

AVALIAÇÃO DE DILUIÇÕES HOMEOPÁTICAS A BASE DE SILÍCIO NA PRODUÇÃO DE TANINO PELO ANGICO-VERMELHO (*Anadenanthera peregrina*)

Ana Clara Gomes Rezende¹; Rosiane Fátima de Almeida²; Maria José Miranda Cordeiro³; Thaíssa de Souza Corrêa Gomes⁴; Ligiane Rios Gouvea⁵; Patrícia Lage⁶

1 Ana Clara Gomes Rezende, Bolsista FAPEMIG, Técnico em Química Integrado, IFMG Campus Betim, Betim - MG; anacgr2002@gmail.com

2 Rosiane Fátima de Almeida, Bolsista CNPq, Engenharia Florestal, IFMG Campus São João Evangelista, São João Evangelista - MG; rosianecontacto@gmail.com

3 Maria José Miranda Cordeiro, Aluna voluntária, Engenharia Florestal, IFMG Campus São João Evangelista, São João Evangelista - MG; maria1cordeiro@outlook.com

4 Thaíssa de Souza Corrêa Gomes, Aluna voluntária, Engenharia Florestal, IFMG Campus São João Evangelista, São João Evangelista - MG; thaissasouzac@outlook.com

5 Ligiane Rios Gouvea: Pesquisadora do IFMG, Campus Betim; ligiane.gouvea@ifmg.edu.br

6 Patrícia Lage: Pesquisadora do IFMG, Campus São João Evangelista; patricia.lage@ifmg.edu.br

RESUMO

Os taninos tem sua aplicação na produção de resina, na estabilização da cerveja, no curtimento de pele animal para a transformação em couro, além de ter diversas atividades farmacológicas e biológicas. O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado e acredita-se que esteja envolvido na defesa química das plantas contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados e contra microrganismos patogênicos (TAKECHI et al., 1985). Em território brasileiro, há uma gama de plantas taníferas, podendo ser destacado o angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*). Essa árvore apresenta significativa regeneração natural, ocorrendo em solos secos, úmidos, rasos, compactados, mal drenados e até encharcados. Tal árvore apresenta crescimento rápido, podendo atingir produtividades de até 25,55 m³.ha⁻¹.ano⁻¹ (CARVALHO, 2003). Para estimular o sistema de defesa das plantas de modo que produzam maior quantidade de tanino, propõe-se o uso de homeopatia silícea. A proposta dessa técnica é utilizar, em concentrações muito pequenas, substâncias contendo silício que estimulam o controle biológico natural do angico-vermelho, ocasionando um aumento na produção do tanino pela árvore, sem contaminar o solo. Inicialmente, foi extraído e quantificado fenóis totais, taninos totais e taninos hidrolisáveis presentes na casca do angico-vermelho. Foram coletadas amostras de árvores já crescidas na região de São João Evangelista e a extração foi realizada com diferentes solventes (água, acetona, metanol e etanol) pelo método de decocção. Observou-se que o melhor solvente para a extração do tanino, dentre os testados, foi o metanol com 4,80 mg de fenóis totais/g, 1,78mg de taninos totais/g e 0,1033mg de taninos hidrolisáveis/g de amostra. Paralelamente a esse estudo, estão sendo tratadas amostras de angico-vermelho no município de São João Evangelista com doses homeopáticas a base de silício. Em estudos futuros, o tanino dessas amostras será extraído com metanol e será quantificado fenóis totais, taninos totais e taninos hidrolisáveis para observar o efeito da homeopatia na produção de tanino do angico-vermelho.

INTRODUÇÃO:

Os taninos são compostos fenólicos presentes na maioria das plantas. Sua concentração varia de acordo com os tecidos vegetais, a idade e tamanho da planta, da parte coletada, da época ou, ainda, do local de coleta (MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos são classificados em dois grupos principais, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham molécula polifenóis: hidrolisáveis e condensados (proantocianidinas). A principal característica desses compostos consiste na sua capacidade de complexarem e precipitarem proteínas, o que possibilita transformar a pele animal em couro curtido. (HERGERT, 1989; PAES et al., 2010; PIZZI, 1993; SARTORI, 2012).

