.4-8), para a catequina não foi utilizado os ajustes gaussianos, e sim uma integração direta sob o pico analisado (Fig.4-7). Geralmente, a utilização dos ajustes com funções gaussianas em espectroscopia são utilizados para análise de bandas que apresentam contribuições de mais de um centro sob a mesma área, o que para a banda 1145 cm^{-1} não foi observado.

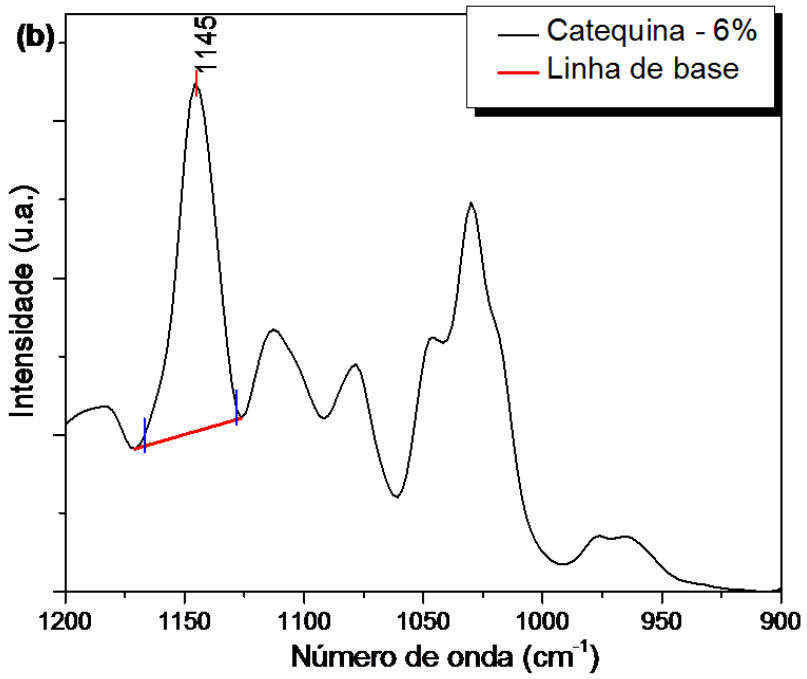

Figura 4-7: Exemplo de integração sob a banda 1145 cm^{-1} da catequina. A região acima da linha de base indica a área calculada.

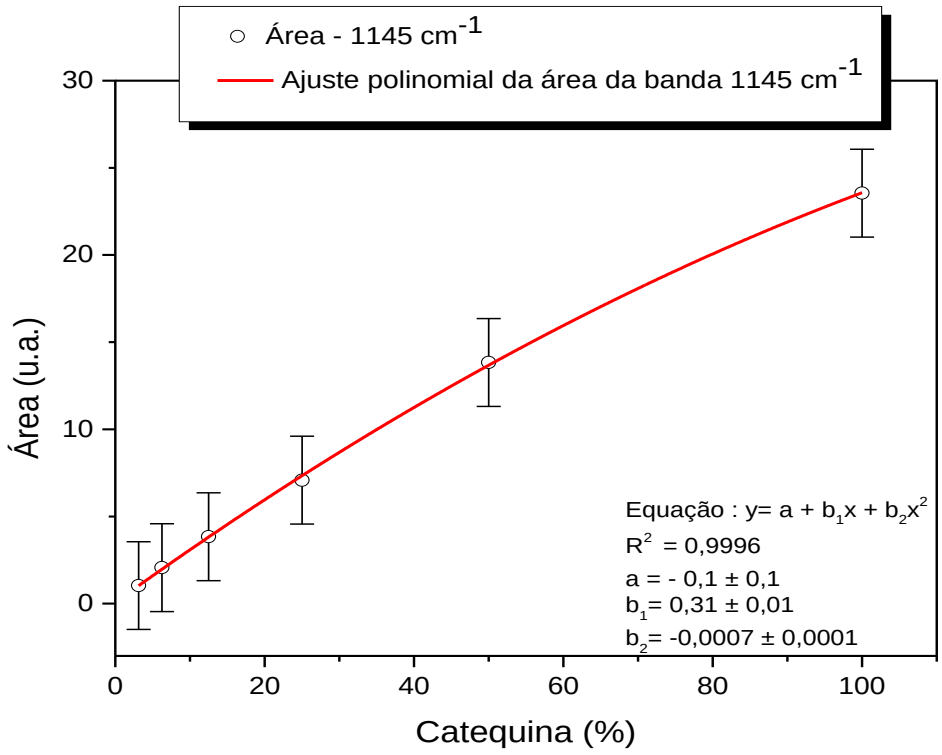

Figura 4-8: Curva de calibração da catequina (1145 cm^{-1}), adquirida pela técnica de FTIR.

Na Fig. 4-8 tem-se a curva de calibração para a catequina, obtida a partir de um ajuste feito por uma equação polinomial de segunda ordem. Na equação, *y* representa a área do pico 1145 cm^{-1} e *x* a concentração em porcentagem de massa da amostra de catequina.

4.1.3.3 *Quercetina*

Para se obter a curva de calibração da quercetina, realizaram-se as mesmas diluições que a catequina e o ácido gálico para as medidas de FTIR. A banda utilizada para a análise foi a encontrada na região próxima a 1660 cm^{-1}, entretanto esta banda apresenta contribuições espectrais com centros em 1671 e 1656 cm^{-1}, desta forma foi realizado um ajuste com funções gaussianas considerando estes dois centros, que estão apresentadas no exemplo da Fig. 4-9. A área sob a gaussiana centrada em 1671 cm^{-1} foi adotada como sendo a banda característica para quercetina neste estudo. As áreas para as concentrações de quercetina foram utilizadas para a construção da curva de calibração (Fig. 4-10).

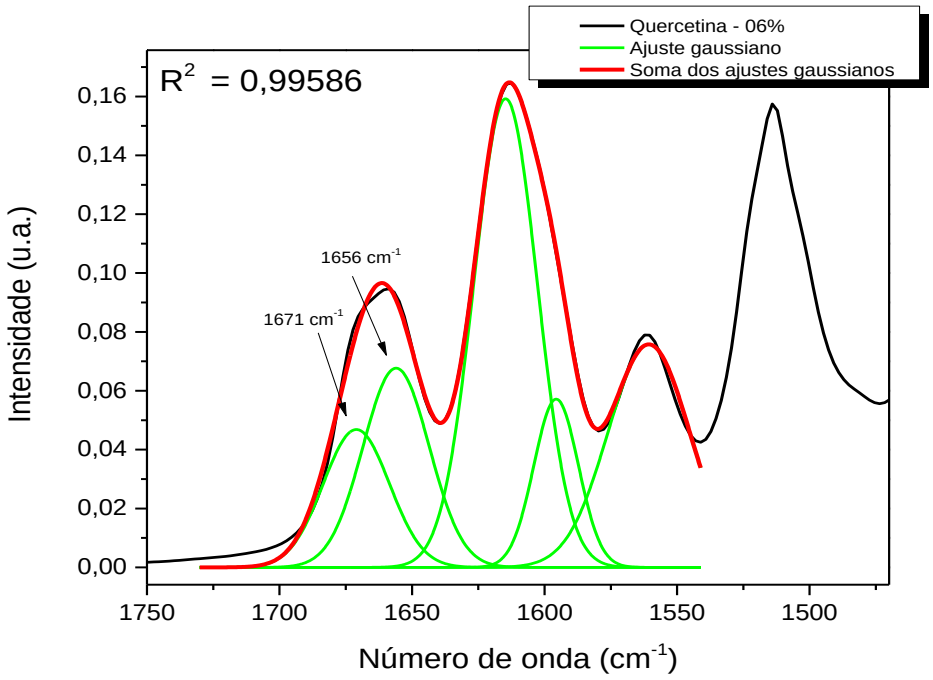

Figura 4-9: Exemplo de ajuste gaussiano para a banda 1671 cm^{-1} da quercetina, na região de 1750 à 1470 cm^{-1}.

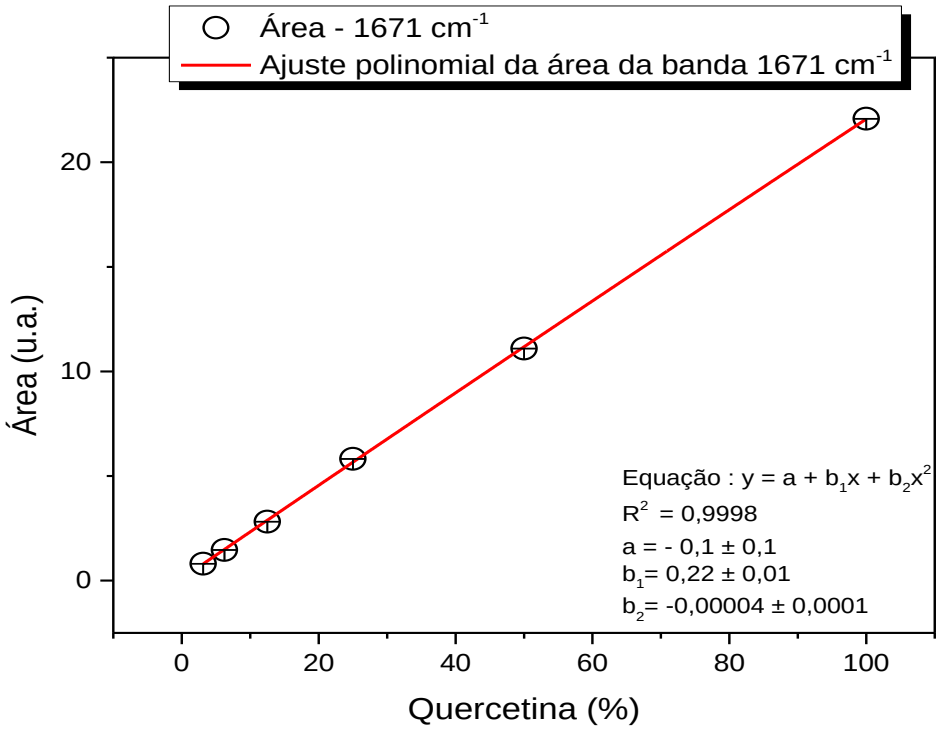

Figura 4-10: Curva de calibração para a quercetina (1671 cm^{-1}), adquirida pela técnica de FTIR.

Na Fig. 4-10, nota-se que a variação das áreas para a quercetina possui o comportamento mais próximo ao linear quando comparada as curvas de calibração do ácido gálico e da catequina. Manteve-se um padrão de ajuste, utilizando para todos uma função polinomial de segunda ordem ($y = a + b_1.x + b_2.x^2$) para descrever as curvas.

4.1.4 Mistura física dos compostos

Para avaliar o potencial da técnica de FTIR na quantificação e diferenciação de compostos fenólicos, foram realizadas misturas físicas entre o ácido gálico, catequina e quercetina em pó em diferentes proporções. Primeiramente misturas entre dois compostos e posteriormente com os três compostos. Sabe-se que os extratos naturais apresentam mais de um composto fenólico em sua composição, como é demonstrado em estudos sobre uvas Moscatel cultivadas em regiões montanhosas da China, onde foi evidenciado que o extrato obtido a partir das cascas das uvas, continha diversos compostos, incluindo o ácido gálico, quercetina e catequina, além de outros ácidos fenólicos, flavonóis, estilbenos e antocianinas [51], por isso é de grande interesse a diferenciação e separação desses compostos.

