



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Extração e valorização de compostos fenólicos na indústria corticeira

Maura Sofia Gonçalves Ferreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Industrial
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Maria Lúcia Almeida da Silva

Covilhã, junho de 2015

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas, é quem faz as verdadeiras perguntas”

Claude Levi-Strauss

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero deixar um agradecimento especial à minha orientadora, a Professora Doutora Maria Lúcia Silva, pelo apoio, acompanhamento, compreensão, dedicação, incentivo, conselhos, simpatia e partilha de conhecimentos que me concedeu. E ainda por todo o tempo que dispensou com o meu trabalho.

Ao Professor Doutor Arlindo C. Gomes pelas ideias, conselhos, cooperação e também pelo fornecimento da amostra utilizada no meu trabalho.

As minhas colegas de laboratório, em especial à Sofia Pombal pela disponibilidade, ajuda, amizade e companheirismo que me concedeu durante as longas horas passadas no laboratório.

Aos meus amigos, pela amizade e companheirismo, principalmente à Soraia e à Vanessa, amigadas que fiz nesta “cidade neve” e que tornaram a minha estadia por aqui mais fácil e divertida.

À minha enorme família, não só grande em número mas também em generosidade, que sempre me apoiou e incentivou a seguir em frente.

Por fim, agradeço aos mais importantes: os meus pais, por todo o amor incondicional, carinho, compreensão, ajuda, palavras de incentivo e dedicação constantemente demonstrados. Sem eles nada disto seria possível!

A todos, o meu mais sincero obrigado!

Resumo

Um dos maiores problemas ambientais da indústria corticeira é água do cozimento da cortiça, uma vez que é gerado um grande volume de efluente, que necessita ser tratado devido à sua composição complexa. O efluente do cozimento da cortiça possui na sua composição compostos fenólicos, existindo assim a possibilidade de reutilizá-lo como fonte destes compostos que podem ser utilizados como antioxidantes naturais, com vantagens económicas e qualitativas para este setor industrial.

Neste trabalho utilizaram-se várias técnicas de extração (líquido-líquido, SPE e ultra sons) de compostos fenólicos do efluente do cozimento de cortiça e identificaram-se os compostos presentes por HPLC-DAD, foi ainda determinado o teor de fenóis totais pelo método do Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelo método do DPPH, para avaliar o seu potencial uso como fonte de antioxidantes naturais. Os resultados obtidos mostram a presença de compostos fenólicos no efluente. A amostra extraída por hidrólise ácida foi a que apresentou um teor de fenóis total maior, e em relação à atividade antioxidante as amostras AFI e AFC apresentaram valores fracos, enquanto a extraída por ultra sons possui uma atividade forte e as restantes muito forte. A amostra foi ainda derivatizada para análise por GC-MS mas os resultados obtidos neste passo não foram conclusivos.

Palavras-chave

Cortiça, efluente do cozimento da cortiça, extrações, compostos fenólicos e antioxidantes

Abstract

One of the most environmental problems of cork industry is cork boiling wastewater, once that is generated a big effluent volume, that needs to be treated because of its complex composition. The effluent of cork boiling has in its composition phenolic compost, so with the possibility of reusing it these compost font that can be used as natural antioxidant, with economic and quality benefits for this industrial sector. In this work it was used several phenolic compounds extraction technics (liquid-liquid, SPE, ultrasound) of effluent cork boiling and it was identified the presented compounds for HPLC-DAD, it was further determined the total phenolic content by the method of Folin-Ciocalteu and the antioxidant activity by the method of DPPH, to evaluate its use potential as natural antioxidant font. The obtained results show the presence of phenolic compounds in effluent. The extracted sample by acid hydrolysis it was the one who shows a huge total phenolic or, and in relation with antioxidant activity the samples AFI and AFC showed weak values, while the one extracted by ultrasound have a strong activity and the rest very strong. The sample it was derivated for analysis by GC-MS but the obtained results in that step were inconclusive.

Keywords

Cork, cork boiling wastewater, extractions, phenolics compounds and antioxidants.

Índice

1	CAPÍTULO - Introdução	13
2	CAPÍTULO - Revisão bibliográfica.....	15
2.1	Caracterização da cortiça.....	16
2.2	Produção e transformação da cortiça.....	16
2.2.1	Efluente da indústria corticeira.....	19
2.2.2	Valorização do efluente da indústria corticeira como fonte de compostos fenólicos	19
2.3	Compostos fenólicos	20
2.3.1	Ácidos fenólicos.....	21
2.3.2	Flavonoides	21
2.3.3	Taninos	22
2.3.4	Aldeídos fenólicos	23
2.3.5	Compostos fenólicos, antioxidantes naturais.....	23
2.3.6	Compostos fenólicos na saúde, alimentação e indústria alimentar	24
2.3.7	Extração de compostos fenólicos	25
2.3.7.1	Extração Líquido-Líquido	25
2.3.7.2	Extração por SPE.....	25
2.3.7.3	Extração com ultra sons.....	26
2.3.8	Análise de compostos fenólicos por HPLC.....	27
2.3.9	Quantificação de fenóis totais	27
2.3.10	Avaliação da Atividade Antioxidante de compostos fenólicos	28
3	CAPÍTULO - Materiais e métodos	30
3.1	Equipamentos	31
3.2	Regentes e Solventes	34
3.3	Recolha de efluente de cozedura de cortiça	34
3.4	Limite de deteção do HPLC-DAD.....	34
3.5	Transformação de ácido gálico em ácido elágico.....	35
3.6	Desenvolvimento de métodos cromatográficos	35
3.7	Construção de curvas de calibração.....	35
3.8	Análise cromatográfica do efluente de cozedura de cortiça	36
3.9	Validação de um método para a análise de compostos fenólicos.....	36
3.10	Extração de Compostos Fenólicos da amostra.....	36
3.10.1	Extração com Acetato de etilo.....	36
3.10.2	Extração em Fase-Sólida (SPE)	39
3.10.3	Extração por Ultra sons.....	39
3.10.4	Extração por Hidrólise ácida	39
3.11	Determinação dos Fenóis Totais	39
3.12	Atividade antioxidante	40

3.13	Derivatização.....	40
4	CAPÍTULO - Resultados e discussão	42
4.1	Limite de detecção do HPLC-DAD.....	43
4.2	Transformação de ácido gálico em ácido elágico.....	43
4.3	Tempo de retenção de padrões	44
4.4	Análise dos métodos cromatográficos	45
4.5	Validação de um método para a análise de compostos fenólicos	47
4.6	Análise cromatográfica das amostras	49
4.6.1	Extração com Acetato de etilo.....	49
4.6.2	Extração por SPE.....	56
4.6.3	Extração por Ultra Sons	58
4.6.4	Hidrólise ácida	61
4.7	Determinação dos fenóis totais	64
4.8	Análise da Atividade Antioxidante.....	65
4.9	Derivatização.....	67
5	CAPÍTULO - Conclusão	69
6	CAPÍTULO - Referências bibliográficas	71
	Anexos	77

Lista de Figuras

Figura 1 - Montado de sobre no mundo	17
Figura 2 - Esquema genérico do processamento industrial da cortiça	18
Figura 3 - Fórmulas estruturais dos derivados de ácidos fenólicos	21
Figura 4 - Estrutura química dos flavonoides	22
Figura 5 - Estrutura química do flavan-3-ol e flavan-3,4-diol	22
Figura 6 - Estrutura dos aldeídos fenólicos (A - Aldeídos benzoicos e B - Aldeídos cinâmicos)	23
Figura 7 - Representação de um cartucho e um disco, usados em SPE	26
Figura 8 - Sistema de purificação de água	31
Figura 9 - Balança analítica	31
Figura 10 - Centrifuga	31
Figura 11 - Sistema SPE	31
Figura 12 - Aparelho de ultra sons	32
Figura 13 - Placa de aquecimento	32
Figura 14- Evaporador rotativo	32
Figura 15 - Aparelho de UV-VIS	32
Figura 16- Aparelho de HPLC	33
Figura 17 - Aparelho de GC-MS	33
Figura 18 - Extração de AFL de amostra com acetato de etilo	37
Figura 19 - Extração de AFC e AFI da amostra com acetato de etilo	38
Figura 20 - Reta de calibração do ácido protocatecuico.....	43
Figura 21 - Esquema de transformação de ácido gálico em ácido elágico.....	44
Figura 22 - Cromatograma a 280 nm da amostra inicial analisada pelo método 1	45
Figura 23 - Cromatograma a 280 nm da amostra inicial analisada pelo método 2	46
Figura 24 - Cromatograma a 280 nm da amostra C1 pH 4,91 analisada pelo método 1	49
Figura 25 - Cromatograma a 280 nm da amostra resíduo pH 1,77 analisada pelo método 1 ...	50
Figura 26 - Cromatograma a 280 nm da amostra C115 pH 1,77 analisada pelo método 1	51
Figura 27 - Cromatograma a 280 nm da amostra AFL analisada pelo método 1	52
Figura 28 - Cromatograma a 280 nm da amostra AFC analisada pelo método 1	53
Figura 29 - Cromatograma a 280 nm da amostra AFI analisada pelo método 1.....	55
Figura 30 - Cromatogramas a 280 nm dos filtrados das extrações por SPE analisadas pelo método 1	56
Figura 31 - Cromatogramas a 280 nm da extração por SPE analisada pelo método 1	57
Figura 32 - Cromatogramas a 280 nm dos extratos com vários solventes utilizados na extração por ultra sons, analisados pelo método 1	59
Figura 33 - Cromatogramas a 280 nm dos vários tempos utilizados na extração por ultra sons com éter dietílico, analisados pelo método 1	60
Figura 34 - Cromatogramas a 280 nm dos vários tempos utilizados na extração por ultra sons com acetato de etilo, analisados pelo método 1	60

Figura 35 - Cromatogramas a 280 nm das várias temperaturas utilizadas na extração por hidrólise ácida, analisados pelo método 1	61
Figura 36 - Cromatogramas a 280 nm da extração por hidrólise ácida a 70°C e do controlo, analisados pelo método 1	62
Figura 37 - Espectro do composto fenólico com tempo de retenção perto dos 21 min	63
Figura 38 - Espectro do composto fenólico com tempo de retenção perto dos 25 min	63
Figura 39 - Reta de calibração do ácido gálico	64
Figura 40 - Equivalentes de Ácido Gálico ($\mu\text{g}/\text{mL}$) nas amostras das diferentes extrações	65
Figura 41 - Reta de calibração do DPPH	66
Figura 42 - Reta de calibração do ácido gálico	78
Figura 43 - Reta de Calibração do ácido protocatecuico	78
Figura 44 - Reta de calibração do álcool vanílico	78
Figura 45 - Reta de calibração do aldeído protocatecuico	79
Figura 46 - Reta de calibração do ácido vanílico.....	79
Figura 47 - Reta de Calibração do ácido cafeico	79
Figura 48 - Reta de calibração da vanilina	80
Figura 49 - Reta de calibração do Ácido ferúlico	80
Figura 50 - Reta de calibração do Coniferaldeido	80
Figura 51 - Reta de calibração do Eriodictiol	81
Figura 52 - Reta de calibração da Narigenina	81

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Produção anual de cortiça	17
Tabela 2- Lista de reagentes e solventes utilizados ao longo da parte experimental	34
Tabela 3 - Tempos de retenção (T_R) de compostos fenólicos para o método 1 e 2	44
Tabela 4 -Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações	46
Tabela 5 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra analisada pelo método 2 respetivos compostos, áreas e concentrações	47
Tabela 6 - Comprimento de onda máximo (λ_{max}), tempo de retenção (T_R), retas de regressão linear e dados de precisão de compostos fenólicos	48
Tabela 7 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra C1 pH 4,91 analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações	50
Tabela 8 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra resíduo pH 1,77 analisada pelo método 1, respetivos compostos e áreas	51
Tabela 9 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra C11S pH 1,77 analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações	52
Tabela 10 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra AFL analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações.....	53
Tabela 11 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra AFC analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações.....	54
Tabela 12 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra AFI analisada pelo método 1, respetivos compostos e áreas	55
Tabela 13 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm do filtrado da extração por SPE analisada pelo método 1 e respetivos compostos, áreas e concentrações	57
Tabela 14 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da extração por SPE analisada pelo método 1 e respetivos compostos, áreas e concentrações	58
Tabela 15 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da extração por ultra sons analisada pelo método 1 e respetivos compostos, áreas e concentrações	61

Tabela 16 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da extração por hidrólise ácida analisada pelo método 1 e respectivos compostos, áreas e concentrações	63
Tabela 17 - Equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras das diferentes extrações	64
Tabela 18 - IC_{50} e índice de atividade antioxidante (AAI) nas amostras das diferentes extrações	66
Tabela 19 - Tempo de retenção (T_R), íon molecular (M^+), pico base (Pb) e outros picos de compostos fenólicos padrão derivatizados	68

Lista de Acrónimos

AAI	Índice de atividade antioxidante
AFC	Ácidos fenólicos conjugados
AFI	Ácidos fenólicos insolúveis
AFL	Ácidos fenólicos livres
APCOR	Associação portuguesa de cortiça
APIC	Associação portuguesa dos industriais de curtumes
BBD	Diamante dopado com boro
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CBO	Carência bioquímica de oxigénio
CIPR	Código internacional de práticas rolheiras
CQO	Carência química de oxigénio
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a <i>diode array detector</i>
I%	Efeito inibitório
IC ₅₀	Concentração de extrato capaz de inibir 50% DPPH
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
SPE	Extração em fase sólida
SST	Sólidos suspensos totais
TBHQ	<i>Ter-Butil-hidroquinona</i>
TCMS	Clorotrimetilsilano
UV	Radiação ultravioleta
UV-Vis	Radiação ultravioleta-visível

1 CAPÍTULO

Introdução

A produção e transformação de cortiça são um dos impulsionadores da economia portuguesa, estando cerca de 50% da produção mundial de cortiça concentrada em Portugal (APCOR 2015). A cortiça é produzida pelo sobreiro (*Quercus suber*), constituindo o revestimento exterior do seu tronco e ramos (Fortes *et al.* 2004), para a sua utilização como matéria-prima em diversas indústrias, esta sofre vários processos de transformação. Dos processos envolvidos na transformação destacam-se o descortiçamento, a estabilização e o cozimento da cortiça (APCOR 2015).