Os taninos hidrolisáveis consistem de poliésteres, que são caracterizados por um núcleo (glucose) esterificado com ácidos gálicos e ácidos elágicos, formados a partir do chiquimato. Este grupo de taninos

pode ser detectado em elevadas concentrações principalmente em madeiras, cascas de árvores, folhas e galhos. O outro tipo de tanino envolve os condensados. Possuem importância marcante em alimentos, pois sua presença em baixas concentrações proporciona características sensoriais desejáveis, ditas como "o corpo da fruta". No entanto, concentrações elevadas conferem aos frutos e outros alimentos características adstringentes. Protegem as plantas contra microrganismos patogênicos (PIZZI, 1993; ZUCKER, 1983).

No Brasil existem diversas espécies produtoras de tanino e, entre elas, destaca-se o angico-vermelho. Essa árvore pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae e ao gênero *Anadenanthera*, que apresenta sete espécies: *A. cobi*, *A. rigida*, *A. gonoantha*, *A. colubrina*, *A. macrocarpa*, *A. peregrina* e *A. falcata*. Sendo que, na região nordeste, o angico-vermelho é tradicionalmente utilizado como única fonte de taninos, apesar da diversidade de espécies arbóreas e arbustivas de ocorrência na região (PAES et al., 2010; RIZZINI, 1971).

Os taninos são metabólitos secundários das plantas de grande interesse econômico e ecológico. Em situações de estresse, o vegetal pode aumentar a produção de substâncias de defesa, como os taninos, em resposta à mudança de ambiente (MELLO et al., 2001; DICKE e HILKER, 2003). Porém, existem poucos estudos nesse sentido.

Para estimular o sistema de defesa das plantas de modo que produzam maior quantidade de tanino, propõe-se o uso de homeopatia silícea. A proposta dessa técnica é utilizar, em concentrações muito pequenas, substâncias contendo silício que estimulam o controle biológico natural do Angico-Vermelho, ocasionando um aumento na produção do tanino pela árvore, sem contaminar o solo. O uso da técnica de homeopatia na agricultura pode ser o caminho para se promover o equilíbrio e atender às exigências de uma boa produção de matéria-prima, porém com qualidade ambiental (CADERNO, 2009).

Considerando o exposto, o Angico-Vermelho é uma fonte alternativa muito viável para exploração e manejo em qualquer região brasileira e dispor de suas cascas para a extração de taninos é uma alternativa economicamente factível. Após a extração de taninos, a casca pode ainda ser aproveitada para geração de energia para a própria empresa, bem como ser empregada como compostagem ou outras formas de aproveitamento (SARTORI, 2012).

O acervo de publicações relacionadas à utilização de tecnologias homeopáticas como mecanismos biológicos de crescimento e desenvolvimento vegetal, controle de pragas e doenças e demais aplicações, são ainda incipientes no meio científico. Há, portanto, a necessidade de trabalhos e pesquisas que possam contribuir para a sociedade científica nesse sentido.

Os compostos fenólicos das plantas, incluindo os taninos, são extraídos, utilizando-se extração por solventes, em folhas, sementes, cascas e frutos verdes. Os solventes mais comumente utilizados são o metanol, o etanol e a acetona. Para quantificar essas substâncias, destacam-se os métodos colorimétricos, que utilizam os reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu. O cálculo do teor de taninos, nesse caso, é realizado indiretamente, subtraindo-se o teor de fenóis totais e o teor da fração não-tanante, ou seja, o teor de fenóis simples, que não são precipitados previamente com material proteico ou polimérico. Esse método baseia-se na possibilidade da formação de complexos entre os taninos e proteínas, sendo que os fenóis simples permanecem em solução, possibilitando a análise espectrofotométrica (MONTEIRO et al., 2005; NOZELLA, 2001; SARTORI, 2012).