As curvas de calibração mostradas na seção anterior, foram testadas com as misturas de ácido gálico com catequina, ácido gálico com quercetina, e com a mistura de catequina com a quercetina, criando-se três grupos de amostras para os testes, sendo a proporção de massa entre elas foram variadas a cada mistura. O controle da quantidade em cada amostra auxilia na validação do método desenvolvido, mostrando o quanto efetivo pode ser a curva encontrada.

4.1.4.1 *Ácido gálico e Catequina*

A Fig. 4-11 apresenta os espectros de FTIR da mistura entre ácido gálico e catequina, em proporção de massa. Nota-se que não há interação química entre os compostos utilizados, assim podemos considerar misturas físicas[6]. Para as demais misturas também não foi verificada interação.

As bandas utilizadas para a análise são os representados na Fig. 4-12, na qual pode-se observar em detalhes o comportamento das bandas escolhidas em função da variação de concentração entre o ácido gálico e a catequina. Existem alguns outros picos que variam sua intensidade de uma amostra para outra de maneira mais expressiva do que as bandas escolhidas, mas pretende-se utilizar sempre as mesmas bandas independe da mistura. Por exemplo, o pico em 1076 cm^{-1} presente na catequina e ausente no ácido gálico não poderia ser utilizado, pois o mesmo é encontrado na quercetina, seria necessário utilizar mais de uma curva de calibração para o mesmo composto, e isso tornaria o estudo menos objetivo.

[6] Considera-se misturas físicas quando não há deslocamentos, aparecimentos e/ou desaparecimentos de bandas, pois isso indicaria interações químicas entre os compostos. No caso de misturas físicas espera-se apenas um espectro misto, como foi observado na figura (Fig. 4-11).

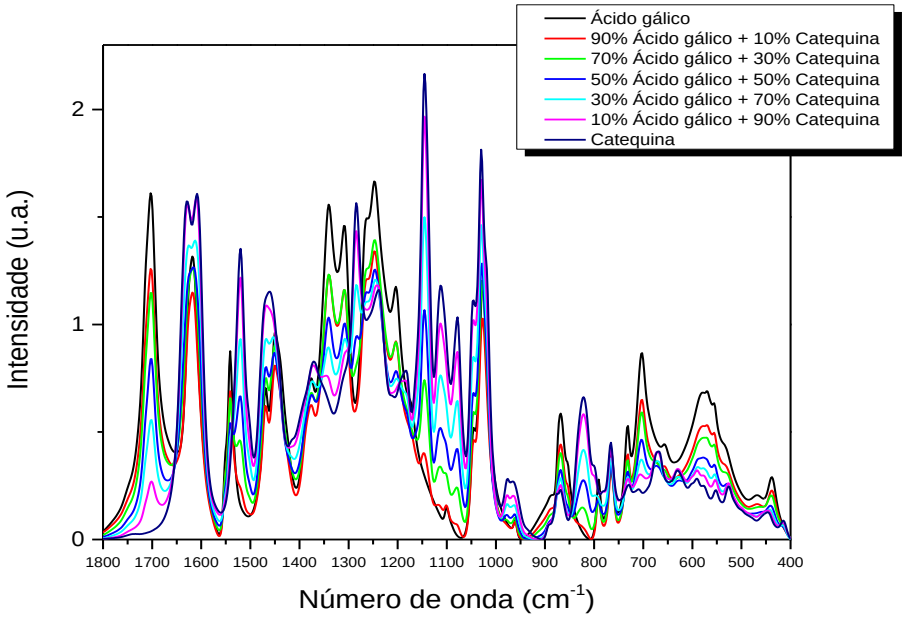

Figura 4-11:Espectros na região de 1800 a 400 cm^{-1} de misturas físicas entre ácido gálico e catequina.

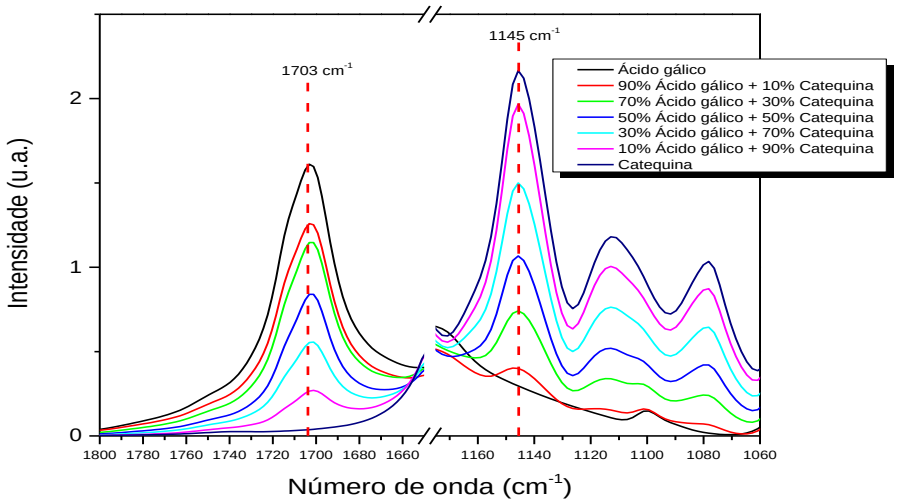

Figura 4-12:Bandas analisadas na mistura entre ácido gálico (1703 cm^{-1}) e catequina (1145 cm^{-1}).

4.1.4.2 *Ácido Gálico e Quercetina*

A mistura entre ácido gálico e quercetina seguiu o mesmo método de preparação que as demais misturas, ou seja, diminuindo a porcentagem de massa de uma enquanto aumenta a porcentagem de massa da outra, resultando em 100%. A Fig. 4-13 contém os espectros de FTIR

dessas combinações de massa, neles é possível diferenciar os picos do ácido gálico dos picos da quercetina.

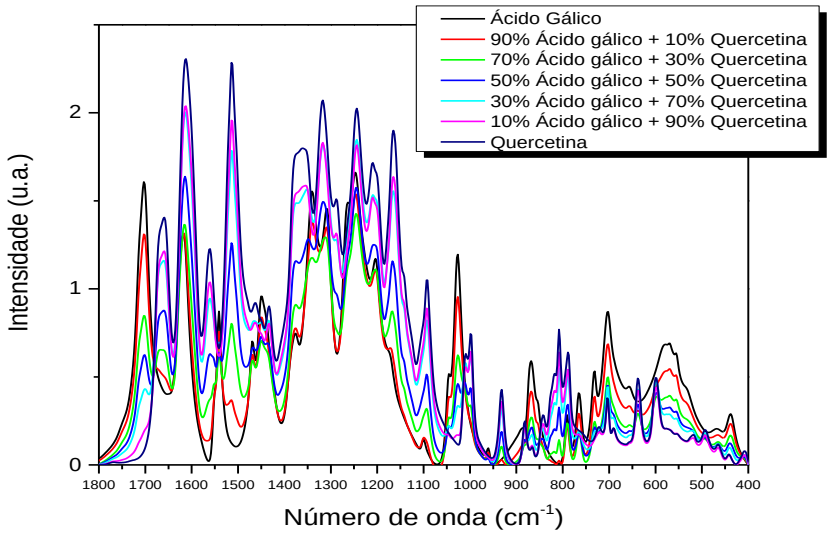

Figura 4-13: Espectros na região de 1800 a 400 cm^{-1} da mistura de ácido gálico com quercetina.

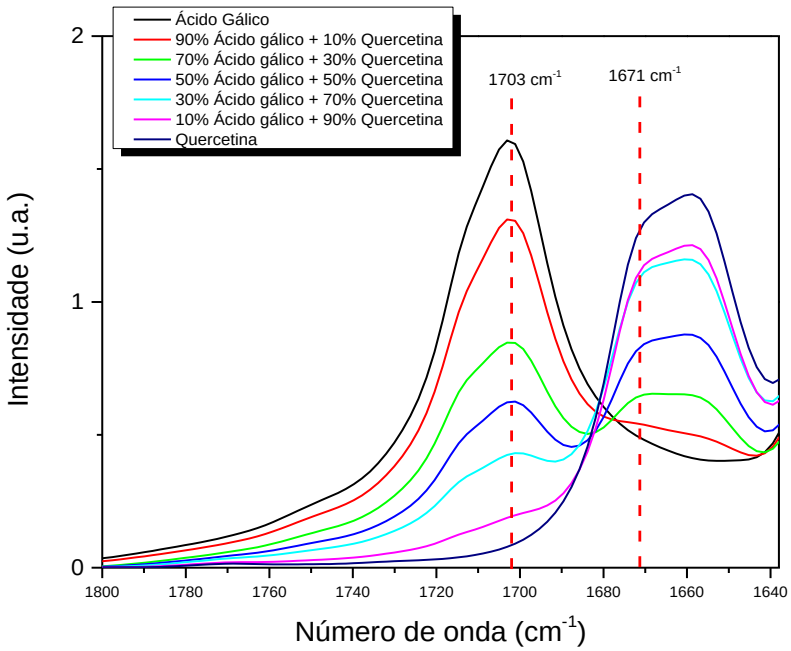

Figura 4-14: Picos analisados na mistura entre ácido gálico (1703 cm^{-1}) e quercetina (1671 cm^{-1}).

A Fig. 4-14 mostra em detalhes a variação dos espectros da mistura conforme a variação da proporção entre os compostos. A banda de referência do ácido gálico é caracterizada como a vibração de estiramento de C=O, assim como a banda 1660 cm-1 da quercetina, a diferença é que a dupla ligação do oxigênio com o carbono ocorre em um radical do ácido gálico, enquanto na quercetina o oxigênio está ligado a uma cadeia cíclica, por isso existe essa diferença de energia ainda que representem a vibração da mesma ligação química.

4.1.4.3 *Catequina e Quercetina*

Nos espectros da mistura entre catequina e quercetina, mostrada na Fig. 4-15, além da variação da intensidade as bandas de referência, pode-se notar que a amostra que contém 90% de quercetina, em alguns casos, possuí bandas mais intensas que a quercetina 100%, isso ocorre por se tratar de um espectro não normalizado. Optou-se por não normalizar os espectros, pois seria necessário normalizar também a curva de calibração, ou seja, não poderiam ser escolhidas bandas de referência diferentes para as diferentes misturas ou bandas de grupamentos químicos iguais as bandas específicas, o que nos espectros apresentados não foi possível.

As bandas da catequina e da quercetina que foram usados para testar as curvas de calibração estão apresentados em detalhes na Fig. 4-16. A banda da catequina, 1145cm^{-1}, mostra-se mais complexo de se calcular a área do que quando misturado em ácido gálico, pois a quercetina apresenta uma banda adjacente que interfere na banda da quercetina ao variar-se as proporções entre os dois compostos. Para minimizar este efeito foi realizada uma linha de base na banda da catequina para a obtenção da área sob as bandas.