Durante a etapa de cozimento é utilizada uma grande quantidade de água, havendo conseqüentemente uma elevada produção de águas residuais. Estas águas residuais representam um problema para a indústria corticeira devido à sua complexa e variada composição, tipicamente caracterizada por altos níveis de compostos orgânicos e fenólicos (Benítez *et al.* 2008 (a))(Bernardo *et al.* 2011). Na atualidade existem técnicas de depuração que resolvem parcialmente o problema, mas envolvem custos acrescidos para esta indústria. O ideal para indústria seria a extração e reaproveitamento do conteúdo fenólico presente nas águas como um produto com valor comercial, minimizando assim os custos com as técnicas de depuração. O conteúdo fenólico poderá ser utilizado como antioxidante natural na indústria farmacêutica como anti-inflamatório, antioxidante, antimutagénico e anticancerígena e na indústria alimentar com vista a prevenir ou retardar a deterioração oxidativa (aumentando o tempo de vida útil), e manter o valor nutricional dos alimentos (Stalikas 2007) (Martínez-Valverde *et al.* 2002) (Nakatani 1997).

Neste contexto, o projeto a seguir apresentado teve em vista a extração de compostos fenólicos da água do cozimento da cortiça através de técnicas de extração líquido-líquido, SPE e ultra sons. Além das técnicas de extração foram realizadas análises por HPLC-DAD para identificação dos compostos, avaliação dos fenóis totais e da atividade antioxidante pelos métodos do Folin-Cionalteu e DPPH, respetivamente. Fez-se ainda derivatização seguida de análise por GC-MS. A presente dissertação é composta por 6 capítulos, no primeiro, a introdução, encontra-se uma contextualização do trabalho. No segundo encontra-se a revisão bibliográfica, esta reúne informação sobre a cortiça, a indústria corticeira, efluente do cozimento da cortiça, compostos fenólicos, técnicas de extração e de análise de compostos fenólicos. No capítulo três, materiais e métodos, são descritos os equipamentos, materiais e metodologias realizadas ao longo do trabalho laboratorial. No capítulo que se segue, resultados e discussão, são expostos os resultados bem como uma breve discussão dos mesmos. O capítulo cinco é o capítulo da conclusão, onde são apresentadas as principais conclusões retiradas do trabalho experimental realizado e sugestões para trabalhos futuros. No último capítulo encontram-se as referências bibliográficas utilizadas para a elaboração do trabalho.

2 CAPÍTULO

Revisão bibliográfica

2.1 Caracterização da cortiça

A cortiça é um material natural, reciclável e renovável, produzida pelo sobreiro (*Quercus suber*), constituindo o revestimento exterior do seu tronco e ramos (Fortes *et al.* 2004). Este material possui propriedades únicas e inigualáveis, das quais se destacam a impermeabilidade a líquidos e gases, elasticidade, compressividade e excelente isolamento térmico e acústico (APCOR 2015).

A composição química da cortiça ainda não é totalmente conhecida. Dada a grande variação de métodos analíticos para a determinação dos diferentes componentes da cortiça, assim como o facto das cortiças analisadas serem diferentes, a sua composição química média indicada na literatura difere de autor para autor. De facto, a constituição química deste material natural depende de vários fatores tais como a origem geográfica, as condições de solo e clima, a origem genética, a dimensão e idade da árvore, condições de crescimento, entre outros (Conde *et al.* 1998 (a))(Conde *et al.* 1999).

A constituição química das paredes celulares da cortiça pode ser dividida em dois tipos de componentes: os componentes estruturais (suberina, lenhina e polissacarídeos) e os componentes não estruturais (extratáveis).

Os componentes estruturais são a celulose, hemicelulose, lenhina, suberina e polissacáridos, que estão relacionados com as funções de estrutura e suporte. Os componentes extratáveis representam o conjunto de substâncias que podem ser dissolvidas em solventes orgânicos ou aquosos, incluindo ceras (reforço de impermeabilização), fração fenólica e polifenólica (possível efeito de proteção contra ataques por organismos biológicos) (Silva *et al.* 2005).

2.2 Produção e transformação da cortiça

Os montados de sobreiro localizam-se principalmente em países do Mediterrâneo, ocupando uma área total de cerca de 2.2 milhões de hectares. Em Portugal devido às suas condições edafoclimáticas, concentra cerca de 34% da área mundial do montado, o correspondente a cerca de 716 mil hectares, estando a maior parte localizada na zona do Alentejo. Seguindo-se Espanha, Marrocos, Argélia, Tunísia, França e Itália, como mostra a figura 1 (APCOR 2015).

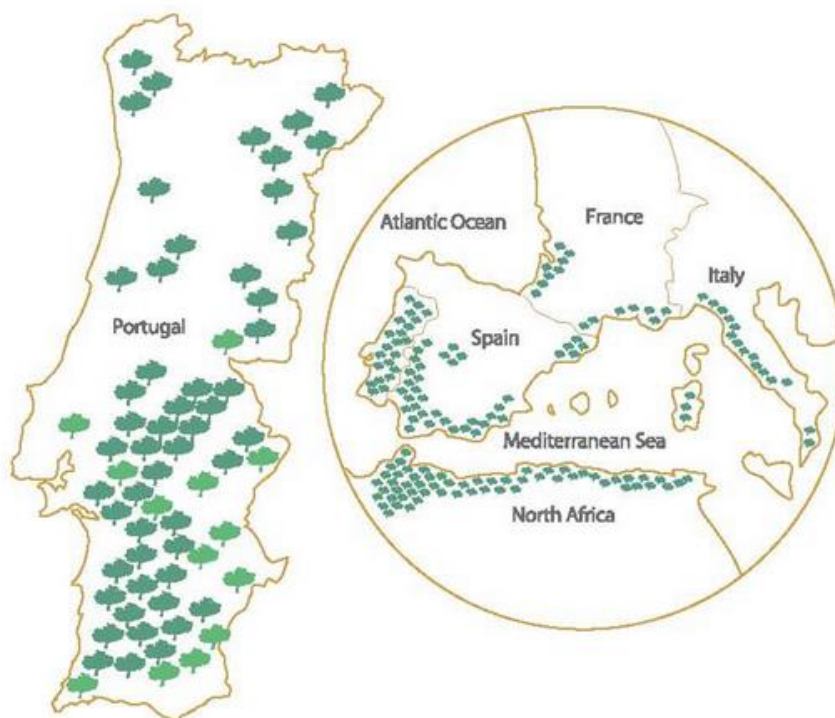


Figura 1 - Montado de sobre no mundo (APCOR 2015)

Portugal é o líder mundial na produção de cortiça, produzindo 100 000 toneladas por ano (tabela 1), o correspondente a cerca de 50% da produção mundial. A maioria da cortiça transformada em Portugal, cerca de 90%, tem como destino o mercado internacional, representando uma importante fonte de rendimentos para o nosso país, chegando em 2012 os lucros a atingir 845,7 milhões de Euros (APCOR 2015).

Tabela 1 - Produção anual de cortiça (adaptado de APCOR 2015)

País	Produção Anual (ton)
Portugal	100 000
Espanha	61 504
Marrocos	11 686
Argélia	9 915
Tunísia	6 962
Itália	6 161
França	5 200
Total	201 428

O processamento industrial da cortiça é realizado com o objetivo de maximizar o aproveitamento e a valorização da matéria-prima, o que leva a que esta indústria englobe diferentes linhas de produção e produtos (Fortes *et al.* 2004). O processo de transformação da cortiça encontra-se esquematizado genericamente na figura 2. O primeiro objetivo da transformação é produzir objetos de cortiça natural entre os quais se destacam as rolhas de cortiça e os discos de cortiça, quando a matéria-prima não é adequada para tal, os subprodutos do seu fabrico, são triturados e aglomerados, dando origem a diferentes tipos de produtos de

cortiça aglomerada, principalmente rolhas e materiais de revestimento e isolamento (Fortes *et al.* 2004).

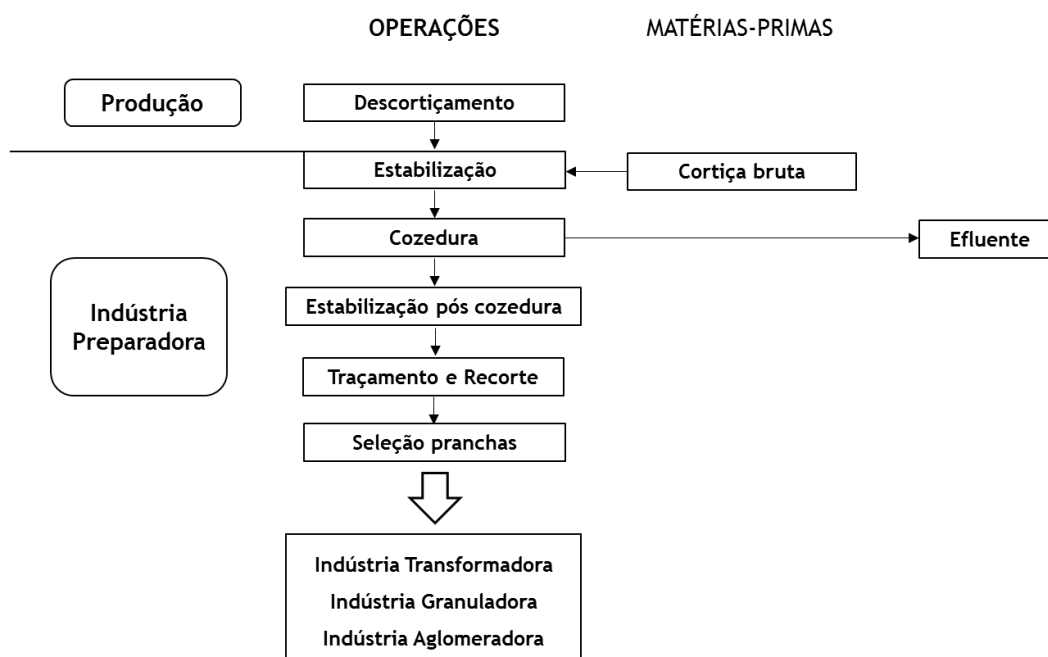


Figura 2 - Esquema genérico do processamento industrial da cortiça (Santos 2013)

O processo é iniciado com o descortiçamento, ou seja, a retirada da cortiça do sobreiro através do corte e arrancamento, esta operação é realizada no final da Primavera ou no Verão, quando a árvore se encontra fisiologicamente ativa na produção de cortiça (Fortes *et al.* 2004).

Após o descortiçamento, as pranchas de cortiça são empilhadas e secas ao ar livre durante um período de cerca de 6 meses, de acordo com as regras do Código Internacional de Práticas Rolheiras - CIPR. Neste período de repouso ocorre a maturação e estabilização da cortiça (APCOR 2015).

A etapa seguinte é o cozimento da cortiça, esta operação é realizada em descontínuo, mergulhando fardos de pranchas de cortiça em grandes tanques contendo água quente, normalmente à temperatura de 100°C, durante intervalos de tempo que rondam uma hora, e fazendo-se regular ou continuamente a renovação da água da cozedura. As dimensões dos tanques, o peso dos fardos, a duração do tratamento e o número de utilizações da água da cozedura variam de unidade industrial para unidade industrial (Fortes *et al.* 2004). Os objetivos da cozedura são limpar a cortiça, extrair-lhe as substâncias hidrossolúveis, aumentar a espessura das pranchas e assim reduzir-lhes a densidade e torna-las mais macias e elásticas (APCOR 2015).

Após o cozimento, a cortiça é seca ao ar durante duas a três semanas - estabilização pós cozedura, este período serve para aplanar as pranchas e permitir o seu repouso, só assim a cortiça obtém a consistência necessária para a sua transformação em rolhas (APCOR 2015).

Depois deste período as pranchas são cortadas conforme a espessura e tamanhos pretendidos e, mediante as características das pranchas, estas são classificadas e agrupadas em diferentes

classes (Santos 2013). Por fim, de acordo com a classificação as pranchas são encaminhadas para a indústria transformadora, indústria granuladora ou indústria aglomeradora.

Ao longo destes processos industriais são produzidos efluentes líquidos (águas de cozedura e lavagem), resíduos sólidos (aparas e pó de cortiça) e ruído (processos de despoeiramento), que trazem problemas a nível ambiental para esta indústria (Machado 2005).

2.2.1 Efluente da indústria corticeira

O efluente bruto é constituído por toda a água do processo de transformação da cortiça: água da cozedura das pranchas de cortiça; lavagem e secagem das rolhas e águas domésticas, sendo que o maior contributo para a composição do efluente é a água proveniente do cozimento da cortiça (Silva 2011).

A água do cozimento da cortiça representa um problema para este setor devido a sua complexa e variada composição, tipicamente caracterizada por altos níveis de compostos orgânicos e fenólicos (ácidos fenólicos, taninos, 2,4,6-tricloroanisol (TCA), pentaclorofenol e ácidos cinâmicos), sendo a presença de taninos de particular relevância visto apresentarem elevada toxicidade, mesmo em concentrações baixas (Benítez *et al.* 2008 (a))(Bernardo *et al.* 2011). Segundo a literatura existente, os ácidos fenólicos presentes na água de cozedura da cortiça são o gálico, o protocatecuico, o vanílico, o siríngico, o ferúlico, o cafeico e o elágico, e ainda foram identificados a vanilina, o aldeído protocatecuico, o coniferaldeído, o eriodictiol e a narigenina (Minhalma & Pinho 2001) (Conde *et al.* 1998 (b)) (Santos *et al.* 2010). Fatores ambientalmente desfavoráveis são também o baixo pH devido à extração de ácidos polifenólicos e a temperatura elevada a que estas águas são libertadas. A presença destes compostos origina valores elevados de Sólidos Suspensos Totais (SST), Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO) e Carência Química de Oxigénio (CQO), bem como o aparecimento de cheiro e cor intensos (Machado 2005).