Esse trabalho teve como objetivo de extrair e quantificar o tanino do angico-vermelho com diferentes solventes. O melhor extrator será utilizado em amostras tratadas com diluições homeopáticas a base de silício. Essa análise antecipada permite uma otimização e redução na quantidade de amostra.

METODOLOGIA:

Materiais e reagentes:

- Cascas de Angico-Vermelho
- Moinho de facas
- UV-vis (mono feixe) Femto, Cirrus 80
- Balança analítica – Marte Científica – ATY224
- Béqueres de diferentes volumes
- Tubos de ensaio
- Balões volumétricos de diferentes volumes
- Papel de filtro

- Micropipetas de diferentes volumes
- Vidros de relógio
- Espátulas
- Frascos Falcon® de diferentes volumes
- Água destilada
- Álcool etílico P.A.- A.C.S
- Ácido tânico P.A. – Cromoline
- Carbonato de sódio – CRQ
- Reagente de de Folin-Ciocalteu - Êxodo Científica
- Polivinilpolipirrolidona (PVPP) - Synth
- Centrífuga Megafuge 8 - Datamed
- Placa de agitação/aquecimento – SOVEREIGN

Procedimento:

- Coleta e preparo do material de estudo

As cascas do angico-vermelho (*Anadenanthera Peregrina*) foram cedidas pelo IFMG Campus São João Evangelista. As cascas foram secas ao sol durante 3 dias consecutivos e moídas em moído de facas.

- Extração das frações solúveis pelo método de decocção

A extração dos taninos na casca foi realizada por decocção. No método de decocção, foram pesados 10 g de matéria seca e moída e adicionados 100 mL de diferentes solventes (água destilada, etanol, acetona e metanol) em um béquer de 250 mL. O sistema permaneceu sob agitação constante por um período de quatro horas, com auxílio de agitador magnético. Após este período, o extrato foi filtrado e o sobrenadante foi recolhido e conservado em geladeira, após se completar o volume para 100 mL.

- Quantificação dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

As análises de fenóis totais por Folin-Ciocalteu foram realizadas no laboratório de pesquisa do Instituto Federal de Minas Gerais – campus Betim em espectrômetro na região do UV-vis (mono feixe) Femto, Cirrus 80. Utilizou-se metodologia de Waterhouse (2002), com algumas modificações.

Para o preparo da curva padrão foi utilizada uma solução de ácido tânico 200mg/50mL (4mg/mL) (solução mãe 1), para cada solvente (acetona, metanol, etanol e água destilada). Retirou-se dessa solução 5 mL e completou-se o volume para 50mL do solvente (solução intermediária). Retirou-se alíquotas de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 e 1,1 mL da solução intermediária, sendo o volume completado para 2mL (solução mãe 2). Dessas soluções, foram retirados 0,5 mL acrescidos de 2,5 da solução de Folin-Ciocalteu 50% (v/v) e 2,0 da solução de carbonato de sódio a 4% (m/v). Essas misturas ficaram protegidas da luz e, após 30 minutos, foi medida a absorbância em 760 nm.

Para quantificação de fenóis na amostra, foi retirado 0,1mL do extrato obtido a partir da extração das cascas do angico-vermelho quando o extrator era etanol e água. Quando o solvente era metanol e acetona retirou-se 0,05mL do extrato obtido. Posteriormente, completou-se ambas amostras para o volume de 0,5mL com a utilização dos respectivos solventes. Em seguida, foi adicionado 2,5mL da solução de Folin-Ciocalteu 50% (v/v) e 2,0mL da solução de carbonato de sódio a 4% (m/v). Após 30 minutos, protegida da luz, foi feita a leitura da absorbância em 760 nm. O teor de fenóis totais foi calculado em equivalente de ácido tânico pela curva de calibração e expressa com base na matéria seca.