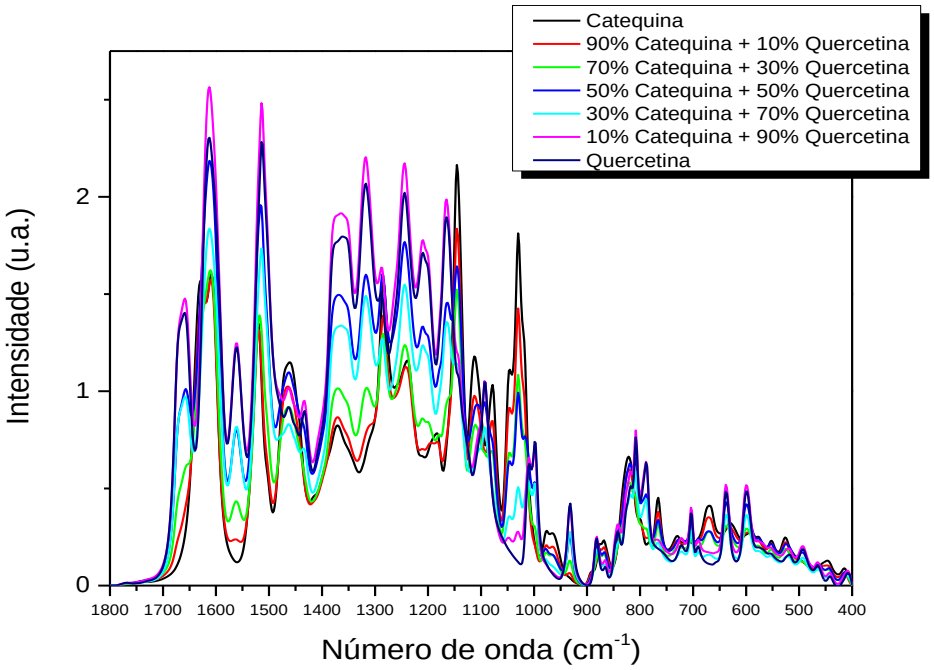

Figura 4-15: Espectros na região de 1800 a 400 cm^{-1} da mistura entre catequina e quercetina

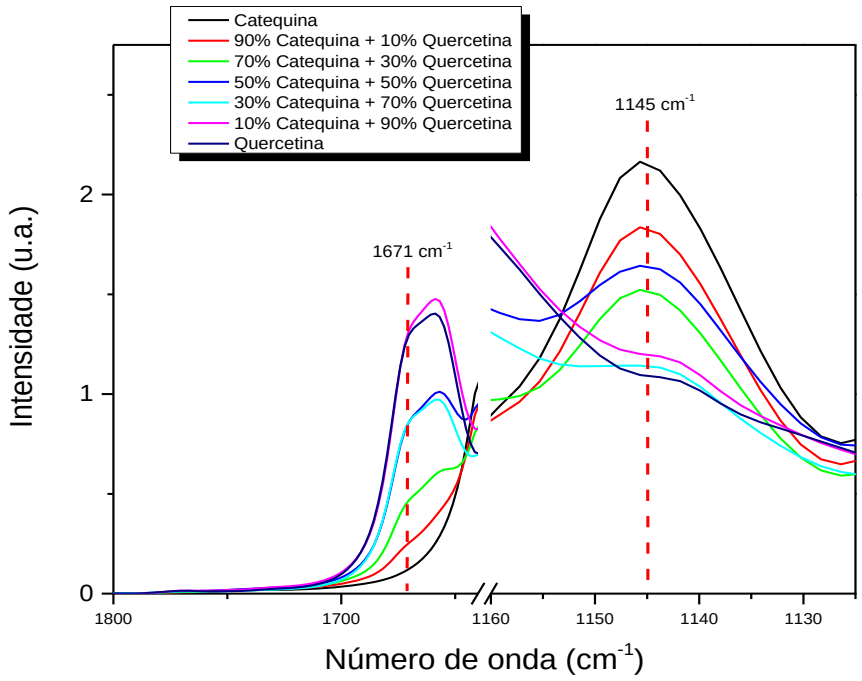

Figura 4-16: Bandas de referência na mistura entre catequina (1145 cm^{-1}) e quercetina (1671 cm^{-1}).

4.1.5 Teste das curvas de calibrações

Após obter as áreas das bandas de referência para cada mistura física, utilizou-se das equações de cada curva de calibração para encontrar a proporção de massa experimental das mesmas. As tabelas 4-4, 4-5 e 4-6 mostram os resultados utilizando as curvas de calibração para o ácido gálico, catequina e quercetina, respectivamente. Nelas estão apresentadas a concentração em massa de cada composto nas misturas (concentração nominal), o valor da área da banda de referência que foi usado na curva de calibração e o resultado obtido por meio da curva da calibração (concentração estimada). Além das misturas conhecidas, foi solicitado ao técnico, responsável pelo laboratório de FTIR, que fizesse medidas de misturas entre os três componentes e que o mesmo escolhesse a concentração entre eles, e somente após o cálculo e obtenção das áreas dessas amostras foi pedido à ele os valores das concentrações nominais utilizadas. As amostras com a mistura foram chamadas de amostras testes e as concentrações usadas podem ser conferidas na tabela 3-2.

A curva de calibração do ácido gálico (tabela 4-4), mostrou-se relevante por possuir desvios, na maioria das amostras, abaixo de 5%, com exceção das amostras com 10% de ácido gálico que apresentou um desvio maior que os demais, este pode indicar o limite de detecção do ácido na gálico em uma mistura com outros compostos fenólicos na técnica de FTIR.

Tabela 4-4: Teste da curva de calibração do ácido gálico.

Concentração nominal (%)	Área (1704 cm^{-1})	Concentração estimada (%)	Desvio (%)
Ácido Gálico - 100%	33,1	104	4
90% Ac.G. + 10% Quer.	30,6	95	6
70% Ac.G. + 30% Quer.	24,0	72	3
50% Ac.G. + 50% Quer.	17,5	51	2
30% Ac.G. + 70% Quer.	10,8	31	2
10% Ac.G. + 90% Quer.	5,3	15	50
90% Ac.G. + 10% Cat.	28,8	88	2
70% Ac.G. + 30% Cat.	22,9	68	3
50% Ac.G. + 50% Cat.	17,2	50	0
30% Ac.G. + 70% Cat.	10,9	31	3
10% Ac.G. + 90% Cat.	4,2	12	20
Amostra 1 (40% Ac.G.)	13,1	37	7
Amostra 2 (42% Ac.G.)	16,1	46	10
Amostra 3 (70% Ac.G.)	22,8	68	3
Amostra 4 (65% Ac.G.)	21,4	63	3

Legenda: Ac.G. = ácido gálico; Quer. = quercetina; Cat. = catequina

A tabela 4-5 contém o teste para as misturas com a catequina utilizando a curva de calibração da catequina. Dentre as três misturas físicas entre os compostos fenólicos, as misturas com a catequina foram as que apresentaram maior desvio percentual com relação concentração nominal. Nota-se que na concentração 100% de catequina é encontrada o maior desvio percentual quando comparada as misturas os outros dois compostos. Neste caso não há contribuição de nenhum outro composto, sugerindo que a própria amostra de catequina apresente variabilidade espectral.

Considerando que a metodologia experimental seja a mesma, independente da amostra, na técnica de FTIR, fenômenos não relacionados diretamente com a absorção da catequina nos comprimentos de onda incidentes, tais como, espalhamento e aglomerados de partículas, podem estar influenciando na variabilidade dos espectros, e assim contribuindo em um maior desvio percentual. Outro ponto que enfatiza que os possíveis fenômenos não são decorrentes da absorção, é que a curva de calibração da catequina resulta na curva menos linear entre as três curvas de calibração abordadas neste trabalho, considerando que nenhuma interação química esteja ocorrendo entre os compostos.

Tabela 4-5: Teste da curva de calibração da catequina

Concentração nominal (%)	Área (1145 cm^{-1})	Concentração estimada (%)	Desvio (%)
Catequina - 100%	26,9	123	23
10% Ac.G. + 90% Cat.	23,7	101	12
30% Ac.G. + 70% Cat.	17,5	67	4
50% Ac.G. + 50% Cat.	11,3	40	20
70% Ac.G. + 30% Cat.	5,9	20	33
90% Ac.G. + 10% Cat.	1,5	5	50
90% Cat. + 10% Quer.	21,8	89	1
70% Cat. + 30% Quer.	16,9	64	8
50% Cat. + 50% Quer.	14,9	55	10
30% Cat. + 70% Quer.	7,1	24	20
10% Cat. + 90% Quer.	3,7	12	20
Amostra 1 (20% Cat.)	4,5	15	25
Amostra 2 (38% Cat.)	11,5	41	8
Amostra 3 (30% Cat.)	9,2	32	7
Amostra 5 (60% Cat.)	16,9	64	7

Legenda: Ac.G. = ácido gálico; Quer. = quercetina; Cat. = catequina

Ainda deve-se levar em conta as dificuldades para a obtenção das áreas sob as bandas selecionadas para análise, uma vez que a banda referente a catequina, com centro em 1145 cm^{-1}, tem uma contribuição que não foi possível remover com a linha de base aplicada em todo o espectro. Tal contribuição foi minimizada aplicando uma segunda linha de base somente na banda da catequina, e posteriormente realizada integração para o cálculo da área.

A tabela 4-6, teste da curva de calibração da quercetina, é menos expressiva que a curva do ácido gálico (tabela 4-4), mas os desvios percentuais foram inferiores aos da catequina. Nota-se que o limite de detecção utilizando a técnica de FTIR para a quantificação da quercetina em mistura com outros compostos fenólicos está em torno de 30%.

Nas misturas de quercetina com a catequina observa-se maiores desvios percentuais, o que pode estar mostrando a contribuição dos fenômenos que não estão diretamente relacionados à absorção da catequina, citados anteriormente, quanto maior a proporção de catequina na mistura com a quercetina, maior é o desvio com relação a curva de calibração da quercetina.

Tabela 4-6: Teste da curva de calibração da quercetina

Concentração nominal (%)	Área (1671 cm^{-1})	Concentração estimada (%)	Desvio (%)
Quercetina - 100%	22,0	100	0
10% Ac.G. + 90% Quer.	20,0	91	1
30% Ac.G. + 70% Quer.	15,3	69	1
50% Ac.G. + 50% Quer.	11,4	51	2
70% Ac.G. + 30% Quer.	7,5	33	10
90% Ac.G. + 10% Quer.	2,7	12	20
10% Cat. + 90% Quer.	20,4	92	2
30% Cat. + 70% Quer.	16,3	74	6
50% Cat. + 50% Quer.	12,4	55	10
70% Cat. + 30% Quer.	9,1	40	33
90% Cat. + 10% Quer.	5,9	26	160
Amostra 1 (40% Quer.)	9,0	40	0
Amostra 2 (20% Quer.)	4,2	19	5
Amostra 4 (35% Quer.)	7,2	32	9
Amostra 5 (40% Quer.)	8,4	37	7

Legenda: Ac.G. = ácido gálico; Quer. = quercetina; Cat. = catequina

Com os dados apresentados a técnica de FTIR pode ser utilizada na diferenciação e quantificação de compostos fenólicos sólidos em misturas físicas. Um fato relevante é que para

esta técnica não é necessário a utilização de solventes para os compostos empregados neste estudo, e ainda a diluição deste materiais pode ser realizada em brometo de potássio, que para a região do infravermelho médio (4000 - 400cm^{-1}) não apresenta contribuição espectral.