2.2.2 Valorização do efluente da indústria corticeira como fonte de compostos fenólicos

A indústria corticeira é uma das indústrias mais importantes em Portugal, apresentando um elevado volume de produção. Por cada tonelada de cortiça cozida são utilizados 400 L de água, que tem que ser tratada antes de ser encaminhada para os cursos de água, o que representam um elevado custo para esta indústria (Silva 2011) (Mendonça *et al.* 2004). Estas águas residuais, como já foi referido anteriormente, possuem uma grande carga de compostos fenólicos, que devido a sua baixa biodegradabilidade e toxicidade significativa dificulta o tratamento convencional de águas residuais, que é baseado numa sedimentação inicial seguida de um tratamento biológico (Bernardo *et al.* 2011). O conteúdo fenólico torna-se ainda problemático para a fauna e flora do meio recetor, estando descrito o efeito letal em peixes para concentrações na ordem dos 6-7 mg/L de fenol, e a presença de polifenóis impede a circulação de fósforo e azoto, bem como a mineralização da matéria orgânica nos solos (Silva 2011).

Na literatura existem estudos realizados na ótica de degradar os compostos fenólicos das águas resultantes do cozimento da cortiça. Os estudos baseiam-se no tratamento das águas recorrendo a tratamentos químicos (e.g. oxidação química, processos fotoquímicos e precipitação química, tecnologia de membranas), biológicos (e.g. sistema de lamas ativadas e biodegradação pela flora natural) e físico-químicos (e.g. BDD (Diamante dopado com boro)) (Fernandes *et al.* 2014)(Benítez *et al.* 2006)(Heredia *et al.* 2004)(Acero *et al.* 2004)(Benítez *et al.* 2009)(Bernardo *et al.* 2011)(Benítez *et al.* 2008 (b)). No entanto, as águas residuais de cortiça são compostas por matéria orgânica de diferentes pesos moleculares e nenhum estudo relata nenhuma informação sobre a caracterização das frações de águas residuais da cortiça, em termos de composição e biodegradabilidade, o que deve ser uma questão crucial para estabelecer as condições mais adequadas para atingir o objetivo de obter um efluente mais facilmente biodegradável, ou reutilizável, no processo, em simultâneo com a recuperação de alguns dos seus componentes (Geraldés *et al.* 2009).

A Associação Portuguesa de Cortiça (APCOR) e a Associação Portuguesa dos Industriais de Curtumes (APIC) criaram um programa denominado Reciclar, que tem como principais objetivos tratar e valorizar os resíduos provenientes da indústria corticeira, de modo a garantir uma correta gestão ambiental dos efluentes gerados, sem geração de lamas e aliciando a indústria para o cumprimento da legislação ambiental em vigor (Diretiva do Conselho 91/271/CEE, 1991), e transformando os resíduos num produto subsidiário, com vista à sua aplicação por parte da indústria dos curtumes. O objetivo é obter um concentrado do conteúdo fenólico destas águas, através de técnicas de separação por membranas (e.g. nanofiltração ou ultrafiltração), que será modificado recorrendo a técnicas químicas e biológicas para que possa ser aplicado na indústria de curtumes, substituindo, assim, os taninos comerciais adquiridos por importação (APCOR 2015) (Benítez *et al.* 2008) (Teixeira *et al.* 2009).

O reaproveitamento do conteúdo fenólico presente nas águas de cozedura das pranchas de cortiça permite à indústria corticeira minimizar os custos do tratamento de efluentes, obter um produto com valor comercial representando uma fonte de receita e melhorar a eficácia do tratamento biológico. No caso da indústria dos curtumes produzirá um produto totalmente nacional e de elevada qualidade e aumentará a competitividade de ambos os sectores (Silva 2011).

2.3 Compostos fenólicos

A estrutura base de um composto fenólico é composta por um anel aromático ao qual pode estar ligado um grupo hidroxilo (fenóis) ou vários (polifenóis), originando uma grande diversidade de compostos, incluindo moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (Angelo & Jorge 2007). Estes compostos encontram-se amplamente distribuídos na natureza, em microorganismos e vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (Escarpa & Gonzalez 2001) (Angelo & Jorge 2007). As plantas são capazes de sintetizar uma grande diversidade de compostos com baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários, que podem apresentar um papel essencial no metabolismo vegetal

(Escarpa & Gonzalez 2001). Os compostos fenólicos que as plantas sintetizam são usados por estas para se protegerem contra condições adversas, tais como, lesões dos tecidos, infecções e radiação UV, além disso, contribuem com o aroma, adstringência, cor e estabilidade oxidativa das mesmas (Naczki & Shahidi 2004) (Angelo & Jorge 2007).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em várias classes, destacando-se os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, como antioxidantes fenólicos mais disseminados na natureza (Angelo & Jorge 2007).

2.3.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos possuem na sua estrutura um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupo hidroxilo e/ou metoxilo. Estes ácidos são divididos em dois grupos, os ácidos hidroxibenzóicos e seus derivados (com estrutura comum C6-C1) e os ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, com estrutura base C6-C3 (Angelo & Jorge 2007) (Stalikas 2007). Na figura 3 são apresentados os derivados mais comuns dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.

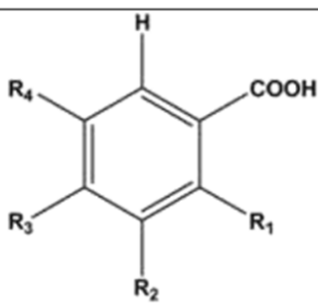
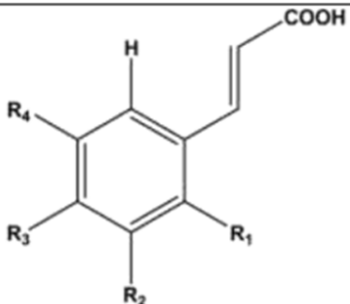
Ácidos Hidroxibenzóicos	Estruturas mais comuns				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
	Ácido benzóico	H	H	H	H
	Ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H
	Ácido gálico	H	OH	OH	OH
	Ácido protocatecuico	H	OH	OH	H
	Ácido siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácidos Hidroxicinâmicos					
	Ácido cinâmico	H	H	H	H
	Ácido <i>o</i> -cumárico	OH	H	H	H
	Ácido ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
	Ácido sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Ácido cafeico	H	OH	OH	H

Figura 3 - Fórmulas estruturais dos derivados de ácidos fenólicos (Silva 2011)

2.3.2 Flavonoides

Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular, com 15 átomos de carbono na sua estrutura base, organizados na configuração C6-C3-C6, formada por dois anéis aromáticos (A e B) ligados entre si por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado pirano (C) (figura 4). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (Angelo & Jorge, 2007) (Stalikas 2007).

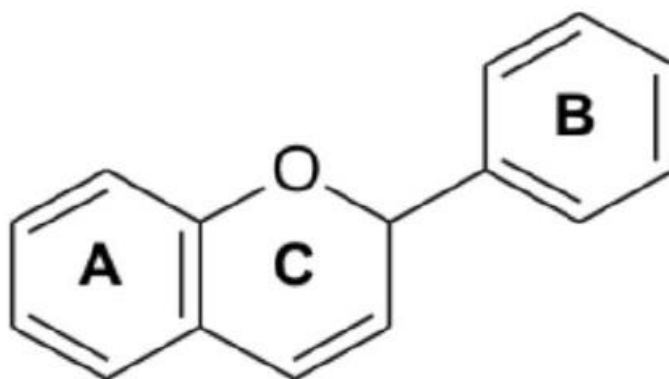


Figura 4 - Estrutura química dos flavonoides (Angelo & Jorge 2007)

Os flavonoides dividem-se em flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas, de acordo com as substituições que ocorrem nos anéis (Angelo & Jorge 2007) (Stalikas 2007).

2.3.3 Taninos

Os taninos possuem peso molecular relativamente alto, tendo em conta a sua estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Angelo & Jorge 2007).

Os taninos condensados são oligómeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina) (figura 5), produtos do metabolismo do fenilpropanol, esta classe de taninos é denominada de protoantocianidinas, provavelmente pelo facto de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e estereoquímica dos seus compostos (Angelo & Jorge 2007).

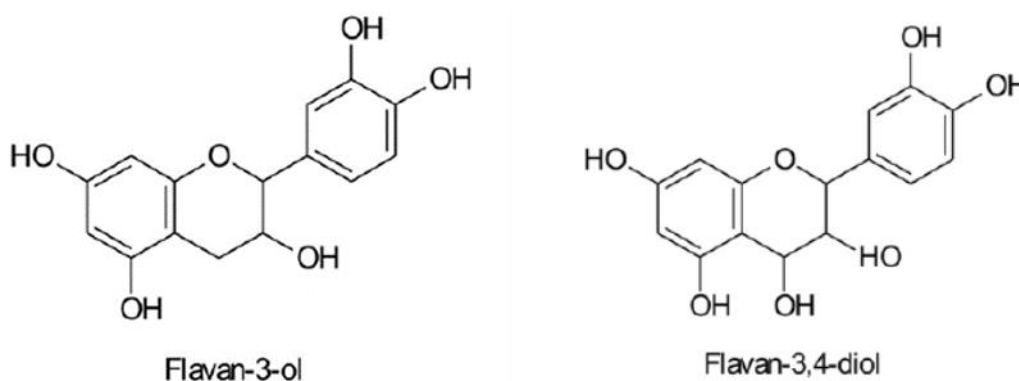


Figura 5 - Estrutura química do flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (Angelo & Jorge 2007)

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e elágico glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilos do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos existem em maior número que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexa-hidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos (Angelo & Jorge 2007).

2.3.4 Aldeídos fenólicos

Para além ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, ainda existem outros compostos fenólicos, os aldeídos fenólicos.

A estrutura química de um aldeído fenólico caracteriza-se pela presença de um grupo H—C=O, ligado a um radical alifático ou aromático. Estes compostos podem-se encontrar na forma livre ou ligados aos constituintes da parede celular, designadamente à lenhina (Silva 2012).

Os aldeídos fenólicos podem ser classificados segundo dois critérios: pelo número de átomos de carbono, em benzóicos (C6-C1) e em cinâmicos (C6-C3) (figura 6), ou pelo número de grupos metoxilo em guaiacilo (monometoxilados) e em siringilo (bimetoxilados) (Silva 2012).



Aldeídos benzóicos (A)	R ₁	R ₂
Vanilina	OCH ₃	H
Siringaldeído	OCH ₃	OCH ₃
Aldeídos cinâmicos (B)		
Coniferaldeído	OCH ₃	H
Sinapaldeído	OCH ₃	OCH ₃

Figura 6 - Estrutura dos aldeídos fenólicos (A - Aldeídos benzoicos e B - Aldeídos cinâmicos) (Silva 2012)

2.3.5 Compostos fenólicos, antioxidantes naturais

Os compostos fenólicos são antioxidantes naturais, que na atualidade são utilizados preferencialmente em detrimento dos artificiais (*e.g.* butil-hidroxi-anisol - BHA, butil-hidroxi-tolueno - BHT e butil-hidroquinona-terciária - TBHQ) devido à possibilidade de estes causarem efeitos indesejáveis em enzimas e órgãos humanos (Martínez-Valverde *et al.* 2002).

Em sistemas biológicos, um antioxidante é uma substância com capacidade de reduzir eficazmente um pro-oxidante, com formação simultânea de produtos com baixo ou nenhum nível de toxicidade. As substâncias pró-oxidantes, por sua vez, apresentam capacidade de induzir danos oxidativos em diferentes alvos biológicos (*e.g.* ácidos nucleicos, lípidos e proteínas) (Magalhães *et al.* 2008).

Os antioxidantes podem ter ação direta na neutralização das ações dos radicais livres ou participar indiretamente nos sistemas enzimáticos com essa função (Shami & Moreira 2004) (Moreira & Mancini-Filho 2004).

Devido às suas propriedades os antioxidantes são vulgarmente utilizados na indústria alimentar (*e.g.* óleos, gorduras e alimentos processados), com vista a prevenir ou retardar a deterioração oxidativa (aumentando o tempo de vida útil), e manter o valor nutricional dos alimentos (Martínez-Valverde *et al.* 2002) (Nakatani 1997).

Os antioxidantes apresentam ainda grande interesse para os bioquímicos e para a área da saúde, pois podem contribuir para a proteção do organismo contra os danos causados pelas espécies reativas, bem como em doenças degenerativas e inflamatórias (Boots *et al.* 2008).

2.3.6 Compostos fenólicos na saúde, alimentação e indústria alimentar

O interesse pelos compostos fenólicos tem vindo a aumentar nas últimas décadas, devido aos efeitos benéficos na prevenção ou redução da incidência de várias doenças (Benavente-García *et al.* 2000). Os compostos fenólicos possuem propriedades farmacológicas com ação anti-inflamatória, antioxidante, antimutagénica e anticancerígena (Stalikas 2007). A atividade anticancerígena dos compostos fenólicos tem sido relacionada com a inibição de cancro no cólon, esófago, pulmão, fígado, mama e pele. Outros exemplos de doenças prevenidas ou cujo risco de incidência é diminuído são as doenças cardiovasculares, diabetes, doenças coronárias, doenças crónicas dos pulmões, fibroses pulmonares, arteriosclerose e envelhecimento precoce (Silva 2011).

A atividade biológica dos compostos fenólicos depende primariamente da sua absorção e metabolização, que, por sua vez, está relacionada com a estrutura química, conjugação com outras substâncias, grau de polimerização e solubilidade. Portanto, a grande diversidade estrutural dos compostos fenólicos dificulta enormemente o estudo da biodisponibilidade e dos efeitos fisiológicos (Mira *et al.* 2008).