- Quantificação dos taninos totais utilizando polivinilpolipirrolidona (PVPP)

A determinação dos taninos baseia-se no fato que PVPP se liga a eles, sendo então precipitados.

Para o preparo das curvas de calibração utilizou-se uma solução de ácido tânico 0,4mg/mL. Retirou-se diferentes volumes desta solução: 0, 40, 80, 120, 160, 200 µL e completou-se o volume para 1mL com o reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente, adicionou-se 2,5mL de carbonato de sódio (4% m/v) e os tubos foram agitados e protegidos durante 30 minutos da luz.

Foram pesados 100 mg de PVPP em frascos Falcon® (um por amostra) e, nesses frascos, foram adicionados 2,5mL do solvente quando os solventes eram metanol e acetona. Logo após foram adicionados 1mL da solução obtida através da extração das frações solúveis. Utilizando a água destilada como solvente, adicionou-se 1,5mL de água ao Falcon® com PVPP e 0,5mL da solução extratora. Todavia para o etanol necessitou-se uma diluição da solução extratora, para tal, adicionou-se 0,5mL de extrato e completou-se o volume para 10mL em um balão volumétrico apropriado, posteriormente acrescentou-se 2,5mL de etanol ao Falcon® com PVPP e 0,5mL do extrato previamente diluído.

Após agitação, os tubos foram colocados na geladeira por 15 minutos e agitados novamente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3800 rotações por minuto, durante um período de 4 minutos e o sobrenadante resultante foi coletado. O sobrenadante deve conter apenas fenóis simples, uma vez que os taninos foram precipitados. Amostras de 200 µL do sobrenadante foram pipetados em tubos de ensaio, o volume foi completado para 1 mL com os solventes, logo após, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 50% (v/v) e 2,5 mL de carbonato de sódio 4% (m/v). Os tubos foram agitados, e após 30 minutos protegidos da luz, foi feita a leitura em espectrômetro em 760nm. Determinou-se o teor de taninos totais por diferença entre fenóis totais e simples. O teor de taninos totais foi calculado em equivalente de ácido tânico pela curva de calibração e expresso com base na matéria seca.

- Quantificação do teor de taninos hidrolisáveis

Para a determinação do teor de taninos hidrolisáveis seguiu-se o método descrito abaixo (ÇAM e HISIL, 2010).

A partir da diluição de solução de ácido tânico de 5 g/L para cada solvente (água, etanol, metanol e acetona), foram preparadas as soluções padrão de diferentes concentrações (300, 500, 800, 1100, 1400 e 1700 mg/L) para obtenção da curva de calibração. Além das soluções padrão preparou-se também a solução auxiliar de iodato de potássio (2,5% m/v) utilizando água destilada como solvente.

Para a construção da curva padrão, em tubos de ensaio, foram adicionados 1mL de cada padrão e 5mL de solução de iodato de potássio (2,5% m/v). Após agitação, aguardou-se o tempo de 4 minutos e mediu-se a absorbância a 550nm. O branco foi obtido com o respectivo solvente.

Para determinar o teor de taninos hidrolisáveis na amostra retirou-se 1mL do extrato quando o solvente era água destilada e acetona, e 0,5mL quando o solvente era etanol e metanol, após os volumes de extração serem adicionados nos tubos de ensaio completou-se o volume para 6mL com a solução de iodato de potássio (2,5%), agitou-se e aguardou-se 4mn para a leitura em espectrômetro em 550nm. O branco foi obtido a partir do solvente utilizado em cada extração.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A quantificação dos fenóis totais foi realizada através de curvas de calibração de ácido tânico. A extração das cascas do angico-vermelho foi testada utilizando quatro solventes: acetona, metanol, água destilada e etanol, utilizando um espectrômetro na região do UV-vis em 760nm.