4.2 Espectroscopia Raman

No viés do emprego de técnicas vibracionais para a caracterização e quantificação de compostos fenólicos da mesma maneira que foi realizada para a técnica de FTIR, foi utilizada a técnica de espectroscopia Raman. Os espectros Raman obtidos para as amostras de ácido gálico, catequina e quercetina foram corrigidos por linha de base e normalizados pela intensidade máxima, como mostra a Fig. 4-17. Nestes espectros das amostras observa-se uma das grandes dificuldades de se trabalhar com a quercetina utilizando a técnica Raman, que é o efeito de espalhamento elástico na amostra, ou seja, o espalhamento da radiação incidente, evidenciado na banda larga e intensa que quase sobrepõe inteiramente os outros dois espectros. Para diferenciar este efeito do fenômeno de luminescência foram feitos teste com comprimentos de onda de excitação diferentes (532, 633, 785 e 1064 nm).

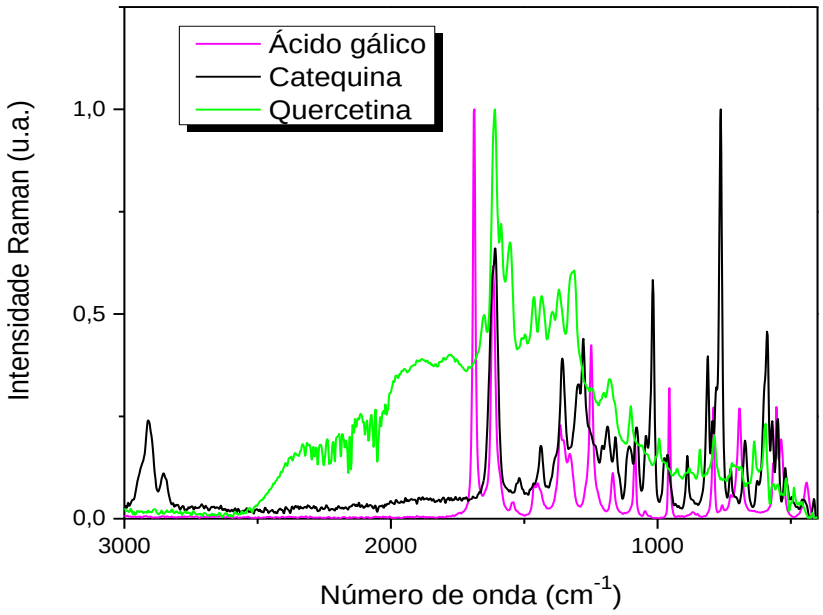

Figura 4-17: Espectro Raman na região de 3000 à 400 cm^{-1} de ácido gálico, catequina e quercetina, excitados em 1064 nm.

A luminescência foi minimizada utilizando a excitação em 1064 nm, entretanto neste comprimento de onda ainda o espectro da quercetina apresentava a banda larga e intensa, tal

como na Fig. 4-17. Para minimizar este outro efeito foi necessário fazer pastilhas das amostras de quercetina, pura e nas misturas com os outros dois compostos, antes de realizar as medidas. Nas medidas em amostras sólidas na técnica de espalhamento Raman a condição de uniformidade da superfície é um fator de grande influência.

Não foi possível construir curvas de calibração individuais para cada composto, assim como foi realizado na técnica de FTIR, pois para isso seria necessário que o material utilizado na diluição não fosse Raman ativo ou que não tivesse picos na região de interesse além de principalmente, não sofrer interação com a amostra analisada. Também foram efetuadas as mesmas análises com a mistura dois a dois dos compostos fenólicos, obtidas as áreas de picos de referência, 1688 cm^{-1} para o ácido gálico, 763 cm^{-1} para a catequina e 1653cm^{-1} para a quercetina e as áreas em função das variações de proporções nas misturas mostrou-se também com comportamento não linear, podendo ser diferenciadas, entretanto sem a curva de calibração para cada composto separadamente não foi possível utilizar a técnica Raman na quantificação de compostos fenólicos misturados entre si, diferentemente da técnica vibracional FTIR.

Dadas as complicações encontradas, a espectroscopia Raman, pode ser empregada somente para caracterização das amostras estudadas neste trabalho atuando como uma técnica complementar a de FTIR. Em soluções com estes compostos fenólicos, acredita-se que a espectroscopia Raman seria de grande valia na quantificação dos mesmos, pois no caso de soluções aquosas a técnica de FTIR é prejudicada devido a sua alta sensibilidade na detecção da água.

Os principais picos da catequina foram caracterizados após uma correção de linha de base no espectro. Atribui-se ao estiramento dos anéis benzênicos (A e B), o pico com centro em 1609 cm^{-1}. O pico 1438 cm^{-1} refere-se ao estiramento do anel aromático A e estiramento da ligação C-OH. O estiramento do anel aromático B e das ligações C-C, além do flexão das ligações de OH, foram atribuídos ao pico 1357 cm^{-1}. O pico 1158 cm^{-1} está associado à vibração de estiramento do anel aromático A, e flexão no plano das ligações C-C-C. O espectro também apresentou picos de flexão de C-C-C e estiramento de O-C atribuído ao pico 1081 cm^{-1}. Em 1017 cm^{-1}, pico referente à vibração de estiramento do anel aromático B e flexão de C-H fora do plano. O pico 971 cm^{-1} refere-se ao estiramento dos anéis aromáticos A e B, enquanto em 767 cm^{-1} está referenciado à flexão fora do plano do anel aromático A, e a flexão de C-O-C e C-C-C.

O espectro Raman da quercetina foi caracterizado após uma correção por linha de base e apresentou picos de estiramento das ligações C=O em 1662 cm^{-1} e C=C em 1611 cm^{-1}. Em

1465 cm^{-1} o pico foi atribuído ao estiramento C-OH. A flexão no plano da ligação de C-OH está referenciada aos picos 1370 e 1322 cm^{-1}. O estiramento de ligações C-C refere-se ao pico 1312 cm^{-1}. A flexão no plano do esqueleto aromático (C-C-C e C-C-O) e o estiramento de O-C foram atribuídos ao pico 1179 cm^{-1}. Em 720 cm^{-1} apresentou flexão da ligação CH para fora do pano e em 637 cm^{-1} flexões do esqueleto aromático para fora do plano de ligações de C-C, C=O e C-O [52].

Os picos mais relevantes do ácido gálico, no espectro Raman, foram os de estiramento das ligações de C=O em 1687 cm^{-1} e C-C em 1617 cm^{-1}. A flexão de OH foi atribuída aos picos em 1249 e 789 cm^{-1} e o estiramento de C-OH aos picos 1353 e 440 cm^{-1}. O pico 1085 cm^{-1} refere-se ao estiramento de C-H do anel aromático [53].

4.3 PAS

A espectroscopia fotoacústica é muito utilizada por ser aplicável em materiais tanto orgânicos quanto inorgânicos [54]. Ela difere-se das técnicas de espectroscopia FTIR e Raman, pelo fato de que ao invés de medir a radiação transmitida ou espalhada pela amostra, mede-se a fração da energia luminosa que é absorvida e transformada em calor. Fenômenos de espalhamento elástico e luminescência, que ocorreram na quercetina na técnica Raman não contribuem na PAS. Neste trabalho optou-se por testar a PAS na região do ultravioleta-visível (200-800 nm), já que na região do infravermelho empregamos as técnicas de FTIR e Raman que fornecem maior precisão espectral.

Para realização do experimento, primeiramente obteve-se o sinal fotoacústico das amostras puras, mostrado na Fig. 4-18, e depois das misturas entre dois dos compostos fenólicos totalizando três tipos de misturas físicas, tal como nas técnicas vibracionais comentadas anteriormente. Nota-se que os três compostos apresentam bandas na região entre 200 e 300 nm, entretanto o ácido gálico não apresenta banda para comprimentos de onda maiores que 450 nm.

Nos espectros das misturas de ácido gálico + quercetina e catequina + quercetina não foi possível diferenciar os compostos fenólicos. Já para a mistura ácido gálico + catequina houve uma variação dos espectros com relação a proporção em massa dos compostos. Para avaliar este comportamento obteve-se a intensidade da banda centrada em 468 nm, presente na catequina e com contribuição mínima no ácido gálico. Esta análise pode ser realizada sem uma curva de calibração dos compostos fenólicos individualmente, pois consideramos o sinal fotoacústico proporcional ao coeficiente de absorção óptico das amostras e a intensidade do

sinal fotoacústico sendo diretamente proporcional a concentração dos compostos estudados. Entretanto para satisfazer a Lei de Beer-Lambert, na qual a intensidade medida tem dependência linear com o coeficiente de absorção óptico, a intensidade do sinal fotoacústico também deve variar linearmente com a concentração, pois a falta da linearidade acarretará erro na determinação das concentrações.

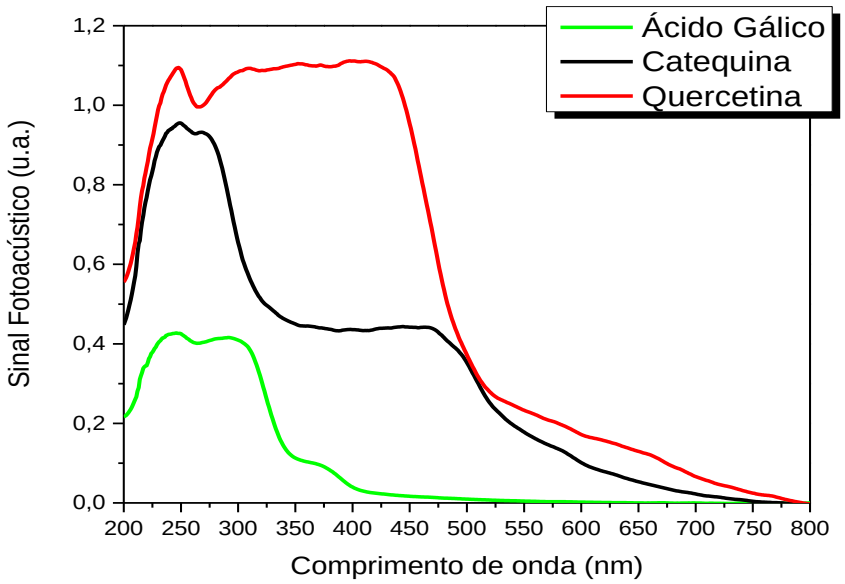

Figura 4-18: Espectro fotoacústico do ácido gálico, catequina e quercetina na região entre 200 a 800 nm.

A Fig. 4-19 (A) mostra os sinais fotoacústicos para as diferentes concentrações de ácido gálico e catequina nas misturas físicas e na Fig. 4-19 (B) o comportamento da intensidade da banda em 468 nm em função da concentração de catequina. Nesta figura foi utilizada a intensidade da concentração nominal de 100% como 100% na concentração estimada e as demais concentrações estimadas proporcionais aos valores das intensidades obtidas nos espectros das misturas físicas. Nota-se que não há linearidade no comportamento da intensidade em 468 nm, e que o valor de 89% na concentração estimada é o único que se aproxima da nominal (90%). Desta forma pode-se dizer que a espectroscopia fotoacústica tem sensibilidade para detectar em torno de 90% de catequina em um mistura física com o ácido gálico, considerando as condições experimentais deste trabalho.

Curvas de calibrações individuais dos compostos fenólicos não foram realizadas pelos mesmos motivos da espectroscopia Raman, em nossas condições experimentais não foi possível obter uma diluição dos compostos fenólicos em pó que não tivesse contribuição nos espectros dentro do intervalo espectral estudado.