Moureu e Dufraise estudaram as propriedades de vários produtos químicos com potencial para prevenir a oxidação de gorduras e de alimentos com elevado teor de lípidos, tendo analisado a atividade antioxidante de mais de 500 compostos. Esta investigação despoletou uma procura de aditivos químicos com capacidades para controlarem a oxidação que ocorre em praticamente todas as etapas da produção de alimentos com gordura. Contudo, apesar de terem sido testados centenas de compostos para inibir a deterioração oxidativa, apenas alguns dos que apresentaram atividade elevada podem ser adicionados em produtos para consumo humano (Silva 2011).

Quando se trata da aplicação de antioxidantes na indústria alimentar, existem algumas propriedades que têm de ser consideradas, tais como: eficácia a baixas concentrações (abaixo de 0,02% w/w), porque a altas concentrações podem atuar como pró-oxidantes ou apresentar outro tipo de toxicidade; ausência de efeitos indesejáveis nas características sensoriais (*e.g.* cor, odor e sabor) e noutras características do alimento (*e.g.* textura e viscosidade); compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de fabrico e armazenamento (especialmente sob temperaturas elevadas), e os compostos dos seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos (Silva 2011). Na escolha de um antioxidante é ainda necessário ter em conta outros fatores, como a legislação em vigor, o custo inerente e a preferência do consumidor por antioxidantes naturais (Broinizi *et al.* 2007).

2.3.7 Extração de compostos fenólicos

Existem várias técnicas para a extração de compostos fenólicos de origem natural, neste trabalho utilizou-se a extração líquido-líquido, a extração em fase sólida (SPE) e a extração com ultra sons, para extrair compostos fenólicos do efluente da cortiça.

Nas extrações os solventes mais utilizados são os que evaporam a temperaturas baixas, que possuam pontos de ebulição baixos, que não sejam tóxicos nem inflamáveis e quimicamente neutros. O metanol, o etanol, a acetona, o acetato de etilo e as suas misturas com água, são exemplos de bons solventes. Os solventes não devem influenciar negativamente a estabilidade e instrumentação das substâncias analisadas (Arceusz *et al.* 2013).

2.3.7.1 Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e ainda tem sido muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias (Queiroz *et al.* 2001).

Na extração líquido-líquido a amostra líquida é colocada em contacto com um solvente imiscível, originando a partição da amostra em duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) (Abbas *et al.* 2014) (Queiroz *et al.* 2001). O coeficiente de partição dos analitos e a relação entre os volumes das duas fases imiscíveis, juntamente com a presença/ausência de espécies com características químicas semelhantes às dos analitos alvo, determinam a eficiência da etapa de pré-concentração e da etapa de limpeza (Abbas *et al.* 2014).

A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (Queiroz *et al.* 2001).

A extração líquido-líquido apresenta a vantagem de ser simples (na configuração mais comum usa-se uma ampola de decantação ou tubos de centrífuga) e poder utilizar um grande número de solventes puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade (Queiroz *et al.* 2001).

As desvantagens desta técnica são: as amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda de analito; as impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando o uso de solventes ultrapuros; pode ocorrer a formação de emulsões, o que resulta em grande consumo de tempo; são necessários grandes volumes de amostras e de solventes, gerando problemas de eliminação dos resíduos; alguns solventes orgânicos são tóxicos; decomposição de compostos instáveis termicamente, na etapa de pré-concentração; o processo é suscetível a erros (Queiroz *et al.* 2001).

2.3.7.2 Extração por SPE

A SPE é técnica mais utilizada para a pré-concentração e para purificar compostos fenólicos antes da separação por HPLC (Dvořáková *et al.* 2007).

Esta técnica apresenta várias vantagens em relação à extração líquido-líquido, entre elas destacam-se a rapidez e simplicidade em modo *off-line*, a não formação de emulsão, a segurança em relação a amostras perigosas, os baixos custos e a flexibilidade (Junker-Buchheit & Witzenbacher 1996).

A SPE usa adsorventes (fases sólidas) inseridas em cartuchos, em forma de barril ou seringa, tipicamente os cartuchos são formados por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de adsorventes, com 40-60 μm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois discos (Queiroz *et al.* 2001), como mostra a figura 7. Existem uma grande variedade de adsorventes que podem ser utilizados, desde fases de sílica modificadas de C_8 a C_{18} (fases reversas), resinas poliméricas, alumina, carvão, sílica e ciano. Dependendo do adsorvente, a SPE pode ser dividida em três tipos SPE em fase reversa quando o adsorvente é menos polar que o solvente de eluição; em fase normal quando o solvente é menos polar que o adsorvente e a troca iônica (Queiroz *et al.* 2001).

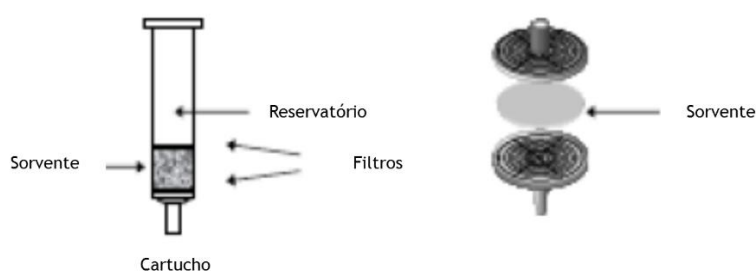


Figura 7 - Representação de um cartucho e um disco, usados em SPE (Snyder *et al.* 1997)

O procedimento da SPE contém 5 etapas: ativação do adsorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; condicionamento do adsorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; eluição e coleção do analito (Queiroz *et al.* 2001).

2.3.7.3 Extração com ultra sons

A extração assistida por ultra sons baseia-se na ação de vibrações ultra sônicas direcionadas a uma amostra, o que leva a formação, crescimento e rebentamento de bolhas (tamanho micro) dentro da fase líquida e assim aumentar a eficácia da penetração da amostra pelo solvente (Arceusz *et al.* 2013)(Pasrija & Anandharamakrishnan 2015).

A cavitação ultra sônica cria forças de cisalhamento que quebram as paredes celulares mecanicamente, melhorando a transferência de material, enquanto os sons de alta frequência perturbam a parede celular da planta amentando, assim, a penetração do solvente no material vegetal e facilita a liberação de analitos (Szydłowska-Czerniak *et al.* 2015).

Este método é caracterizado pela simplicidade e pela uma elevada velocidade. É considerado o método mais simples de se realizar em laboratório. O processo de extração é influenciado pelo tipo de solvente, tamanho da amostra, pH do extrato, temperatura, pressão, duração e a amplitude da sonificação (Arceusz *et al.* 2013).

As vantagens da extração por ultra sons são a utilização de procedimentos mais rápido e menos dispendioso que podem operar à temperatura ambiente, à pressão atmosférica e reduzem o uso de grandes quantidades de solventes e amostras, e assim contribui para a execução dos princípios verdes em química analítica (Szydłowska-Czerniak *et al.* 2015). Outra das vantagens

é a possibilidade de realizar várias extrações em simultâneo, em relativamente pouco tempo (Arceusz et al. 2013).

O uso da técnica de ultra sons para a extração de polifenóis aumenta a eficiência do processo e contorna a degradação destes (Pasrija & Anandharamakrishnan 2015).

2.3.8 Análise de compostos fenólicos por HPLC

O método cromatográfico mais utilizado na análise de compostos fenólicos é o HPLC. Neste método são utilizados diferentes tipos de coluna, fases móveis, temperaturas de coluna e a taxa de fluxo da fase móvel. Água, metanol e acetone nitrilo são os componentes mais comuns da fase móvel, por vezes é necessário adicionar modificadores, que facilitam a resolução dos componentes. Os modificadores mais utilizados são o ácido fórmico, o acetato de amónio e ácido acético. O tempo de análise não é um parâmetro fixo, pois a taxa de fluxo da fase móvel interfere neste parâmetro (Arceusz et al. 2013).

O procedimento do método baseia-se na introdução da amostra no injetor, que em seguida é arrastada pela fase móvel através da coluna, ficando os componentes da amostra com maior afinidade para a fase estacionária, contida dentro da coluna, mais tempo retidos, enquanto os que têm menor afinidade eluem mais cedo da coluna. Depois de saírem da coluna os compostos já separados chegam ao detetor, onde é registada a sua passagem através de um sinal elétrico representativo de uma propriedade em relação à qual o detetor é específico. A eluição pode ser feita mantendo sempre o mesmo eluente (eluição isocrática), ou variando a composição do eluente com o tempo (eluição com gradientes). A otimização deste método é alcançada pela alteração da percentagem dos eluentes na eluição por gradiente e pela alteração do tempo em que decorre o varrimento total dos compostos na coluna de forma a conseguir-se visualizar os picos dos compostos bem separados e definidos.

O detetor mais utilizado é o *diode array* que pode oscilar num comprimento de onda entre 190 a 800 nm, no caso da deteção dos compostos fenólicos o comprimento de onda deve oscilar entre os 200 e 600 nm, uma vez que os ácidos fenólicos têm um máximo de absorção a 280 nm, os estilbenos a 320 nm e as antocianinas a 520 nm. No caso das flavononas, estas mostram um forte pico de absorção na gama de 270-295 nm (banda II) e um ombro a 320 nm (banda I), os flavones mostram dois picos de absorvância fortes a 280 (banda II) e 320-360 (banda I) (González-Molina et al. 2010).

Atualmente a técnica de HPLC acoplado a um detetor *diode array* e com espectroscopia de massa provou ser a melhor ferramenta na separação e identificação de compostos fenólicos em vários produtos alimentares. Esta técnica fornece uma grande quantidade de informação qualitativa e permite identificar inequivocamente o composto (Spínola et al. 2015).

2.3.9 Quantificação de fenóis totais

A quantificação de compostos fenólicos totais presentes em amostras é realizada através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu, este método não é específico, pois determina todos os

fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas ou naturalmente presentes e que podem assim interferir com os resultados obtidos (Silva 2011).

Neste método é utilizado o reagente Folin-Ciocalteu ou reagente fenol de Folin, que é constituído por uma mistura de fofomolibdato e fosfotungstato (designados em conjunto por ácido fosfomolibdicotungstico) (Everette et al. 2010).

No método Folin-Ciocalteu, os compostos fenólicos presentes na amostra vão reduzir o molibdénio e o tungsténio que se encontram no estado de oxidação +6 (com a cor amarela), produzindo um complexo de coloração azul que absorve a 765 nm, passando a amarelo após reação e cuja coloração permite a medição colorimétrica e a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não precisam necessariamente de possuir natureza fenólica. A reação ocorre em meio alcalino que se obtém por adição de uma solução de carbonato de sódio (2 M) (Everette et al. 2010) (Silva 2011).

2.3.10 Avaliação da Atividade Antioxidante de compostos fenólicos

Como já referido anteriormente, a estrutura dos compostos fenólicos inclui um anel aromático com um ou mais substituintes hidróxilo, e vão desde simples moléculas fenólicas a compostos altamente polimerizados. A estrutura destes compostos é um fator determinante na eliminação de um radical e na atividade quelante de um metal, e isso é referido com relação atividade-estrutura (Scherer & Godoy 2009).

O ensaio oxidativo com DPPH é usado em todo o mundo na quantificação da capacidade de captação de radicais livres. A capacidade de compostos biológicos para neutralizar o radical DPPH, pode ser expresso como a sua atividade antioxidante (Scherer & Godoy 2009) (Deng et al. 2011).

O DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) é um tipo de radical orgânico estável espectrofotometricamente, mas sensível à luz, ao oxigénio, ao pH e a alguns solventes (Deng et al. 2011) (Scherer & Godoy 2009). A solução de DPPH é roxa escura com um pico de absorção a 517 nm, que desaparece com a presença do captador de radicais do sistema reativo, e quando o eletrão ímpar do azoto no DPPH se encontra emparelhado. A taxa reativa e a capacidade do captador de radicais dependerão da taxa e do valor do pico do desaparecimento do DPPH (Scherer & Godoy 2009) (Pourmorad et al. 2006).

Em comparação com outros métodos, o ensaio de DPPH tem muitas vantagens, tais como uma boa estabilidade, sensibilidade, é credível, simples e viável (Pourmorad et al. 2006).

Apesar do uso mundial do método do DPPH a falta de normalização dos resultados torna difícil comparar a atividade antioxidante de diferentes extratos de plantas, bem como de compostos puros. A maioria dos estudos expressa os resultados como IC₅₀, definido como a quantidade de antioxidante necessário para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH. No entanto, para extratos de plantas ou compostos puros, os valores de IC₅₀ alteram-se de acordo com a concentração final de DPPH utilizado (Scherer & Godoy 2009) (Pourmorad et al. 2006). Para evitar este problema, Scherer & Godoy 2009 propuseram uma nova fórmula de calcular o índice

de atividade antioxidante, utilizando o método do DPPH, onde a atividade inibitória é calculada pela equação 1:

$$I\% = \left[\frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

onde Abs_0 é a absorvância do branco e Abs_1 é a absorvância na presença do composto, em diferentes concentrações.

A IC_{50} (concentração de extrato capaz de inibir 50% de DPPH) é calculada graficamente com a concentração do extrato *versus* o correspondente efeito inibitório (I%). A atividade antioxidante é expressa como o índice de atividade antioxidante (AAI), calculado pela equação 2:

$$AAI = \frac{\text{Concentração final de DPPH } (\mu\text{g. mL}^{-1})}{IC_{50}(\mu\text{g. mL}^{-1})} \quad (2)$$

Assim, a AAI é calculada considerando a concentração de DPPH e a concentração do composto testado na reação, resultando numa constante para cada concentração dos extratos. Para cada extrato da planta considera-se possuir atividade antioxidante fraca quando $AAI < 0,5$; moderada quando AAI entre 0,5 e 1,0; forte quando AAI entre 1,0 e 2,0; e muito forte quando $AAI > 2,0$.