A curva de calibração do ácido tânico utilizando como solvente o metanol, está apresentada na figura 1. A equação da reta obtida ($y = 0,0613 + 0,0187x$, $R^2 = 0,9966$) foi empregada para determinar a concentração em mg/mL de ácido tânico, onde x corresponde à concentração de ácido tânico e y à absorbância da amostra. A absorbância obtida do extrato foi 0,313 em 760 nm, resultando em uma concentração de $480,13 \times 10^{-3}$ mg/mL. Com base na matéria seca, encontrou-se 4,80 mg de fenóis totais/g de angico-vermelho. A determinação da concentração dos fenóis totais para as soluções com os demais solventes foi realizada de forma semelhante e os resultados estão representados na Tabela 1.

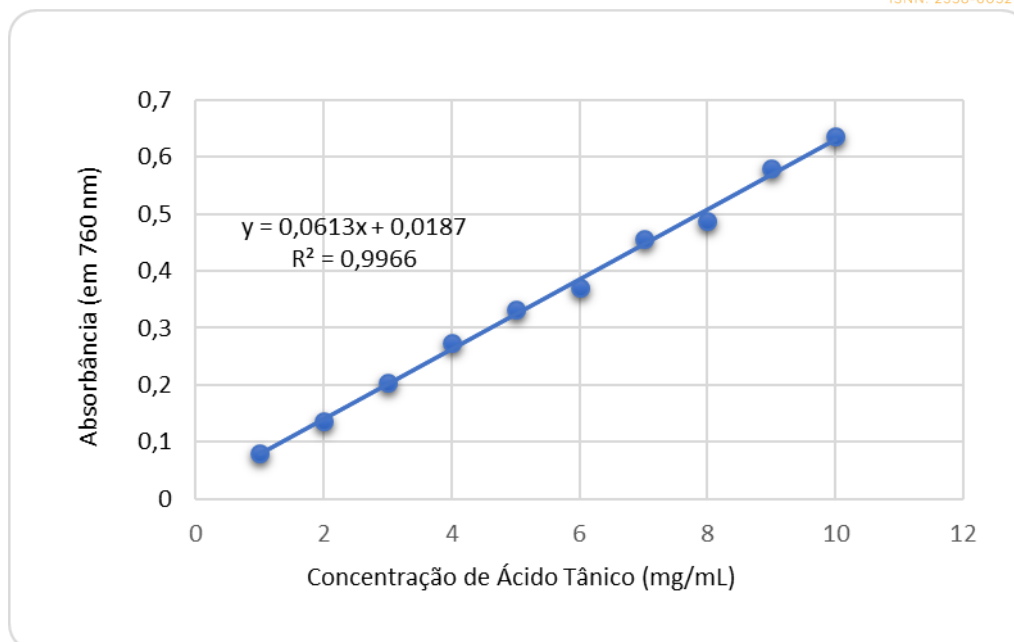


Figura 1: Curva de calibração de fenóis totais utilizando metanol como solvente para a extração.

Na quantificação dos taninos totais, utilizou-se polivinilpirrolidona (PVPP), que atua como complexante na presença de taninos, precipitando-os. Após o contato do polímero com o extrato, o sobrenadante contém apenas fenóis simples, uma vez que os taninos foram precipitados. Portanto, após a leitura do UV-vis, em 725nm, a absorbância encontrada seria referente somente aos fenóis simples da amostra. Por meio de subtração simples dos dados de fenóis simples e totais obtém-se os taninos totais. A quantificação de taninos totais foi realizada através de curvas de calibração do ácido tânico, semelhantemente à determinação de fenóis totais. Na determinação dos taninos totais do extrato de metanol, a equação da reta obtida foi $y = 0,0613 + 0,0187$, $R^2 = 0,9966$, onde x corresponde à concentração de ácido tânico e y à absorbância da amostra. A absorbância obtida do extrato foi 0,332 em 725 nm, resultando em uma concentração de $306,34 \times 10^{-3}$ mg/mL. Com base na matéria seca, encontrou-se 3,06 mg de fenóis simples/g de Angico-Vermelho. Realizou-se os mesmos procedimentos para os demais solventes (etanol, acetona e água destilada), os resultados das soluções de extração para taninos totais e fenóis totais estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Determinação de fenóis e taninos totais (mg/g) por subtração simples.