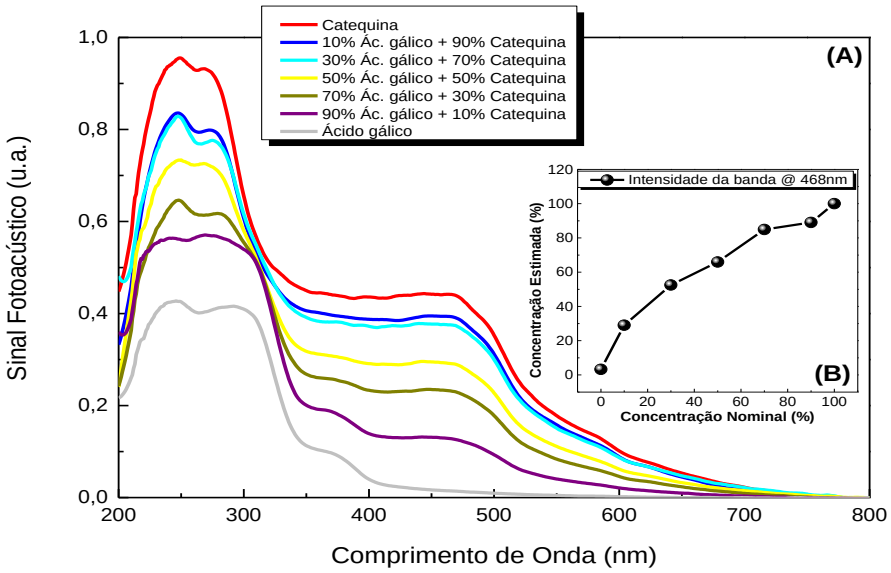

Figura 4-19: (A)Espectros fotoacústico das misturas binárias de ácido gálico + catequina; (B) Variação da intensidade da banda centrada em 468 nm em função da concentração da catequina.

A partir da espectroscopia fotoacústica também é possível realizar análises com relação à fase do sinal fotoacústico, o método de separação de fase é uma forma de isolar espectros fotoacústicos de camadas superpostas, usando o fato de que o sinal de cada camada tem uma fase diferente. Ou seja, como cada um desses centros absorvem em comprimentos de onda distintos, resultará em intervalos de tempo diferentes para absorver a radiação incidente e gerar calor, fornecendo sinais fotoacústicos com fases distintas [39, 41]. Sendo assim também foi testado este método na diferenciação e quantificação das misturas dos compostos fenólicos sólidos, entretanto os resultados não apresentaram relação quanto a variação de concentração e nem quanto a diferenciação entre os dois compostos presentes nas misturas físicas.

Sendo o comportamento da banda em 468 nm na mistura de ácido gálico + catequina não linear, a espectroscopia fotoacústica não pode ser empregada na quantificação dos compostos fenólicos em pó, nas condições experimentais adotadas neste trabalho, mas sim pode contribuir na caracterização e diferenciação de alguns compostos fenólicos em misturas físicas.

4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido muito utilizada para análises dos componentes fenólicos de diversos extratos, tanto para identificar a composição como para a quantificação destes. O HPLC é um método versátil e preciso, pois além de fornecer

informações do conteúdo total de compostos fenólicos presentes em uma amostra, a cromatografia pode ser utilizada para a determinação da concentração de grupos de compostos ou compostos fenólicos individuais [55].

4.4.1 Cromatogramas

As medidas foram realizadas por meio do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Para se obter uma solubilização rápida das amostras, utilizou-se de dimetilsulfóxido, e posteriormente diluição em solução de acetonitrila e água ultrapura. Testou-se o método isocrático, que consiste em analisar uma amostra em que a fase móvel permanece em proporção constante durante toda a análise e o método gradiente, que diferentemente do anterior consiste em uma modificação programada da proporção dos reagentes da fase móvel. O último mostrou-se mais eficaz na separação dos picos, enquanto no método isocrático revelou-se mais demorado. Cada eluição[7], foi repetida mais duas vezes para garantir a reprodutividade do método.

As figuras 4-20 e 4-21 são cromatogramas obtidos a partir da solução das três amostras precursoras, com concentração de 50 μg/mL. Destaca-se que o pico em 6 min é o pico do ácido gálico, enquanto o pico em ~7,4 min é o pico da catequina e o pico em 10,5 min (Fig. 4-21) é o pico da quercetina.

O comprimento de onda utilizado para analisar o ácido gálico e a catequina foi em aproximadamente 275 nm, pois ambas tem absorção nesta região espectral, enquanto a quercetina absorve mais próximo a 365 nm, como se confere nas figuras 4-22, 4-23 e 4-24, que contêm os espectros de absorção de cada uma delas, diluído na concentração de 50 μg/mL em solução de água: acetonitrila (50:50, v/v), na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

[7] Entende-se como corrida de amostra a finalização das medidas do grupo de amostras a serem analisadas.

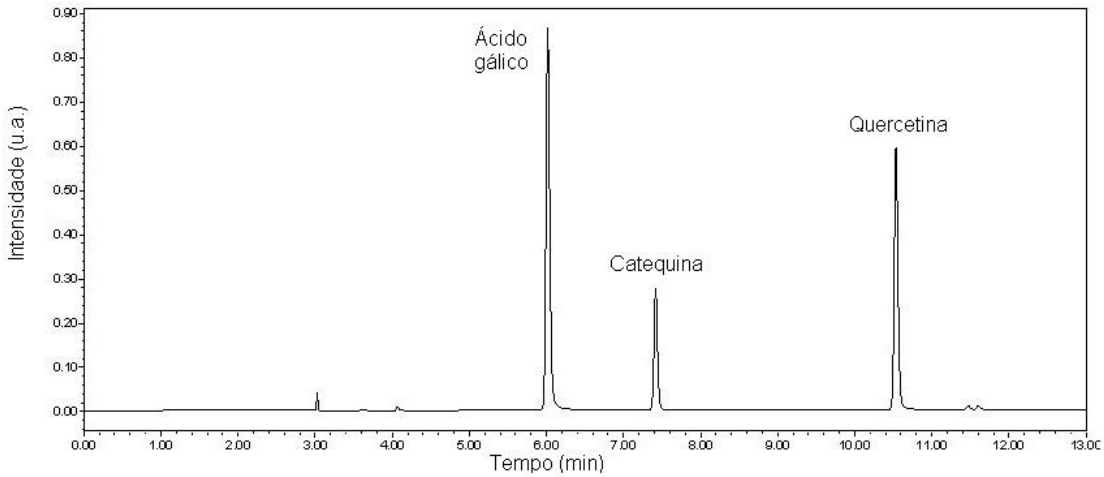

Figura 4-20: Cromatograma com excitação em 275 nm (50 µg/mL de cada substância).

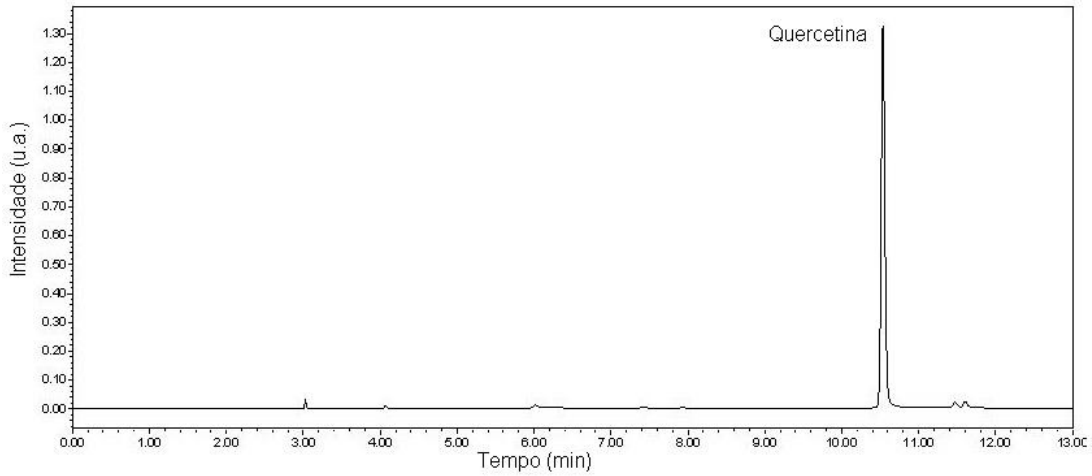

Figura 4-21: Cromatograma com excitação em 365 nm (50 µg/mL de cada substância).

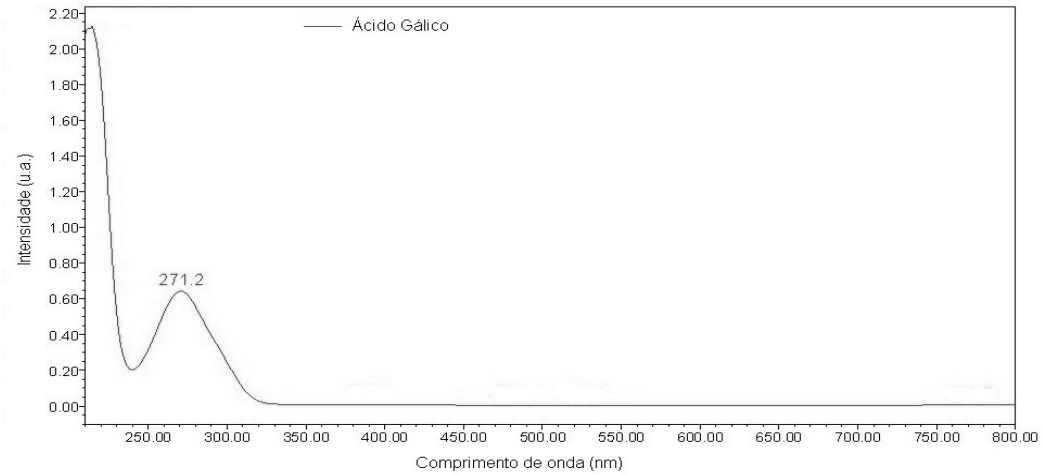

Figura 4-22: Espectro de absorção do ácido gálico na região de UV-Vis (200 – 800 nm).

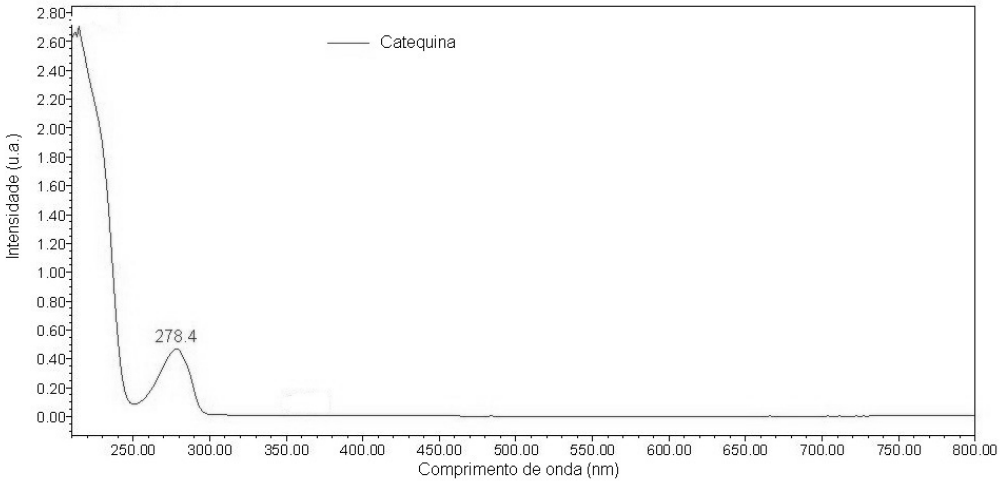

Figura 4-23: Espectro de absorção da catequina na região de UV-Vis (200 – 800 nm).