3 CAPÍTULO

Materiais e métodos

3.1 Equipamentos

Sistema de purificação de água (Figura 8)

A água desionizada utilizada ao longo deste trabalho tem uma resistividade de $12,8 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$ a temperatura de $14,3^\circ\text{C}$ e foi produzida num sistema de purificação de água Integral 3 da Millipore.



Figura 8 - Sistema de purificação de água

Balança analítica (Figura 9)

A balança usada neste trabalho para a pesagem das massas foi uma Mettler AE260, DeltaRange®.



Figura 9 - Balança analítica

Centrifuga (Figura 10)

A centrífuga utilizada nas centrifugações realizadas ao longo do trabalho é de marca sigma, modelo 2-16P (VIDROLAB 2).



Figura 10 - Centrifuga

Sistema de SPE (Figura 11)

A extração em fase-sólida foi realizada num sistema Supelco VISIREP™DL com uma bomba de vácuo e cartuchos Supelco discovery DPA-65 de capacidade 3 mL.



Figura 11 - Sistema SPE

Ultra sons (Figura 12)

A extração por ultra sons foi realizada em um aparelho ULTASONS H-D, P-Selecta®.



Figura 12 - Aparelho de ultra sons

Placa de aquecimento (Figura 13)

Placa de aquecimento MIRAK™ com controlo de temperatura e agitação magnética.



Figura 13 - Placa de aquecimento

Evaporador rotativo (Figura 14)

O evaporador rotativo utilizado na evaporação dos solventes possui uma bomba Buchi VAC V-500®, um controlador Buchi Vacuum Controllern V-850® e um banho Buchi 461 Water Bath®.



Figura 14- Evaporador rotativo

Espectrofotómetro de ultra-violeta (UV-VIS) (Figura 15)

O espectrofotómetro de UV-VIS utilizado para a medição das absorvancias é de marca Thermo Scientific, modelo Evolution 160.



Figura 15 - Aparelho de UV-VIS

Aparelho de HPLC-DAD (Figura 16)

O equipamento utilizado nas análises cromatográficas foi o VWR-Hitachi Elite LabChrom composto por 3 módulos: o forno (L-2300), a bomba (L-2130) e o detetor de rede díodos (L-2455). Foi ainda usada uma coluna de fase reversa LiChropart® RP-18, (250 × 4 mm) com um diâmetro de partícula de 5 µm (Merk).



Figura 16- Aparelho de HPLC

Aparelho de GC-MS (Figura 17)

O aparelho de GC utilizado foi um Agilent® Technologies 7890A GC-system equipado com uma coluna capilar DB5-MS, 30m x 0,25mm c.d., com filme de polimetilsiloxano (J.& W. LTM coluna module) de espessura 0,25µm, acoplado a um Agilent® Technologies 5975C, Inert XL MSD com detetor triple-Axis, operando nas condições acima referidas e ainda com uma voltagem de

ionização de 70 eV e com a fonte iónica a uma temperatura de 230°C.



Figura 17 - Aparelho de GC-MS

3.2 Regentes e Solventes

Tabela 2- Lista de reagentes e solventes utilizados ao longo da parte experimental

Reagentes/ Solventes	Fórmula/Abreviatura	Marca
Acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	Carlo Erba
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	Merck
Ácido acético	CH ₃ OOH	Fulka
Ácido Clorídrico (37%)	HCl	Pronalab
Carbonato de sódio	Na ₂ CO ₃	Pronalab
Cloroformio	CHCl ₃	Carlo Erba
Clorotrimetilsilano	TMCS	Arcos
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	Sigma - Aldrich
Éter dietílico	C ₄ H ₁₀ O	Panreac
Folin-Ciocalteu 2M	-	Sigma
Hidróxido de sódio	NaOH	Pronalab
Metanol	CH ₄ O	Carlo Erba
Metanol Chromanorm	CH ₄ O	VWR
N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida	BSTFA	Supelco
Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	Panreac
Piridina	C ₅ H ₅ N	Merck
Tetrahidrofurano	C ₄ H ₈ O	-

3.3 Recolha de efluente de cozedura de cortiça

A amostra utilizada ao longo deste trabalho foi o efluente de cozedura de cortiça, recolhido no dia 24 de Outubro de 2014 à saída de um tanque de equalização e homogeneização de uma indústria corticeira do distrito de Portalegre (Portugal). A amostra foi conservada a 4°C, até ser utilizada.

3.4 Limite de deteção do HPLC-DAD

Para determinar o limite de deteção do HPLC-DAD foram preparadas soluções de ácido protocatecuico de diferentes concentrações: 0,008; 0,016; 0,032; 0,063; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 e 10 µg/mL e analisadas por HPLC-DAD pelo método abaixo descrito. As análises das concentrações de 0,125 a 10 µg/mL, foram realizadas em triplicado.

As condições de eluição também foram adaptadas das do método do García & Gándara 2004, e consistiram no seguinte: dos 0 aos 5 min A:B (90:10); dos 5 aos 35 min A:B (50:50); dos 35 aos 50 min A:B (50:50); dos 50 aos 55 min A:B (90:10) e dos 55 aos 60 min A:B (90:10), onde o A é a água destilada e o B o metanol acidificados com 0,1% de ácido acético. Na eluição foi utilizada

uma temperatura de 25°C e um fluxo de 1 mL/min. A detecção foi realizada a um comprimento de onda de 220 a 600 nm.

3.5 Transformação de ácido gálico em ácido elágico

Com o objetivo de produzir ácido elágico a partir de ácido gálico, misturou-se num frasco 1 mg de ácido elágico e 10 mL de água destilada e deixou-se a reagir a temperatura ambiente, com agitação permanente durante 4 e 8 dias.

3.6 Desenvolvimento de métodos cromatográficos

Para determinar os tempos de retenção dos compostos fenólicos nas análises por HPLC-DAD, foram preparadas soluções padrão de ácido gálico, ácido protocatecuico, álcool vanílico, aldeído protocatecuico, ácido cafeico, ácido elágico, ácido vanílico, vanilina, coniferaldeído, rutina, aldeído salicílico, ácido salicílico, quercetina, luteolina, campeferol, apigenina, fenol, ácido benzoico, aldeído cinâmico, ácido cinâmico, ácido ferúlico, naringenina e eriodictiol, com concentrações conhecidas. As soluções foram preparadas em 50:50 (v/v) MeOH:H₂O e foram injetados 20 µL de cada solução no HPLC-DAD e analisados usando os dois métodos, descritos em seguida.

Todas as amostras injetadas no HPLC-DAD foram previamente filtradas com filtro de poro 0,45 µm, para garantir que as partículas em suspensão não entram no sistema.

No método 1, a eluição foi concretizada com um fluxo de 0,8 mL/min e uma temperatura de 40°C. Foi utilizado um sistema binário de solventes com as seguintes condições: dos 0 aos 20 min A:B (80:20); dos 20 aos 40 min A:B (50:50); dos 40 aos 50 min A:B (80:20) e dos 50 aos 60 min A:B (80:20), onde (A) é a água destilada e (B) é o metanol Chromanorm acidificados com 0,1% de ácido acético para garantir a total protonação dos compostos em estudo. A detecção foi realizada num intervalo de comprimento de onda de 220 a 600 nm.

No método 2, os solventes utilizados foram o (A) água destilada e o (B) acetonitrilo acidificados com 0,1% de ácido acético, seguindo as condições descritas: dos 0 aos 3 min A:B (90:10); dos 3 aos 10 min A:B (80:20); dos 10 aos 30 min A:B (70:30); dos 30 aos 35 min A:B (65:35); dos 35 aos 50 A:B (40:60); dos 50 aos 60 min A:B (90:10) e dos 60 aos 70 min A:B (90:10). A Eluição foi efetuada com um fluxo de 0,5 mL/min e a uma temperatura de 25°C. A detecção foi efetivada num intervalo de comprimento de onda de 200 a 600nm.

3.7 Construção de curvas de calibração

Para construir curvas de calibração de ácido gálico, coniferaldeído, eriodictiol, ácido cafeico, ácido ferúlico e naringenina, foram preparadas soluções de concentrações conhecidas destes padrões, injetadas no HPLC-DAD e analisadas pelo método 1.

3.8 Análise cromatográfica do efluente de cozedura de cortiça

De forma a escolher o método mais adequado na análise cromatográfica da amostra, foi filtrada uma pequena quantidade de amostra com filtro de poro 0,45 µm e 20 µL foram injetados no HPLC-DAD e analisadas pelo método 1 e 2.

3.9 Validação de um método para a análise de compostos fenólicos (adaptado de Plazonić *et al.* 2009)

Para validar o método de análise de compostos fenólicos foram preparadas soluções com 50 µg/mL de cada padrão: o ácido protocatecuico, o aldeído protocatecuico, o álcool vanílico, o ácido vanílico e a vanilina. A partir destes padrões foi realizada uma mistura de concentração de 10 µg/mL e através de diluições sucessivas foram preparadas misturas de 1,25; 2,50 e 5,00 µg/mL.

As misturas de diferentes concentrações foram analisadas pelo método 1. Esta foram injetadas em três dias consecutivos e a análise foi realizada em triplicado.

3.10 Extração de Compostos Fenólicos da amostra

3.10.1 Extração com Acetato de etilo

A extração de ácidos fenólicos livres (AFL), conjugados (AFC) e insolúveis (AFI) foi baseada no protocolo descrito por Mira *et al.* 2008.

Para extração de AFL da amostra, procedeu-se inicialmente a uma centrifugação a 4400 rpm durante 10 min, o resíduo resultante foi descartado e a uma pequena parte do sobrenadante foi medido o pH e analisada a sua composição por HPLC-DAD usando o método 1 (Amostra C1 pH 4,91). O restante sobrenadante foi acidificado com HCl e sujeito a uma nova centrifugação nas condições da anterior. O resíduo foi ressuspenso em 50:50 (v/v) MeOH:H₂O (Amostra Resíduo pH 1,77) e o sobrenadante (Amostra C11S pH 1,77) foram analisados por HPLC-DAD utilizando o método anterior. Ao restante sobrenadante extraiu-se os AFL através de uma extração com acetato de etilo, da qual resultou uma fase aquosa e uma orgânica. À fase aquosa foi analisada por HPLC-DAD usado o método anteriormente referido. À fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio para eliminar os vestígios de água, após alguns minutos a foi filtrada e o solvente evaporado num evaporador rotativo. O produto contendo os AFL, foi ressuspenso em 50:50 (v/v) MeOH:H₂O e analisado por HPLC-DAD através do método 1 (figura 18).

A extração de AFC e AFI a partir da amostra inicial foi iniciada com uma centrifugação durante 30 min a 4400 rpm. O sobrenadante foi submetido a uma hidrólise alcalina por 4 horas pela adição de hidróxido de sódio numa atmosfera de argon. Após o tempo de reação a mistura foi acidificada com ácido clorídrico até a um pH de 1,5. A extração é realizada com acetato de etilo, a fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio, após alguns minutos a fase orgânica foi filtrada e o solvente evaporado num evaporador rotativo. O produto contendo os AFC, foi ressuspenso em 50:50 (v/v) MeOH:H₂O e analisado por HPLC-DAD através

do método 1. O resíduo da centrifugação foi ressuspensão em 50:50 (v/v) MeOH:H₂O e sujeito ao mesmo processo de extração que o sobrenadante, tendo o produto obtido os AFL. O produto foi ressuspensão em 50:50 (v/v) MeOH:H₂O e analisado por HPLC-DAD com o método 1 (figura 19).