Solventes	Fenóis Totais	Fenóis Simples	Taninos Totais
Água destilada	2,26 ± 0,05	6,21 ± 0,05	-3,95 ± 0,05
Acetona	5,53 ± 0,05	4,74 ± 0,05	0,79 ± 0,05
Etanol	4,13 ± 0,05	5,24 ± 0,05	-1,10 ± 0,05
Metanol	4,80 ± 0,05	3,06 ± 0,05	1,74 ± 0,05

Com base nos dados presentes na tabela 1, observa-se a maior eficiência do álcool metílico para a extração de fenóis totais e simples e, conseqüentemente, taninos totais, quando se compara aos demais solventes. Os demais resultados correspondentes ao extrato com etanol e água apresentam-se bons ao que diz respeito aos fenóis simples, mas ineficientes para os fenóis totais. Ademais, a acetona se mostrou eficaz nas extrações de ambos fenóis (simples e totais), mas apresenta menos eficiência na extração dos taninos totais, quando comparados ao metanol.

Na determinação dos taninos hidrolisáveis utilizou-se soluções de diferentes concentrações conhecidas de ácido tânico em contato ao iodato de potássio (2,5%) para construir a curva de calibração. A curva utilizando como solvente o metanol está apresentada na figura 2. A equação da reta obtida ($y = 0,0921x - 0,006$, $R^2 = 0,9976$) foi empregada para determinar a concentração em mg/mL de ácido tânico,

onde x corresponde à concentração de ácido tânico e y à absorvância da amostra. A absorvância foi 0,086 em 550 nm, resultando em uma concentração de $0,8611 \times 10^{-3}$ mg/mL. Com base na matéria seca, encontrou-se 0,1033 mg de taninos hidrolisados/g de angico-vermelho.

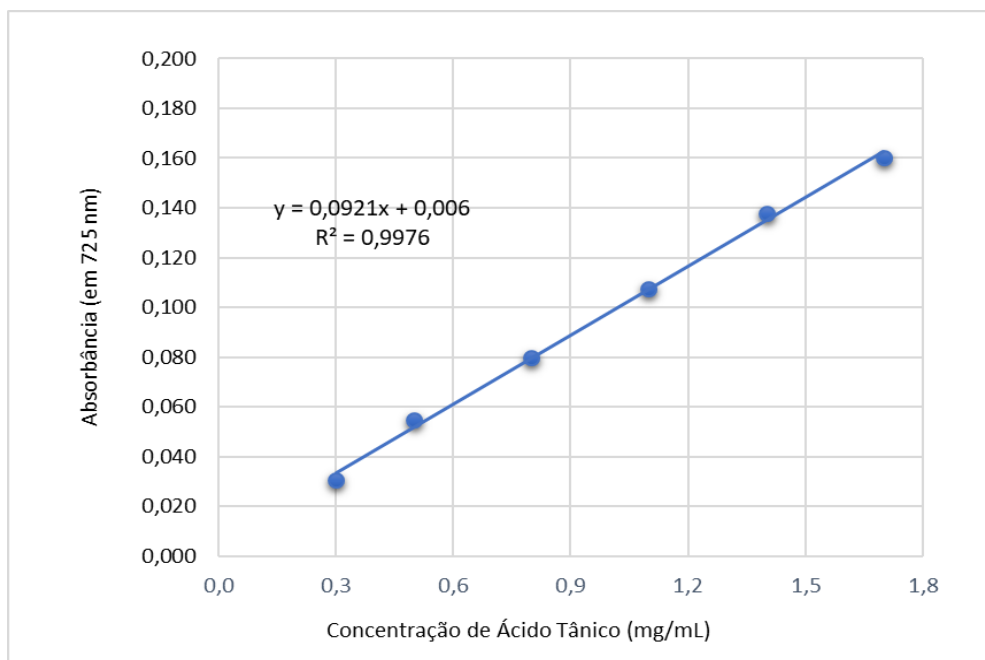


Figura 2: Curva de calibração de taninos hidrolisáveis, utilizando metanol para extração.