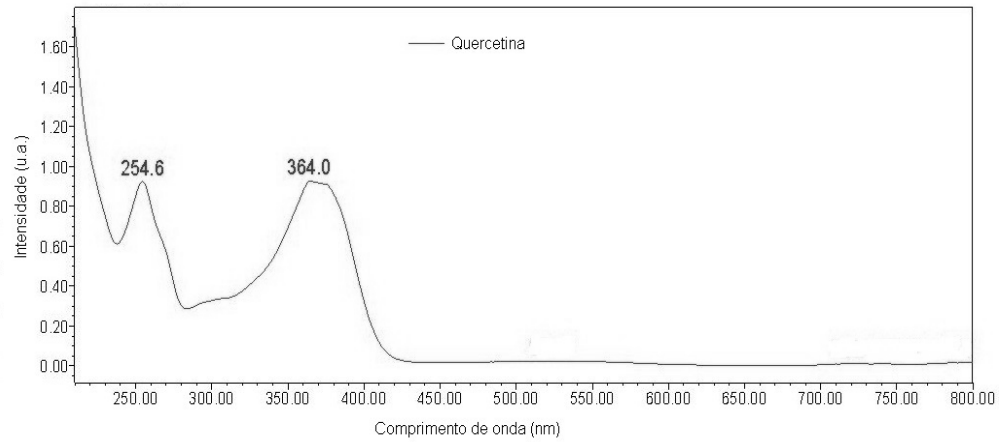

Figura 4-24: Espectro de absorção da quercetina na região de UV-Vis (200 – 800 nm).

Ao compararmos os espectros de absorção obtidos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência com os espectros fotoacústicos (Fig.4-18), nota-se que há uma grande diferença entre eles, mesmo utilizando a mesma faixa espectral para os dois métodos. Sugere-se que essa alteração deve-se à diluição utilizada no HPLC, já que na fase sólida a interação entre as moléculas próximas é maior do que na fase líquida, amostra diluída, na qual os espectros apresentam bandas mais estreitas indicando um afastamento das moléculas mais próximas, ou seja, diminuindo a interação entre elas.

4.4.2 Curvas de calibrações para o HPLC

Para as curvas de calibrações, mostradas nas figuras 4-25, 4-26 e 4-27, preparou-se soluções estoques[8] individuais (10 mg/mL) de cada polifenol em dimetilsulfóxido. As amostras das curvas de calibrações foram obtidas pela diluição das soluções estoque em água: acetonitrila (50:50, v/v) para se obter concentrações de cada substância na faixa de 100 a 1,50 µg/mL.

A linearidade da curva de calibração foi descrita sob a função de $y = a + bx$, onde y representa a área sob o pico de absorção e x representa a concentração nominal do analito. O coeficiente de determinação (R^2) mínimo a ser obtido pela triplicata das curvas calibrações é de 0,99. A faixa de trabalho foi definida como a faixa de concentração das curvas de calibração que podem ser medidas com o nível aceitável de precisão (coeficiente de variação <5%).

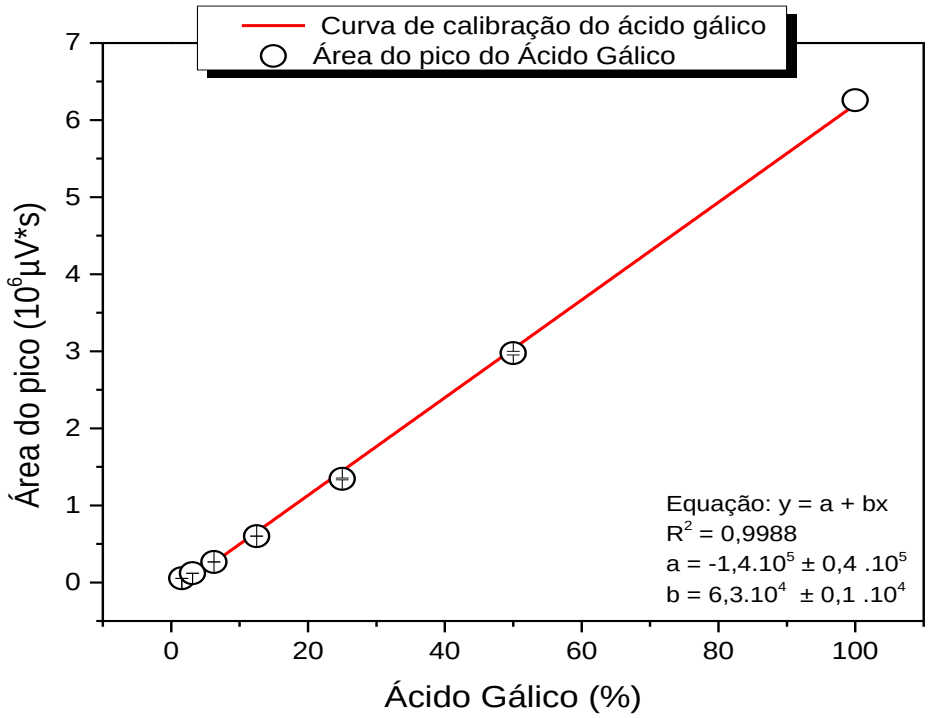

Figura 4-25: Curva de calibração para ácido gálico, utilizando a técnica HPLC.

[8] Entende-se como soluções estoques soluções com a maior concentração, da qual dará origem as demais soluções por meio de diluições.

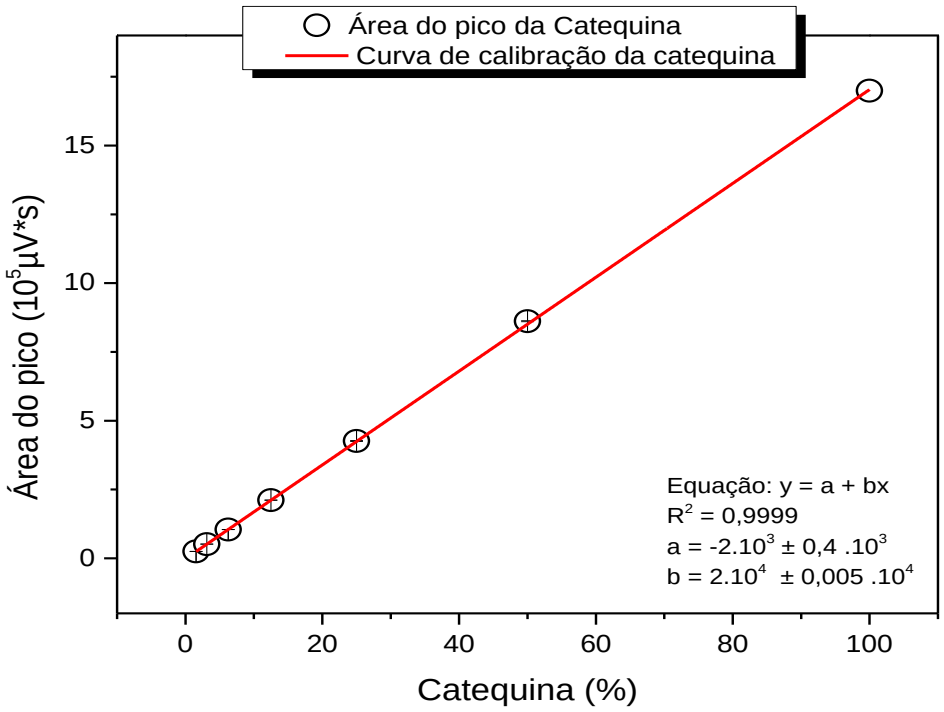

Figura 4-26: Curva de calibração para catequina, utilizando a técnica HPLC.

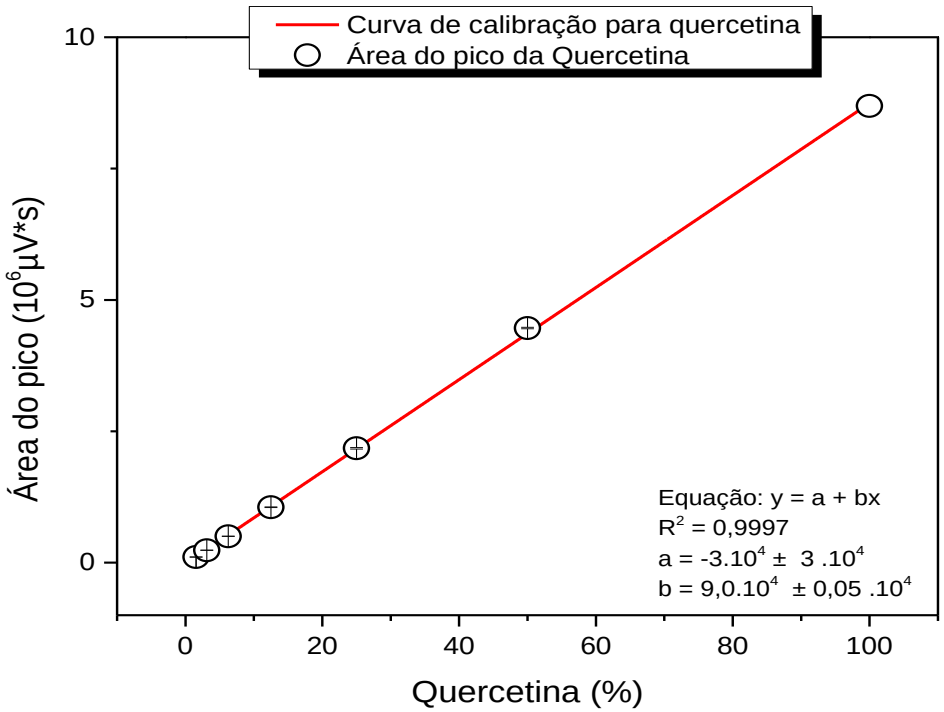

Figura 4-27: Curva de calibração para quercetina, utilizando a técnica HPLC.

4.4.3 Mistura física entre os compostos fenólicos

Preparou-se amostras em dois grupos, e cada grupo com três conjuntos de misturas físicas (ácido gálico com catequina, ácido gálico com quercetina e catequina com quercetina), o grupo 1 são das amostras que foram primeiramente solubilizadas individualmente e, depois estas soluções foram misturadas formando a misturas binárias e o grupo 2 são das amostras nas quais inicialmente foram preparadas as misturas físicas em pó e posteriormente solubilizadas. Adicionado ao grupo 2 a Amostra 1 com proporções descritas na tabela 3-2. Este procedimento foi adotado para efeito de comparação com a técnica de FTIR, na qual as misturas físicas testadas não estavam solubilizadas.

No grupo 1 as amostras foram misturas de soluções variando o volume, com a finalidade de se obter uma proporção em porcentagem de massa dentro da curva de calibração. A preparação das soluções individuais dos polifenóis realizou-se da mesma maneira que a curva de calibração, e misturando essas soluções obteve-se as amostras. As mesmas proporções foram seguidas para as outras misturas. No grupo 2, as amostras foram preparadas em diferentes proporções de massa e homogeneizadas em almofariz de ágata. Em seguida foram dissolvidas da mesma maneira que as amostra da curva de calibração, de modo a se obter concentrações finais dentro da faixa de trabalho.