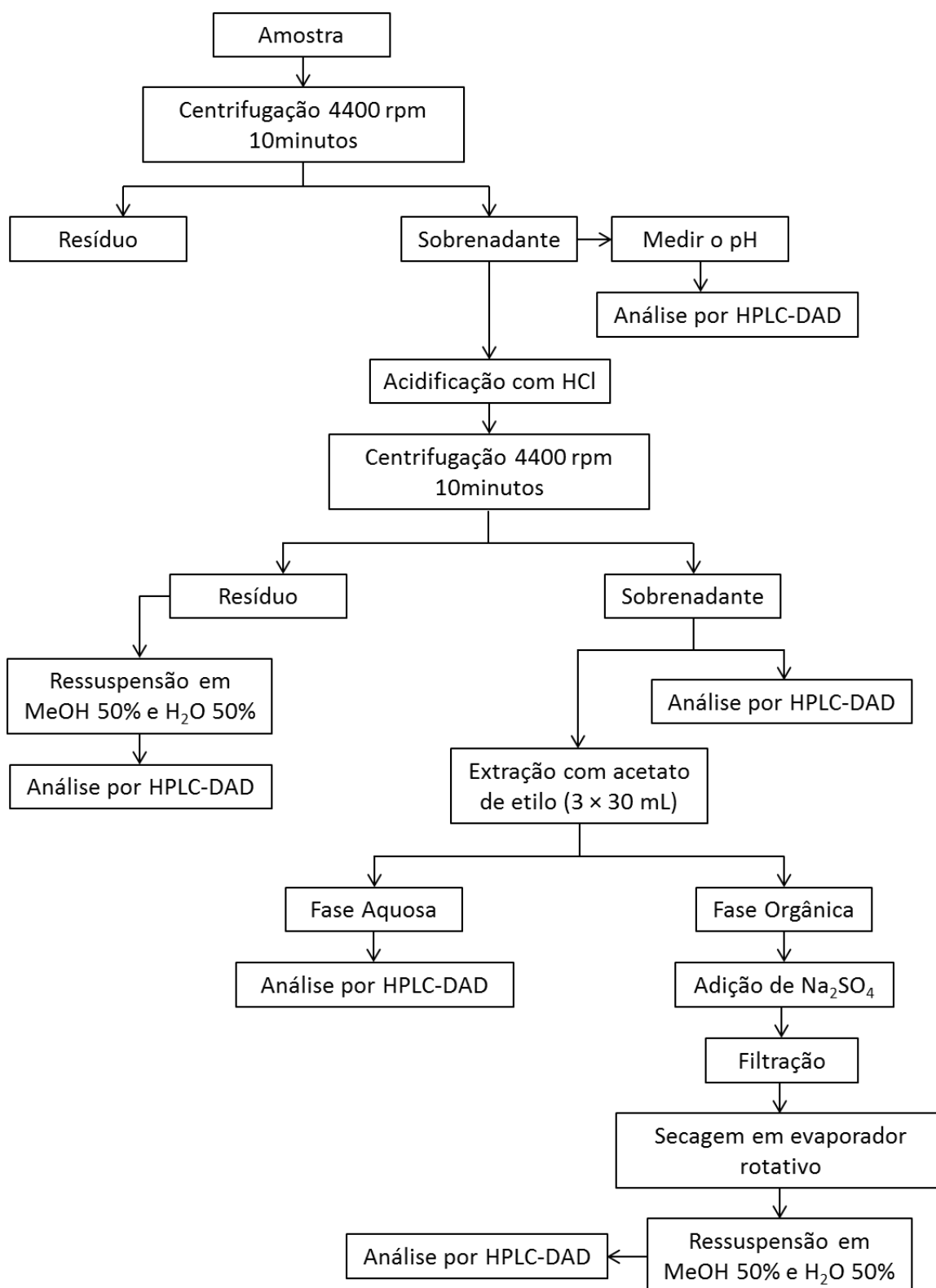


Figura 18 - Extração de AFL de amostra com acetato de etilo

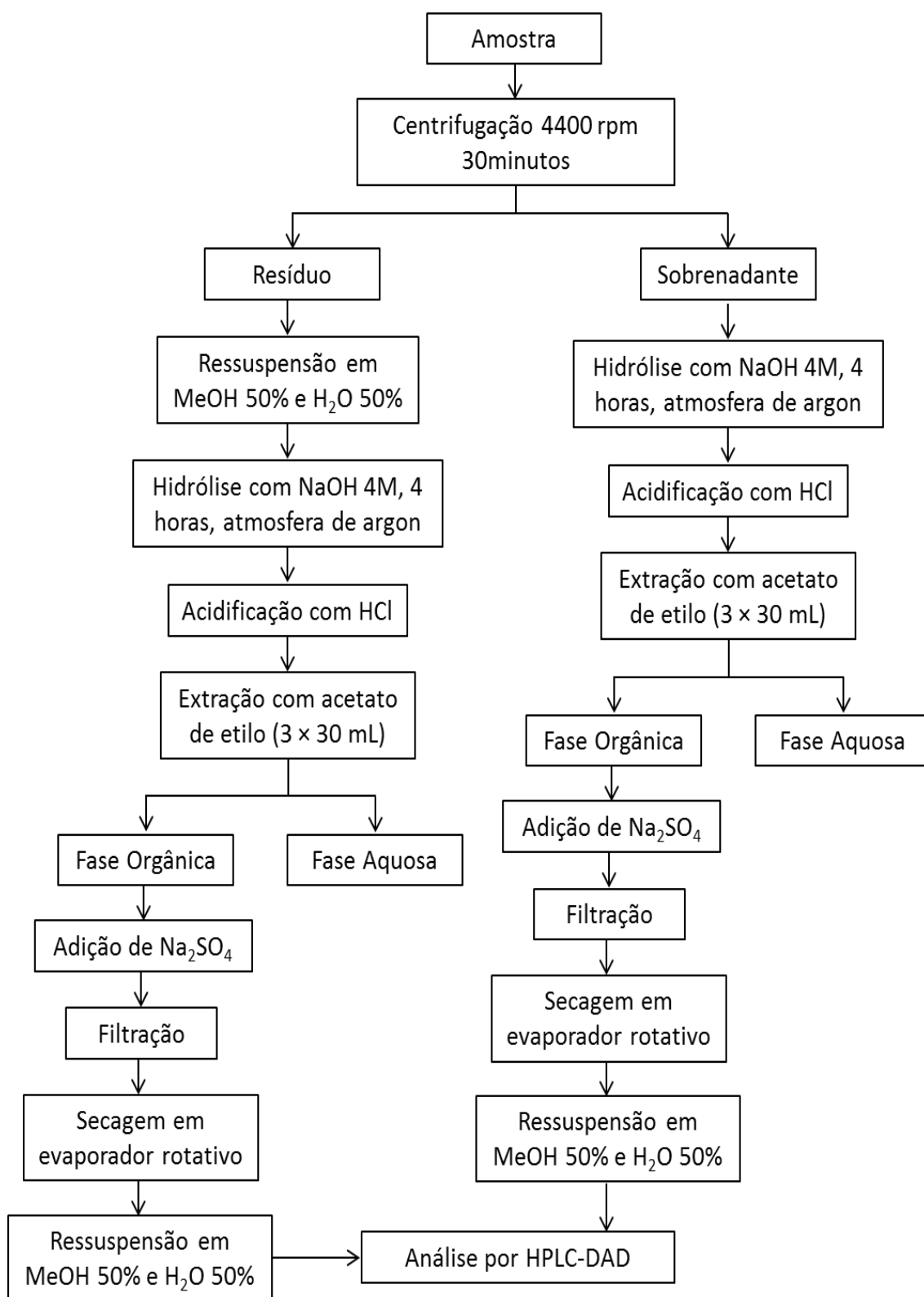


Figura 19 - Extração de AFC e AFI da amostra com acetato de etilo

3.10.2 Extração em Fase-Sólida (SPE)

Para a extração em fase-sólida de compostos fenólicos da amostra, esta foi previamente centrifugada durante 30 min a 4400 rpm.

Os cartuchos foram condicionados com 2,5 mL de metanol e 5 mL de água destilada e de seguida passou-se 12,5 mL do sobrenadante da amostra. A eluição foi realizada com 6 mL de acetonitrilo. O eluente foi evaporado num evaporador rotativo e o produto foi ressuspensão em 50:50 (v/v) MeOH:H₂O. O produto e o sobrenadante após a passagem pelo cartucho foram analisados por HPLC-DAD através do método 1.

A SPE foi realizada em triplicado.

3.10.3 Extração por Ultra sons

Para a extração de compostos fenólicos da amostra através de ultra sons foram testados cinco solventes, o éter dietílico, o diclorometano, o acetato de etilo, o metanol e o clorofórmio.

Em tubos ensaio adicionou-se 1 mL de amostra e 1 mL de solvente, e colocaram-se no aparelho de ultra sons durante 15 min a 27°C. Após o tempo de extração, a fase orgânica foi separada da fase aquosa.

O solvente da fase orgânica foi evaporado, numa estufa a 40°C e o produto ressuspensão em 50:50 (v/v) MeOH:H₂O. O produto foi analisado por HPLC-DAD com o método 1.

Numa segunda extração foram utilizados dois dos solventes, o éter dietílico e o acetato de etilo e testados vários tempos de extração 1, 5, 30 e 30 min.

3.10.4 Extração por Hidrólise ácida

Com o objetivo de extrair compostos fenólicos da amostra através de uma hidrólise ácida, testou-se três temperaturas de reação: 40, 50 e 70°C.

Para a reação de hidrólise ácida juntou-se em frascos de vidro, 5 mL de amostra, 5 mL de metanol e 5 mL de ácido clorídrico 2 M. Os frascos foram colocados as diferentes temperaturas durante 1 h, com agitação permanente. Foram ainda preparados frascos com 5 mL de amostra, 5 mL de metanol e 5 mL de água desionizada, expostos as mesmas condições reacionais. Estes serviram como controlo.

Após o tempo reacional, a extração é efetuada com acetato de etilo. A fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio, após alguns minutos a fase orgânica foi filtrada e o solvente evaporado num evaporador rotativo. O produto foi ressuspensão em 50:50 (v/v) MeOH:H₂O e analisado por HPLC-DAD através do método 1.

3.11 Determinação dos Fenóis Totais

Para a determinação dos fenóis totais foi necessário construir uma reta de calibração. Para tal preparou-se uma solução mãe de ácido gálico 1 mg/mL em metanol, num balão de 25 mL. A partir desta, prepararam-se as seguintes diluições, em balões de 5 mL: 50, 100, 125, 150, 200, 225, 250, 300, 325, 350, 400 e 500 mg/L; aferindo com metanol.

Em tubos de ensaio juntou-se 50 μL das soluções de ácido gálico diluídas, 450 μL de água destilada e 2,5 mL Folin-Cionalteu e deixou-se reagir durante 5 minutos. Em seguida adicionou-se 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (75 g/L) e aguardou-se 90 minutos, com agitação intermitente. O processo foi realizado em triplicado para cada amostra.

Foi preparado um branco, onde os 50 μL da solução de ácido gálico foram substituídos por 50 μL de metanol e procedeu-se de forma análoga.

Para a determinação dos fenóis totais nas amostras resultantes das várias extrações, os 50 μL iniciais foram substituídos por 50 μL de amostra e procedeu-se como descrito anteriormente.

Depois de ocorridas as reações, mediram-se as absorvâncias das misturas reacionais contidas em cada tubo de ensaio, a 765 nm.

3.12 Atividade antioxidante

A determinação das atividades antioxidantes dos compostos fenólicos extraídos da amostra pelas várias técnicas e da amostra inicial foi realizada através do método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), descrito por Scherer & Godoy 2009.

Para cada amostra analisada, prepararam-se soluções em metanol com diferentes concentrações.

O ensaio foi realizado em tubos de ensaio, onde foram misturados 0,1 mL das soluções metanólicas das amostras nas diferentes concentrações e 3,9 mL de uma das soluções de DPPH 0,06 mM. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Para preparar o branco misturou-se 0,1 mL de metanol e 3,9 mL da solução de DPPH.

Após um período de incubação de 90 min, à temperatura ambiente e no escuro, a absorvância foi medida a 517 nm.

Foi ainda construída uma curva de calibração para o DPPH com as seguintes concentrações: 4,28; 8,56; 17,12; 25,68; 42,80 mg/L.

3.13 Derivatização

Para a análise dos compostos fenólicos da amostra AFL através GC-MS, foi necessário derivatizá-la através da técnica de sililação.

Inicialmente, pesou-se 1 mg de ácido protocatecuico para três frascos de vidros e juntou-se 5,5 μL de BSTFA 5% TCMS. Em cada um colocou-se 5 mL de um dos solventes: a piridina, o tetrahidrofurano e o acetato de etilo. Os frascos foram colocados a 70°C durante 30 min, com agitação permanente. Após o tempo de reação, 1,5 mL da mistura foram transferidos para um vial e analisada a sua composição no GC-MS utilizando o método I, com as seguintes condições de temperaturas: temperatura inicial da coluna de 60°C, mantendo-se a temperatura durante alguns minutos, seguindo-se de um aumento até aos 200°C numa rampa de crescimento de 4°C/min, estando a esta temperatura durante alguns minutos, após este tempo inicia uma nova rampa de temperatura aumentando de 200°C até 280°C, numa rampa de crescimento de 10°C/min, mantendo-se a temperatura final constante durante algum tempo. Sendo a

temperatura do injetor 250°C e a do detetor 180°C. O gás de arraste é Hélio com um caudal de 1mL/min e o volume de injeção de amostra de 1µL.

Para determinar o tempo de retenção dos padrões derivatizados, foi pesada 1 mg de cada padrão (octanol, ácido ferúlico, ácido vanílico, vanilina, ácido benzoico, ácido gálico, fenol, aldeído protocatecuico, ácido cinâmico, ácido salicílico, aldeído cinâmico, rutina e quercetina) para frascos e cada um foi dissolvido em 5 mL de acetato de etilo. A cada frasco foi ainda adicionado (1:4) (m/m) de BSTFA com 5% TMCS e colocados a 70°C durante 30 min, com agitação permanente. Após o tempo de reação, 1,5 mL da mistura foram transferidos para um vial e analisada a sua composição pelo método I no GC-MS.

Na derivatização do resíduo seco AFL foi ressuspenso em 5 mL de acetato de etilo e 500 µL de BSTFA com 5% de TMCS. A mistura foi colocada a reagir durante 30 min a 70°C, com agitação permanente. No final das reações uma parte do solvente foi evaporado num evaporador rotativo, para concentrar a amostra. A amostra concentrada foi analisada pelo método I no GC-MS.

4 CAPÍTULO

Resultados e discussão

4.1 Limite de detecção do HPLC-DAD

O limite de detecção do HPLC-DAD foi determinado através da análise cromatográfica do ácido protocatecuico a diferentes concentrações: 0,008; 0,016; 0,032; 0,063; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 e 10 µg/mL.

As áreas obtidas nos picos dos cromatogramas a 280 nm foram apresentadas em função das diferentes concentrações de ácido protocatecuico para construir a reta de calibração do ácido protocatecuico (figura 20). Apenas foram utilizadas as concentrações superiores a 0,125 µg/mL, inclusive, para a construção da reta de calibração, uma vez que as inferiores não apresentavam linearidade.

Este procedimento é importante para que se saiba até que concentração se irá quantificar os compostos fenólicos na amostra.