Para os demais solventes realizou-se o mesmo procedimento, os resultados obtidos, bem como os respectivos volumes de amostra e de iodato de potássio estão declarados na tabela 2.

Tabela 2: Resultados e volumes utilizados para a quantificação dos taninos hidrolisáveis.

Solventes	Concentração de taninos hidrolisáveis (mg/mL)	Taninos hidrolisáveis/g de matéria seca (mg/g)
Água destilada	$7,21 \times 10^{-3}$	0,072
Acetona	$6,68 \times 10^{-3}$	0,067
Metanol	$10,33 \times 10^{-3}$	0,103
Etanol	$16,16 \times 10^{-3}$	0,162

Observando a massa de taninos hidrolisáveis extraídos/g de casca de Angico-Vermelho, conclui-se que os melhores extratores foram o etanol e a metanol, com 0,1615 mg e 0,1033mg de taninos hidrolisáveis, respectivamente.

CONCLUSÕES:

Os melhores extratores de taninos totais na casca do angico-vermelho, considerando os solventes testados, foram os metanol e acetona com 4,80 mg de fenóis totais/g e 5,53 mg de fenóis totais/g, respectivamente. Para a extração de taninos hidrolisáveis, os melhores extratores foram etanol e metanol. Isso pode estar relacionado à polaridade dos solventes utilizados, proveniente da presença do grupo funcional hidroxila em sua estrutura molecular. Como o objetivo é avaliar a produção de tanino a partir de diluições homeopáticas no angico-vermelho, o metanol foi escolhido como melhor extrator.

Em estudos futuros, o tanino dessas amostras será extraído com metanol e será quantificado fenóis totais, taninos totais e taninos hidrolisáveis para observar o efeito da homeopatia na produção de tanino do angico-vermelho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- CADERNO de Homeopatia. Instruções práticas geradas por agricultores sobre o uso da homeopatia no meio rural. Viçosa: Produtores Orgânicos da Região da Vertente do Caparaó, 2009. Disponível em: <<http://www.trocasverdes.org/blog/wp-content/uploads/2012/05/Caderno-de-Homeopatia-A5-3.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2016.
- ÇAM, M.; HIŞIL, Y. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 878-885, 2010.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.
- DICKE, M.; HILKER, M. Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic and Applied Ecology*. Jena, v. 4, p. 3-14, 2003.
- HERGERT, H.L. Condensed tannins in adhesives. In: *Adhesives from renewable resources*. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 155-171.
- MELLO, J.P.C.; SANTOS, S.C. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento; Simões, C.M.O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.
- MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, vol. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- NOZELLA, E.F. Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001. 58p.
- PAES, J.B.; SANTANA, G.M.; AZEVEDO, T.K.B.; MORAIS, R.M.; CALIXTO JÚNIOR, J.T. Substâncias tânicas presentes em várias partes da árvore angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. var. *cebil* (Gris.) Alts.). *Scientia Forestalis*, Piracicaba, v. 38, n. 87, p. 441-447, 2010.
- PIZZI, A. Tannin-based adhesives. In: Pizzi, A. (Ed.). *Wood adhesives: chemistry and technology*. New York: Marcell Dekker, 1993. p.77-246.
- RIZZINI, C.T. Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: E. Blucher, 1971. 295 p.
- SARTORI, C.J. Avaliação dos teores de compostos fenólicos nas cascas de *Anadenanthera peregrina* (ANGICO-VERMELHO). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2012. 94 p.
- TAKECHI, M., et al. Structure and antiherpetic activity among tannins. *Phytochemistry*, v.24,n.10, p.2245-50, 1985.
- ZUCKER, W.V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *The American Naturalist*, Lancaster, v. 121 n. 3, p. 335-365, 1983.