4.4.4 Teste das curvas de calibrações

As curvas de calibrações adquiridas da cromatografia, foram utilizadas para encontrar as concentrações (concentração estimada) em porcentagem de massa de cada composto nas misturas, tal como realizado para a técnica de FTIR, nos grupos 1 e 2. Nas tabelas 4-7, 4-8 e 4-9, testam-se as curvas para o grupo 1. É possível notar que a variação da concentração nominal para a estimada é baixa, mantendo-se inferior a 5%, mostrando que para esse grupo as curvas de calibrações encontrada e essa metodologia, são eficazes nas quantificação dos compostos fenólicos.

Tabela 4-7: Teste da curva de calibração do ácido gálico para o grupo 1.

Concentração nominal do grupo 1(%)	Área do pico do ácido gálico (μ V*s)	Concentração estimada (%)	Desvio (%)
100% Ácido Gálico	6258369	101	1
90% Ac. G. + 10% Cat.	5713406	92	2
70% Ac. G. + 30% Cat.	4368879	71	1
50% Ac. G. + 50% Cat.	3013184	50	0
30% Ac. G. + 70% Cat.	1685057	29	3
10% Ac. G. + 90% Cat.	506205	10	0
90% Ac. G. + 10% Quer.	5612207	91	1
70% Ac. G. + 30% Quer.	4238995	69	1
50% Ac. G. + 50% Quer.	2985182	49	2
30% Ac. G. + 70% Quer.	1703446	29	3
10% Ac. G. + 90% Quer.	513056	10	0

Legenda: Ac.G. = ácido gálico; Quer. = quercetina; Cat. = catequina

Tabela 4-8: Teste da curva de calibração da quercetina para o grupo 1.

Concentração nominal do grupo 1 (%)	Área do pico da quercetina (μ V*s)	Concentração estimada (%)	Desvio (%)
100% Quercetina	8693645	99	1
10% Ac. G. + 90% Quer.	7945517	91	1
30% Ac. G. + 70% Quer.	6276787	72	3
50% Ac. G. + 50% Quer.	4503191	52	4
70% Ac. G. + 30% Quer.	2685549	31	3
90% Ac. G. + 10% Quer.	872125	10	0
10% Cat. + 90% Quer.	7842822	90	0
30% Cat. + 70% Quer.	6178270	71	1
50% Cat. + 50% Quer.	4453471	51	2
70% Cat. + 30% Quer.	2663780	31	3
90% Cat. + 10% Quer.	844642	10	0

Legenda: Ac.G. = ácido gálico; Quer. = quercetina; Cat. = catequina

Tabela 4-9: Teste da curva de calibração da catequina para o grupo 1.

Concentração nominal do grupo 1 (%)	Área do pico da catequina (μ V*s)	Concentração estimada (%)	Desvio (%)
100% Catequina	1699549	100	0
90% Cat. + 10% Quer.	1526843	90	0
70% Cat. + 30% Quer.	1196902	70	0
50% Cat. + 50% Quer.	845983	50	0
30% Cat. + 70% Quer.	507416	30	0
10% Cat. + 90% Quer.	166521	9,7	2
10% Ac. G. + 90% Cat.	1534380	90	0
30% Ac. G. + 70% Cat.	1207148	71	1
50% Ac. G. + 50% Cat.	856048	50	0
70% Ac. G. + 30% Cat.	515443	30	0
90% Ac. G. + 10% Cat.	163972	9,6	4

Legenda: Ac.G. = ácido gálico; Quer. = quercetina; Cat. = catequina

É importante ressaltar que as curvas de calibrações foram adquiridas a partir da solução dos precursores, ou seja, foi preparada uma solução de 100 μg/mL e mesma foi diluída várias vezes até a concentração de 1,5 μg/mL.

Tabela 4-10: Teste da curva de calibração do ácido gálico para o grupo 2.

Concentração nominal do grupo 2 (%)	Área do pico do Ácido gálico (μ V*s)	Concentração estimada (%)	Desvio (%)
100% Ácido Gálico	8172653	131	31
90% Ác. G. + 10% Cat.	6896246	111	23
70% Ác. G. + 30% Cat.	5186478	84	20
50% Ác. G. + 50% Cat.	3809191	62	24
30% Ác. G. + 70% Cat.	585553	11	62
10% Ác. G. + 90% Cat.	644524	12	20
90% Ác. G. + 10% Quer.	6896354	111	23
70% Ác. G. + 30% Quer.	5271650	85	21
50% Ác. G. + 50% Quer.	3551785	58	16
30% Ác. G. + 70% Quer.	2040924	34	13
10% Ác. G. + 90% Quer.	585723	11	10
Amostra 1 (40%)	2911210	48	20

Legenda: Ac.G. = ácido gálico; Quer. = quercetina; Cat. = catequina

Tabela 4-11: Teste da curva de calibração da catequina para o grupo 2.

Concentração nominal do grupo 2 (%)	Área do pico da Catequina (μ V*s)	Concentração estimada (%)	Desvio (%)
100% Catequina	2122029	124	24
90% Cat. + 10% Quer.	1657260	97	8
70% Cat. + 30% Quer.	1311032	77	10
50% Cat. + 50% Quer.	975206	57	14
30% Cat. + 70% Quer.	577773	34	13
10% Cat. + 90% Quer.	201434	12	10
10% Ác. G. + 90% Cat.	1927706	113	25
30% Ác. G. + 70% Cat.	343422	20	71
50% Ác. G. + 50% Cat.	1011509	59	18
70% Ác. G. + 30% Cat.	612742	36	20
90% Ác. G. + 10% Cat.	208979	12	20
Amostra 1 (40%)	790406	46	15

Legenda: Ac.G. = ácido gálico; Quer. = quercetina; Cat. = catequina

Tabela 4-12: Teste da curva de calibração da quercetina para o grupo 2.

Concentração nominal do grupo 2 (%)	Área do pico do Quercetina (μ V*sec)	Concentração estimada (%)	Desvio (%)
100% Quercetina	10475381	120	20
10% Ác. G. + 90% Quer.	9537895	109	21
30% Ác. G. + 70% Quer.	7600539	87	24
50% Ác. G. + 50% Quer.	5351708	61	22
70% Ác. G. + 30% Quer.	1496289	17	43
90% Ác. G. + 10% Quer.	1105720	13	30
10% Cat. + 90% Quer.	9509214	109	21
30% Cat. + 70% Quer.	7117664	81	16
50% Cat. + 50% Quer.	5235526	60	20
70% Cat. + 30% Quer.	3009055	35	17
90% Cat. + 10% Quer.	934158	11	10
Amostra 1 (20%)	2259766	26	30

Legenda: Ac.G. = ácido gálico; Quer. = quercetina; Cat. = catequina

Os desvios percentuais para as misturas binárias, com relação as concentrações nominais, no teste das curvas de calibrações de FTIR, ficaram em torno de 5% para o ácido gálico, para concentrações entre 90 e 30%, ~8% para a catequina, para concentrações entre 90

e 50%, e ~4% para a quercetina, para concentrações entre 90 a 50%. De modo geral, para a técnica de FTIR, em misturas físicas binárias, os melhores resultados são obtidos para concentrações superiores a 50%para um composto fenólico, para concentrações menores o desvio percentual fica em torno de 20% com relação às concentrações nominais.

Mais um indício da característica promissora da técnica de FTIR é quando comparado os desvios percentuais do grupo 2 de amostras medidas com a técnica de HPLC, considerada padrão em separação e quantificação de polifenóis. O grupo 2, nos quais os compostos foram misturados enquanto na forma sólida e posteriormente solubilizados, a técnica de HPLC, apresentou desvios percentuais maiores que os do FTIR, comparando as concentrações estimadas obtidas via curva de calibração com as concentrações nominais, sendo de ~21 % para o ácido gálico e quercetina e ~24% para a catequina, entre o mesmo intervalo de concentrações avaliados para o FTIR. O grupo 1 medidos com a técnica de HPLC mostra baixos desvios percentuais comparados aos do FTIR, isso porque os compostos fenólicos foram solubilizados separadamente e depois suas soluções foram misturas de forma a obter as mesmas concentrações que as misturas das outras técnicas. Nota-se que este resultado depende da afinidade do composto com o solvente, o que para um material de componentes desconhecidos dificultaria a análise de separação e quantificação devido à procura do solvente adequado. Além disso, o grupo 1 e a curva de calibração foram preparadas e medidas no mesmo dia, enquanto o grupo 2 foi realizado posteriormente, o que pode tornar a curva menos expressiva para esse grupo.

A cromatografia líquida de alta eficiência é muito utilizada para quantificação de compostos fenólicos, isso por conta da sua precisão, repetibilidade e reprodutibilidade. Em geral um usuário dessa técnica, terá um custo baixo em longo prazo, dado a durabilidade das colunas utilizadas, quando tomadas os cuidados necessários. Porém em curto prazo, a técnica custa muito considerando a variedade de insumos necessários (colunas, fases móveis, solventes e outros) para realizar as medidas. Em comparação com a técnica de FTIR, o usuário necessita além do espectrômetro e suas amostras em pó, apenas o KBr utilizado na diluição, tornando-se assim uma técnica acessível.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo, utilizou-se das técnicas de espectroscopia de FTIR, Raman e fotoacústica com o objetivo de testá-las como metodologias a serem empregadas na separação e quantificação de compostos fenólicos sólidos. Para esse fim, mediu-se três padrões de compostos fenólicos (ácido gálico, catequina e quercetina), que estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Primeiramente, para o FTIR, obteve-se curvas de calibrações para cada composto, diluindo-os em brometo de potássio. Após se obter as curvas, foram realizadas as misturas binárias e posteriormente com os três compostos em diferentes proporções. O FTIR mostrou-se eficaz tanto para a separação quanto para a quantificação dos compostos fenólicos, pois as concentrações estimadas, tanto nas misturas binárias como as ternárias adequaram-se as curvas de calibração.

Um aspecto relevante para a técnica de FTIR é a presença de partículas espalhadoras nos compostos fenólicos sólidos, como no caso da catequina, o que influenciou na linearidade de sua curva de calibração. Pois foi observado que para a quercetina e o ácido gálico não houve influência na linearidade utilizando as mesmas condições experimentais.

Os testes da curva de calibração do HPLC para o grupo 2 estão demonstrados nas tabelas 4-10, 4-11 e 4-12, nelas notam-se que a variação entre as concentrações nominal e estimada é maior do que para o grupo 1, algumas vezes com erros superiores a 20%, e superiores aos erros encontrados nas curvas do FTIR também.

Para as espectroscopias Raman e fotoacústica não foi possível obter curvas de calibração de cada polifenol, pois houve a dificuldade de encontrar outro material para diluir as amostras sólidas sem que este se sobrepusesse as bandas avaliadas nos espectros dos compostos fenólicos. Sendo assim a quantificação dos polifenóis não foi possível, porém ambas as técnicas se mostraram eficientes na separação dos compostos em misturas. Na espectroscopia Raman, dois fatores influenciaram diretamente as análises dos espectros: luminescência e espalhamento elástico.