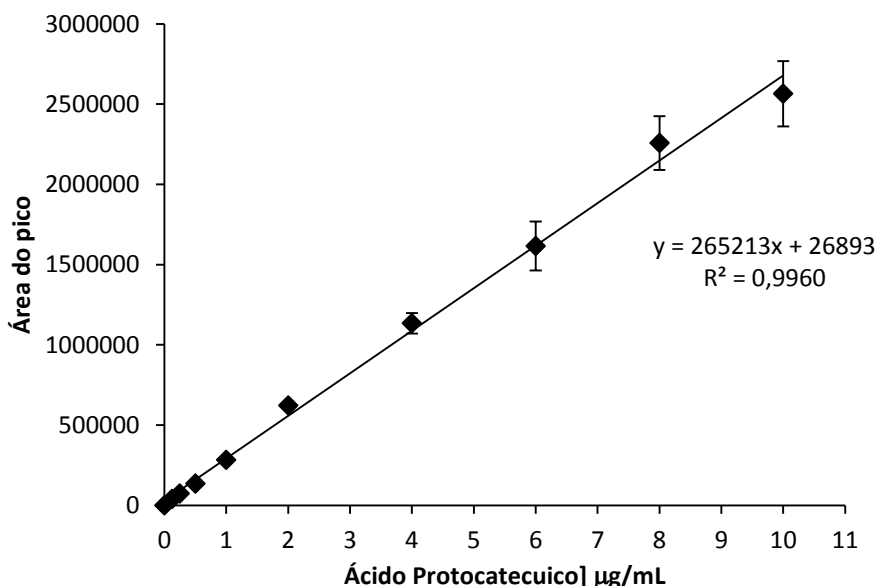
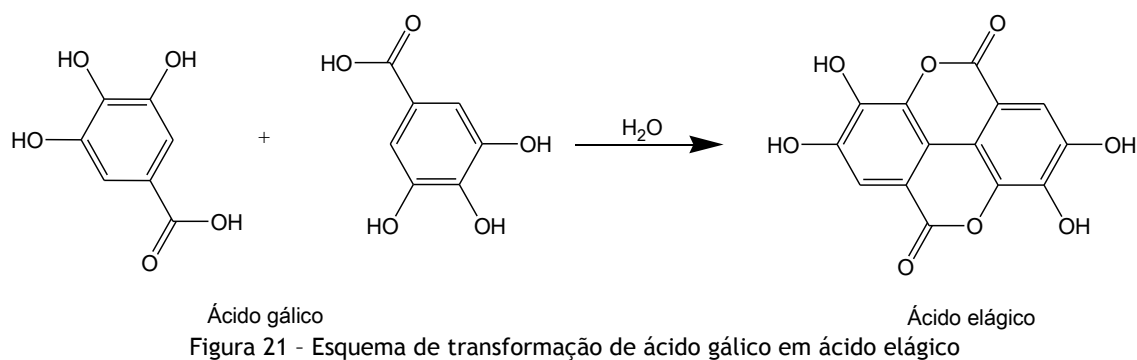


Figura 20 - Reta de calibração do ácido protocatecuico

4.2 Transformação de ácido gálico em ácido elágico

Ácido gálico foi transformado em ácido elágico, durante 4 e 8 dias, seguindo o esquema reacional representado na figura 21. Ao final de quatro dias verificou-se que algumas moléculas ácido gálico já se teriam juntado e produzido ácido elágico e outras, em menor quantidade, teriam perdido um dos OH e produzido ácido protocatecuico. Passados os 8 dias verificou-se os mesmos produtos mas em maior quantidade.



4.3 Tempo de retenção de padrões

Soluções padrão de compostos fenólicos foram analisadas cromatograficamente pelos métodos 1 e 2, com o objetivo de determinar o tempo de retenção de cada composto e assim permitir a sua identificação nas diferentes amostras analisadas. Os tempos de retenção dos compostos fenólicos para cada método estão registados na tabela 3.

Tabela 3 - Tempos de retenção (T_R) de compostos fenólicos para o método 1 e 2

Composto	Método 1	Método 2
	T_R (min)	
Ácido Gálico	4,27	7,78
Ácido Protocatecuico	6,85	13,79
Álcool Vanílico	7,65	14,86
Aldeído Protocatecuico	8,59	17,83
Ácido Cafeico	11,51	19,63
Ácido Vanílico	11,79	20,15
Vanilina	13,94	25,50
Fenol	14,08	29,58
Ácido Ferúlico	17,18	27,60
Coniferaldeido	18,23	33,33
Ácido Benzoico	19,51	31,26
Rutina	20,23	23,72
Ácido Elágico	21,05	25,00
Aldeído Salicílico	21,26	43,09
Ácido Salicílico	22,71	39,33
Eriodictiol	23,89	42,15
Aldeído Cinâmico	26,18	49,11
Ácido Cinâmico	27,90	45,27
Narigenina	28,45	47,80
Quercetina	28,11	42,69
Luteolina	30,45	42,10
Campeferol	34,87	49,31
Apigenina	38,31	48,18

Pela observação da tabela 3 verifica-se que com o método 1 os compostos necessitam de um tempo de retenção menor.

4.4 Análise dos métodos cromatográficos

A composição da amostra inicial foi analisada através de dois métodos cromatográficos por HPLC-DAD, de forma a escolher o método mais adequado para as análises cromatográficas realizadas ao longo deste trabalho.

Na figura 22 está apresentado o cromatograma da amostra inicial obtido pelo método 1.

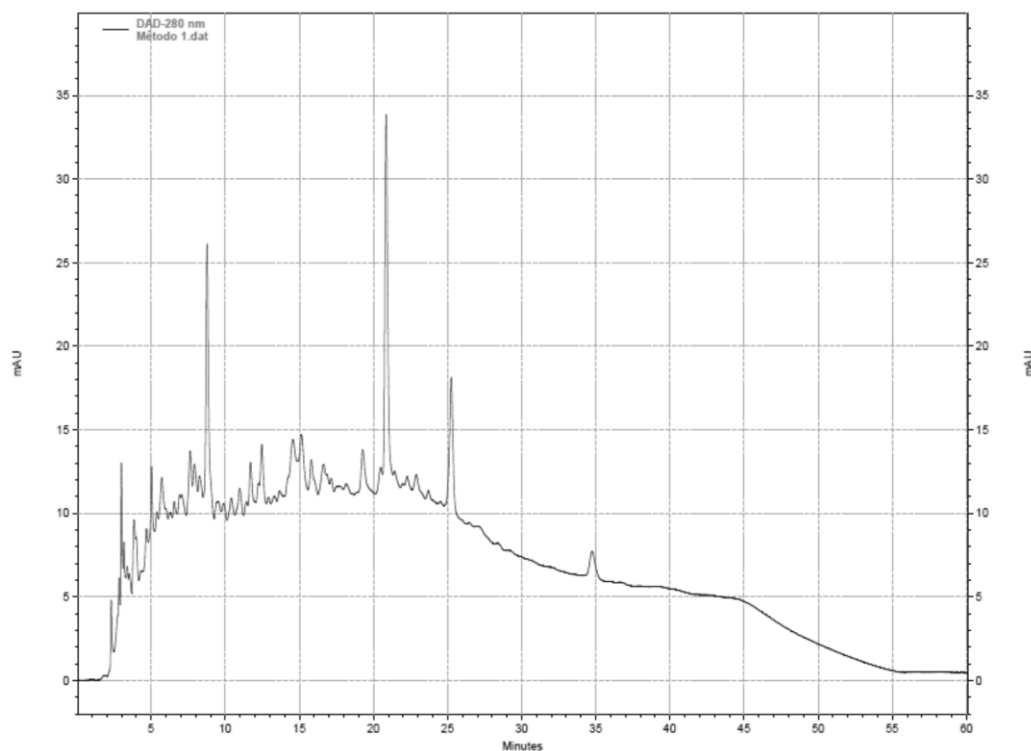


Figura 22 - Cromatograma a 280 nm da amostra inicial analisada pelo método 1

Pela análise do cromatograma verifica-se a presença de vinte compostos fenólicos na amostra, dos quais se conseguem quantificar nove, o ácido gálico, o aldeído protocatecuico, o ácido cafeico, o ácido vanílico, a vanilina, o ácido ferúlico, o coniferaldeído, o eriodictiol e a narigenina, através da comparação dos tempos de retenção e espectros com os dos padrões. A concentração do aldeído protocatecuico e do ácido vanílico foram calculadas através da substituição do “y” das equações da reta de regressão linear construídas com os respetivos padrões (Anexos), pela área do pico correspondente. Verificou-se ainda a presença de um glicosídeo do ácido gálico, que se identifica pela semelhança do espectro deste com o do ácido gálico, mas a eluição deste ocorreu a um tempo inferior ao do ácido gálico e de um glicosídeo de um flavonoide, chegou-se a esta conclusão devido as absorções máximas acontecerem a 360 nm, que é a zona de absorção dos flavonoides. Os resultados desta análise estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Compostos	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
2,26	269	Glicosídeo do ácido gálico	229967	
2,94	240 e 306		323338	
3,13	258		248635	
3,33	265		235123	
4,27	268	Ácido gálico	333780	1,23
5,67	254 e 365	Glicosídeo de um flavonoide	1008667	
8,21	260 e 320		782447	
8,59	275 e 310	Aldeído Protocatecuico	2082818	5,94
11,51	235 e 324	Ácido Cafeico	544208	1,12
11,79	259 e 290	Ácido Vanílico	1031690	2,78
13,94	280 e 310	Vanilina	756302	1,95
15,73	270		1272161	
17,18	235 e 323	Ácido Ferúlico	526177	1,00
18,23	341	Coniferaldeido	433947	9,47
19,22	259 e 340		1993138	
20,80	258, 306 e 336		2223811	
23,89	288	Eriodictiol	485771	6,42
25,19	270, 300 e 360		2007050	
28,45	290	Narigenina	451957	1,58
34,68	280 e 340		138506	

Na figura 23 está apresentado o cromatograma da análise da amostra inicial pelo método 2.

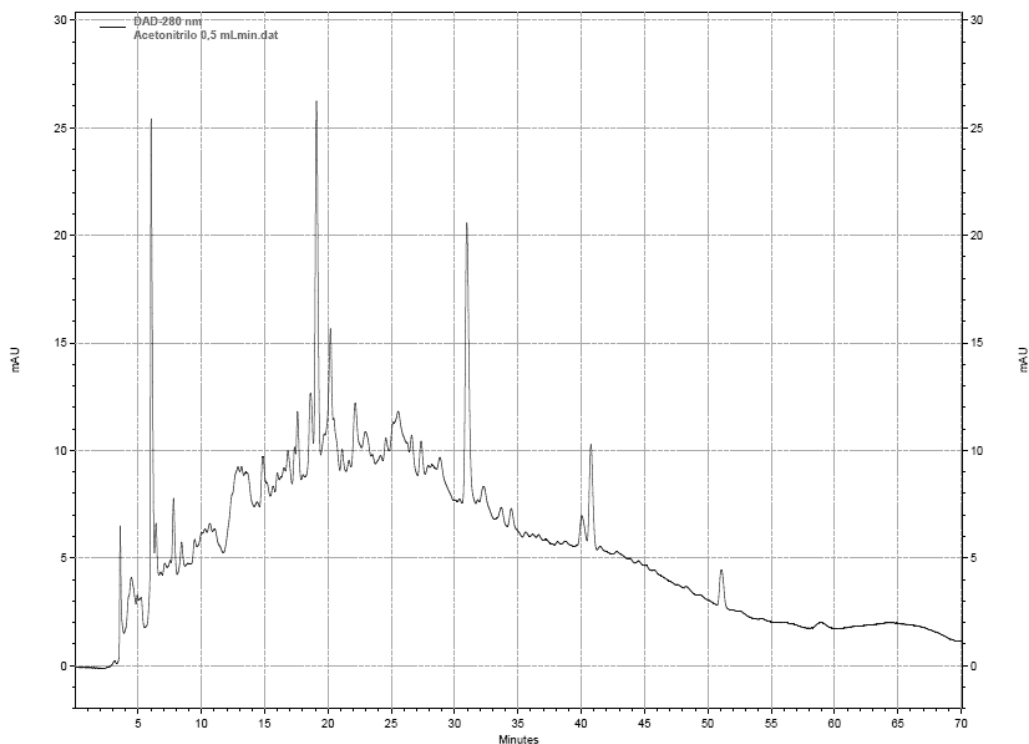


Figura 23 - Cromatograma a 280 nm da amostra inicial analisada pelo método 2

Analisando o cromatograma verifica-se a existência de nove compostos fenólicos, tendo sido identificado o ácido gálico através da comparação do tempo de retenção e do espectro deste

com o do padrão. A concentração do ácido gálico foi calculada pela substituição do “y” da equação da reta de regressão linear do padrão pela área do pico. Na tabela 5 constam estes dados.

Tabela 5 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra analisada pelo método 2 respetivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Compostos	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
3,54	273		282510	
7,78	268	Ácido Gálico	640369	2,23
18,56	260 e 325		1648096	
19,03	276		2216898	
20,14	264 e 290		1789664	
22,10	263 3 360		2026664	
30,89	258, 307 e 345		2737063	
40,71	279, 300 e 346		1148647	
51,02	280, 300 e 324		383515	

Comparando os resultados obtidos com o método 1 e 2, conclui-se que o método 1 é mais eficaz na identificação de compostos fenólicos, uma vez que com este se conseguiu identificar um maior número de compostos fenólicos.

4.5 Validação de um método para a análise de compostos fenólicos

Com o objetivo de validar um método de análise de compostos fenólicos, em termos de linearidade, limite de deteção, limite de quantificação e precisão, foi utilizada uma mistura de cinco compostos fenólicos (ácido protocatecuico, aldeído protocatecuico, álcool vanílico, ácido vanílico e a vanilina).

As retas de calibração dos compostos fenólicos (Anexos) foram contruídas pelo método do padrão externo com cinco níveis de concentração dos padrões na mistura, onde as áreas dos picos nos cromatogramas a 280 nm foram apresentadas em função de concentrações conhecidas de soluções padrão e a reta de regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados. O limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados a partir dos desvios padrão residuais (σ) e do declive (S) da equação da reta, pelas fórmulas 3 e 4:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S} \quad (3) \quad LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (4)$$

Para testar a precisão intra e inter-dia foram usadas quatro concentrações diferentes, na mistura de padrões (1,25; 2,50; 5,00; 10,00 $\mu\text{g/mL}$). As áreas dos picos dos cromatogramas e os tempos de retenção de três injeções obtidos para cada concentração em três dias diferentes, foram usadas para calcular o desvio padrão relativo (%RSD) inter-dia. Os dados das áreas dos picos e os tempos de reteção usados para determinar a precisão intra-dia, obtiveram-se a partir de injeções não consecutivas.