Na espectroscopia fotoacústica apesar dos efeitos de luminescência e espalhamento não contribuírem para o sinal fotoacústico, a sua dependência com o coeficiente de absorção óptico do material influenciou nos resultados deste trabalho. Não foi possível observar nenhum comportamento em função da concentração para nenhuma das misturas binárias ou separação entre os compostos. Se o coeficiente de absorção óptico da amostra for grande, ou seja, se a amostra for absorvedora, a difusão de calor dentro da amostra não obedece mais ao modelo

bidimensional e sim a um modelo tridimensional, no qual a difusão de calor não é mais uniforme em todas as direções na amostra, neste caso uma adaptação ao modelo adotado neste trabalho seria necessária, o qual não é o objetivo.

Como perspectivas futuras, pretende-se ampliar as técnicas de quantificação desenvolvida e adaptá-las para que possam ser aplicáveis a extratos naturais, tanto em solução quanto em sólidos.

6 REFERÊNCIAS

[1] K. B. Pandey e S. I. Rizvi, “Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease”, *Oxid. Med. Cell. Longev*., vol. 2, n. 5, pp. 270–8, Jan. 2009.

[2] I. C. W. Arts e P. C. H. Hollman, “Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies 1 – 4”, *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, 2005.

[3] M. G. Salas, et al., “Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro”, *Rev. Cient. la Univ. autónoma Coahuila*, vol. 5, n. 9, pp. 5–11, 2013.

[4] D. M. Brownson, et al., “Flavonoid effects relevant to cancer”, *J. Nutr*., vol. 132, n. 11 Suppl, p. 3482S–3489S, 2002.

[5] T. Nagao, T. Hase e I. Tokimitsu, “Diet and Physical Activity A Green Tea Extract High in Catechins Reduces Body Fat and Cardiovascular Risks”, *Obesity*, vol. 15, n. 6, pp. 1473–1483, 2007.

[6] A. Miltersteiner, et al., “Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos”, *Acta Cir. Bras*., vol. 18, n. 3, 2003.

[7] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, e D. J. Bobilya, “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships”, *J. Nutr. Biochem*., vol. 13, n. 10, pp. 572–584, 2002.

[8] R. Longhini, “Avaliação de interações do ácido gálico frente a adjuvantes empregados em formas farmacêuticas sólidas”, *Dissertação* (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

[9] A. Derenne, et al., “FTIR spectroscopy: A new valuable tool to classify the effects of polyphenolic compounds on cancer cells”, *Biochim. Biophys. Acta* - Mol. Basis Dis., vol. 1832, n. 1, pp. 46–56, 2013.

[10] M. J. Martelo-Vidal e M. Vázquez, “Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV–VIS–NIR spectroscopy and chemometrics tools”, *Food Chem*., vol. 158, pp. 28–34, 2014.

[11] F. G. Bueno, et al., “Development of a UV/VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from caesalpinia peltophoroides BENTH”, *Quim. Nova*, vol. 35, n. 4, pp. 822–826, 2012.

[12] L. H. Dall´Antonia e E. Archela, “Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão”, *Semin. Ciências Exatas e Tecnológicas*, vol. 34, n. 2, pp. 193, 2013.

[13] H. Schulz e M. Baranska, “Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy”, *Vib. Spectrosc*., vol. 43, n. 1, pp. 13–25, 2007.

[14] K. Skogerson, M. Downeym, M. Mazza, e R. Boulton, “Rapid determination of phenolic components in red wines from UV-Visible spectra and the method of partial least squares”, *Am. J. Enol. Vitic*., vol. 58, pp. 318–325, 2007.

[15] O. Sala, *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*, 2.ed. São Paulo: UNESP, 2008.

[16] A. D. G. Rodrigues e J. C. Galzerani, “Espectroscopias de infravermelho , Raman e de fotoluminescência : potencialidades e complementaridades”, *Rev. Bras. Ensino Física*, vol. 34, n. 4, pp. 4309–9, 2012.

[17] “Encyclopædia Britannica Online , sv ‘cromóforo,’” 2016. [Online]. Disponível em: <https://global.britannica.com/science/chromophore>. Acesso em 16 de jan, 2016.

[18] A. C. Bento, “Caracterização de propriedades ópticas e térmicas de materiais por espectroscopia fotoacústica”, *Tese* (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Campinas, 1990.

[19] B. H. Havsteen, “The biochemistry and medical significance of the flavonoids”, *Pharmacology and Therapeutics,* vol. 96, n. 2–3. 2002.

[20] S. A. Aherne e N. M. O’Brien, “Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism”, *Nutrition*, vol. 18, n. 1, pp. 75–81, Jan. 2002.

[21] C. H. Degáspari e N. Waszczynskyj, “Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos”, *Visão Acadêmica*, Curitiba, vol. 5, no. 1, pp. 33–40, 2004.

[22] C. M. D. M. Sousa, et al., “Fenóis Totais E Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais”, *Quim. Nov.*, vol. 30, n. 2, pp. 351–355, 2007.

[23] O. V Brenna e E. Pagliarini, “Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines”, *J. Agric. Food Chem*, pp. 4841–4844, 2001.

[24] ANVISA, Resolução no 04, de 24 de novembro de 1988, vol. 1988. Brasil, 1988, pp. 24716–24723.

[25] E. B. Behling, et al., “Flavonóide Quercetina : aspectos gerais e ações biológicas”, *Aliment. e Nutr. - Brazilian J. Food Nutr*., vol. 15, n. 3, pp. 285–292, 2004.

[26] I. Mohammed-Ziegler e F. Billes, “Vibrational spectroscopic calculations on pyrogallol and gallic acid”, *J. Mol. Struct*., vol. 618, n. 3, pp. 259–265, 2002.

[27] M. M. Ramos-Tejada, et al., “Investigation of alumina/(+)-catechin system properties. Part I: a study of the system by FTIR-UV–Vis spectroscopy”, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 24, n. 3–4, pp. 297–308, 2002.

[28] X. Li e Y. Hao, “Probing the binding of (+)-catechin to bovine serum albumin by isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques”, *J. Mol. Struct*., vol. 1091, pp. 109–117, 2015.

[29] C. Cren-Olivé, P. Hapiot, J. Pinson e C. Rolando, “Free radical chemistry of flavan-3-ols: Determination of thermodynamic parameters and of kinetic reactivity from short (ns) to long (ms) time scale”, *J. Chem. Soc*., Am. vol. 124, n. 47, pp. 14027–14038, 2002.

[30] G. B. Celli, “Comportamento fisiológico e bioquímico de frutos da pitangueira (eugenia uniflora l.): características de interesse para o consumo humano”, *Dissertação* (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, 2011.

[31] K. Gomathi, D. Gopinath, M. R. Ahmed, and R. Jayakumar, “Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat”, *Biomaterials*, vol. 24, pp. 2767–2772, 2003.

[32] T. G. M. Bonadio, “Estudos dos Compósitos TiO_2-Hidroxiapatita e Nb_2O_5-Hidroxiapatita: comportamento físico-mecânico, estrutural e de bioatividade”, *Dissertação* (Mestrado em Física) - Universidade Estadual de Maringá, 2011.

[33] Bruker Optik GMBH, *“Vertex 70v User Manual”*. Ettlingen, Germany, 2007.

[34] H. M. Mansour and A. J. Hickey, “Raman characterization and chemical imaging of biocolloidal self-assemblies, drug delivery systems, and pulmonary inhalation aerosols: a review”, *AAPS PharmSciTech*, vol. 8, n. 4, p. E99, 2007.

[35] “Theory of Raman Scattering”, [Online]. Disponível em: <http://bwtek.com/raman-theory-of-raman-scattering/>. Acesso em 16 de jan, 2016.

[36] S. M. V. Gómez, “Caracterização de carotenóides e lipideos de microalgas in vivo utilizando espectroscopia raman”, *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Industrial) - Universidade Federal da Bahia, 2013.

[37] A. Rosencwaig, “Theory of the photoacoustic effect with solids”, *J. Appl. Phys*., vol. 47, n. 1, pp. 64, 1976.

[38] A. G. Bell, “On the production and reprodruction of sound by light”, *Am.J. Sci*., vol. 20, pp. 305, 1880.

[39] L. V. de Castro, “Estudo de lesão de cárie experimental via espectroscopia fotoacústica e raman”, *Dissertação* (Mestrado em Física) - Universidade Estadual de Maringá, 2015.

[40] D. Almond e P. Patel, *Photothermal Science and Techniques*, 1 ed. Londres: Chapman & Hall, 1996.

[41] O. P. Junior, “Aplicações de medidas de fase do efeito fotoacústico”, *Dissertação* (Mestrado em Física) - Universidade Estadual de Campinas, 1985.

[42] “O que é a fotoacústica?” [Online]. Disponível em: <http://www.fis.ufba.br/~ossamu/Pesquisa/Fotoacustica/Fotoacustica.html>. Acesso em 16 de jan, 2016.

[43] A. C. Tam, “Applications of photoacoustic sensing techniques”, *Rev. Modem Phys*., vol. 58, pp. 381–426, 1986.

[44] C. A. de la Torre, “Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de aminas biogênicas como ferramenta para a avaliação da qualidade carne de aves”, *Tese* (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, 2014.

[45] F. M. Lanças, “A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente ‘compatíveis’?”, *Sci. Chromatogr*., vol. 1, n. 2, pp. 35–61, 2009.

[46] Waters Corporation, “How Does High Performance Liquid Chromatography Work?”, 2016. [Online]. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt_BR>. Acesso em 16 de jan, 2016.

[47] E. SEHN, “Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação da propagação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos”, Universidade Estadual de Maringá, 2006.

[48] A. Torreggiani, Z. Jurasekova, S. Sanchez-Cortes, e M. Tamba, “Spectroscopic and pulse radiolysis studies of the antioxidant properties of (+)catechin: metal chelation and oxidizing radical scavenging”, *J. Raman Spectrosc*., vol. 39, n. 2, pp. 265–275, Feb. 2008.

[49] M. Catauro, et al., “Silica/quercetin sol–gel hybrids as antioxidant dental implant materials”, *Sci. Technol. Adv. Mater*., vol. 16, n. 3, p. 35001, 2015.

[50] M. Heneczkowski, M. Kopacz, D. Nowak e A. Kuzniar, “Infrared spectrum analysis of some flavonoids”, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, vol. 58, n. 6. pp. 415–420, 2001.

[51] M. Ji, C. Li, e Q. Li, “Rapid separation and identification of phenolics in crude red grape skin extracts by high performance liquid chromatography coupled to diode array detection and tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr*. A, vol. 1414, pp. 138–146, 2015.

[52] J. P. Cornard, J. C. Merlin, A. C. Boudet e L. Vrielynck, “Structural study of quercetin by vibrational and electronic spectroscopies combined with semiempirical calculations”, *Biospectroscopy*, vol. 3, n. 3, pp. 183–193, 1997.

[53] J. Huguenin, S. Ould Saad Hamady, and P. Bourson, “Monitoring deprotonation of gallic acid by Raman spectroscopy”, *J. Raman Spectrosc*., vol. 46, n. 11, pp. 1062–1066, 2015.

[54] A. Rosencwaig, “Photoacoustic spectroscopy of biological materials”, *Science*, vol. 181, n. 100, pp. 657–658, 1973.

[55] A. Escarpa e M. C. Gonzalez, “Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 427, pp. 119–127, 2001.

[56] E. Fumagali, R. A. C. Gonçalves, M. D. F. P. S. Machado, G. J. Vidoti e A. J. B. De Oliveira, “Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros Tabernaemontana e Aspidosperma”, *Brazilian J. Pharmacogn*., vol. 18, n. 4, pp. 627–641, 2008.

[57] IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry Compendium of Chemical Terminology. M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins, 2014.