Os resultados desta análise estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Comprimento de onda máximo (λ_{max}), tempo de retenção (T_R), retas de regressão linear e dados de precisão de compostos fenólicos

Compostos	λ_{max} (nm)	T_R (min)	Reta de regressão linear	Gama de concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (RSD % T_R AUC ²)				
								Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-dia		Inter-dia	
									T_R	AUC	T_R	AUC
Ácido Protocatecuico	260	$6,85 \pm 0,09$	$Y = 331472x - 14942$	1,25 - 10,00	0,9985	5,84	1,77	1,25	0,29	6,53	0,58	5,86
								2,50	0,61	6,05	0,47	5,10
								5,00	0,29	5,84	0,72	5,50
								10,00	3,65	6,55	2,32	6,40
Álcool vanílico	280	$7,64 \pm 0,11$	$Y = 100621x - 6224,3$	1,25 - 10,00	0,9980	5,84	1,77	1,25	0,27	5,02	0,66	6,35
								2,50	0,90	5,85	1,41	4,16
								5,00	0,20	5,36	0,80	5,12
								10,00	3,46	9,65	2,27	6,70
Aldeído Protocatecuico	280	$8,60 \pm 0,10$	$Y = 332145x + 111045$	1,25 - 10,00	0,9920	5,74	1,74	1,25	0,24	7,14	0,58	6,68
								2,50	0,94	5,06	0,77	3,90
								5,00	0,18	5,98	0,71	5,65
								10,00	2,51	6,55	1,73	7,22
Ácido vanílico	260	$11,78 \pm 0,11$	$Y = 380410x - 25656$	1,25 - 10,00	0,9986	5,73	1,74	1,25	0,21	5,59	0,53	5,21
								2,50	1,12	4,62	0,90	3,83
								5,00	0,13	5,46	0,81	5,49
								10,00	1,40	9,34	1,16	7,79
Vanilina	280	$13,75 \pm 0,11$	$Y = 387516x + 1899,1$	1,25 - 10,00	0,9995	5,43	1,65	1,25	0,15	5,09	0,49	0,49
								2,50	1,09	5,14	0,87	0,87
								5,00	0,11	5,25	0,63	0,63
								10,00	0,87	9,34	0,91	0,91

4.6 Análise cromatográfica das amostras

Neste trabalho, foram utilizadas quatro técnicas de extração de compostos fenólicos do efluente de cozedura de cortiça e as amostras obtidas nestas extrações analisadas cromatograficamente pelo método 1.

4.6.1 Extração com Acetato de etilo

Ao longo da extração com acetato de etilo foram obtidas seis amostras: a C1 pH 4,91; a C11S pH 1,77; a resíduo pH 1,77; AFL; AFC e AFI e analisadas por HPLC-DAD através do método 1.

Na figura 24 está apresentado o cromatograma da amostra C1 pH 4,91.

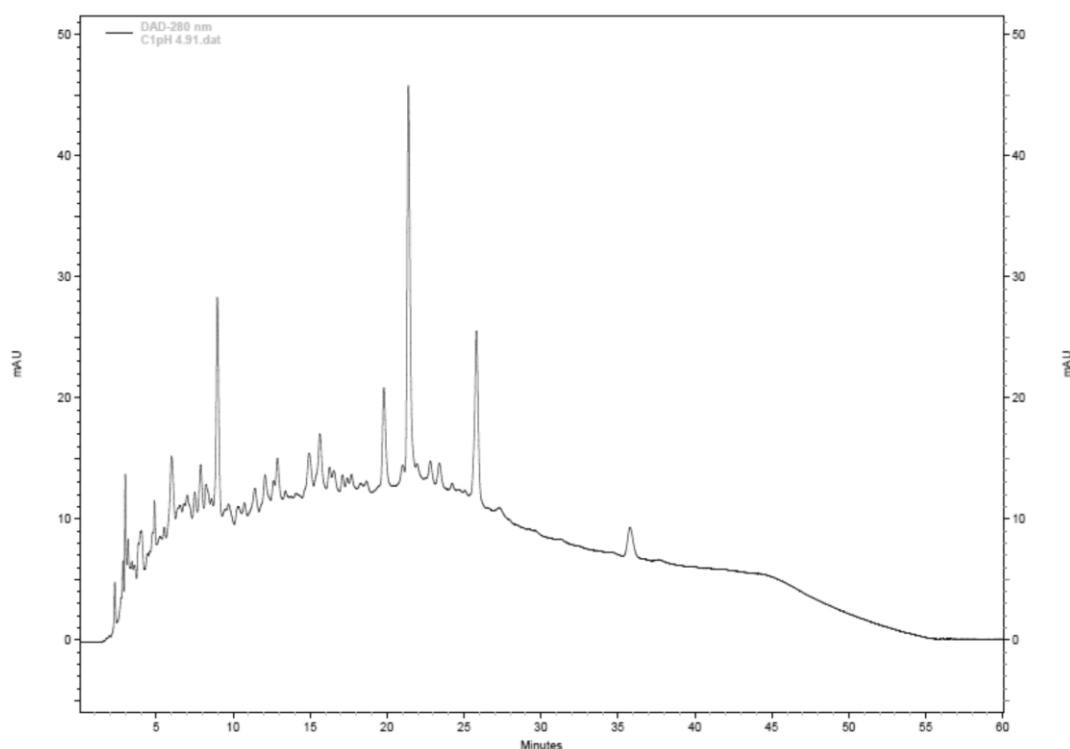


Figura 24 - Cromatograma a 280 nm da amostra C1 pH 4,91 analisada pelo método 1

Ao analisar o cromatograma da amostra C1 pH 4,91 detetou-se dezassete picos, correspondentes a compostos fenólicos, dos quais se quantificou o aldeído protocatecuico e o ácido vanílico por comparação dos tempos de retenção e dos espectros dos padrões. As concentrações destes foram calculadas através da equação da reta de regressão linear (Anexos). Pela comparação dos espectros dos padrões com os da amostra, identificou-se ainda um glicosídeo da quercetina e um da apigenina. Na tabela 7 constam estes resultados.

Tabela 7 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra C1 pH 4,91 analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
2,27	270		178180	
2,95	239 e 307		392278	
3,14	258		297982	
5,97	254 e 372	Glicosídeo da Quercetina	1596423	
7,47	260 e 313		865106	
8,59	270 e 320	Aldeído Protocatecuico	1085705	2,93
8,94	275		2141807	
11,79	259 e 290	Ácido Vanílico	1912015	5,09
12,60	265 e 340		735577	
12,84	267		1394803	
14,90	260 e 355		2068677	
15,59	272 e 355		2383891	
17,08	265		926958	
19,74	259 e 344		3584100	
21,35	258, 306 e 337		3483270	
25,77	259, 279 e 348		2998284	
35,74	267 e 340	Glicosídeo da Apigenina	936070	

O cromatograma da amostra resíduo pH 1,77 está apresentado na figura 25.

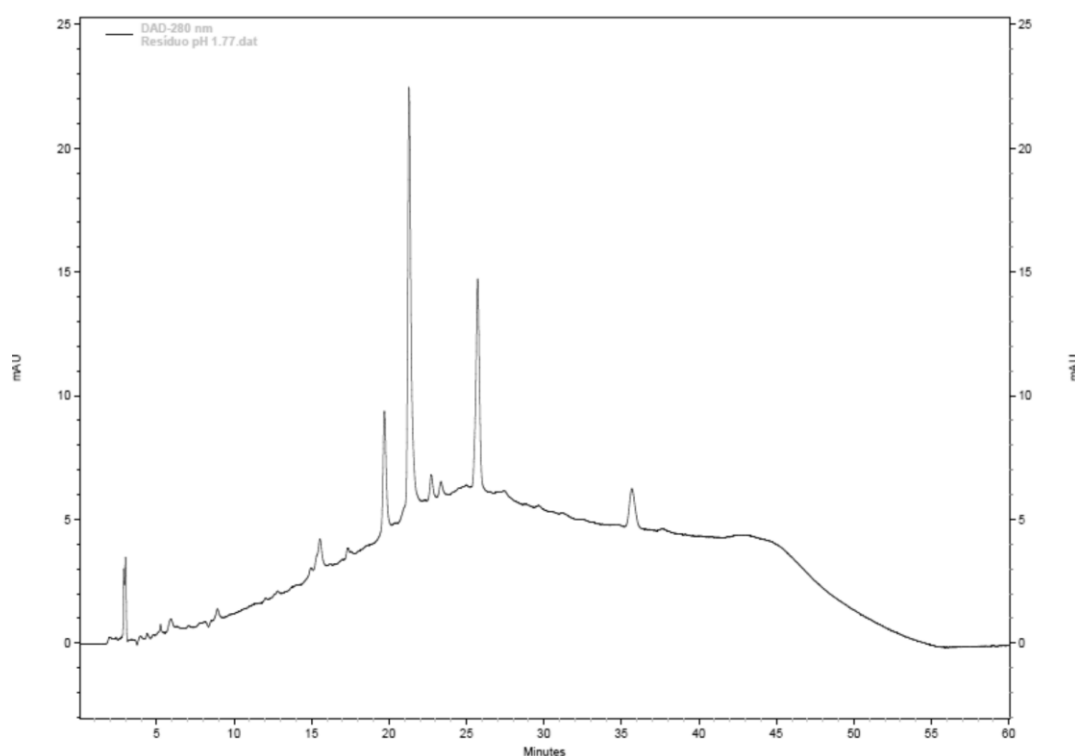


Figura 25 - Cromatograma a 280 nm da amostra resíduo pH 1,77 analisada pelo método 1

Na tabela 8 estão apresentados os resultados da análise do cromatograma, onde se verificar a presença de sete compostos fenólicos. Através da comparação dos espectros obtidos na amostra resíduo pH 1,77 com os dos padrões identificou-se um glicosídeo da apigenina.

Tabela 8 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra resíduo pH 1,77 analisada pelo método 1, respetivos compostos e áreas

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área
8,92	273		43883
15,52	266 e 347		202797
17,28	259		72794
19,67	259 e 347		589396
21,26	258, 306 e 337		1592924
25,69	260, 279 e 351		913972
35,70	267 e 330	Glicosídeo da Apigenina	161256

O cromatograma da análise cromatografica da amostra C11S pH 1,77 está exposto na figura 26.

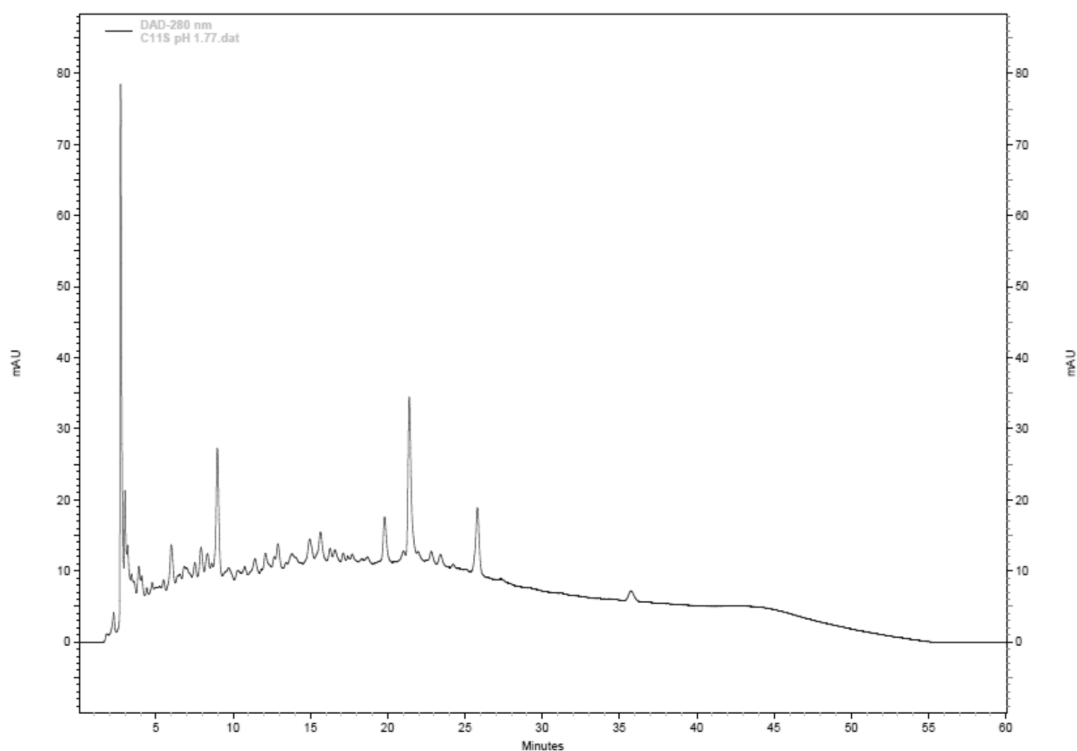


Figura 26 - Cromatograma a 280 nm da amostra C11S pH 1,77 analisada pelo método 1

Analisando o cromatograma da amostra C11S pH 1,77 detetou-se doze picos correspondentes a compostos fenólicos. Ao comparar os espectros e os tempos de retenção obtidos na análise com o dos padrões, identificou-se o ácido vanílico e um glicosídeo da apigenina. A concentração do ácido vanílico na amostra C11S pH 1,77 foi determinada através da equação da reta de regressão linear construída com o padrão de ácido vanílico (Anexos). Estes dados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra C11S pH 1,77 analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
2,95	228 e 299		382598	
3,13	255		305362	
5,95	254 e 372		1446913	
7,48	315		2278965	
8,94	275		2522294	
11,79	259 e 290	Ácido Vanílico	1196091	3,21
14,93	261 e 360		1533045	
15,61	273 e 360		2268744	
19,76	259 e 342		3456302	
21,35	258, 306 e 336		3407645	
25,77	279, 300 e 347		3634539	
35,94	267 e 335	Glicosídeo da Apigenina	671757	

A figura 27 mostra o cromatograma da amostra AFL.

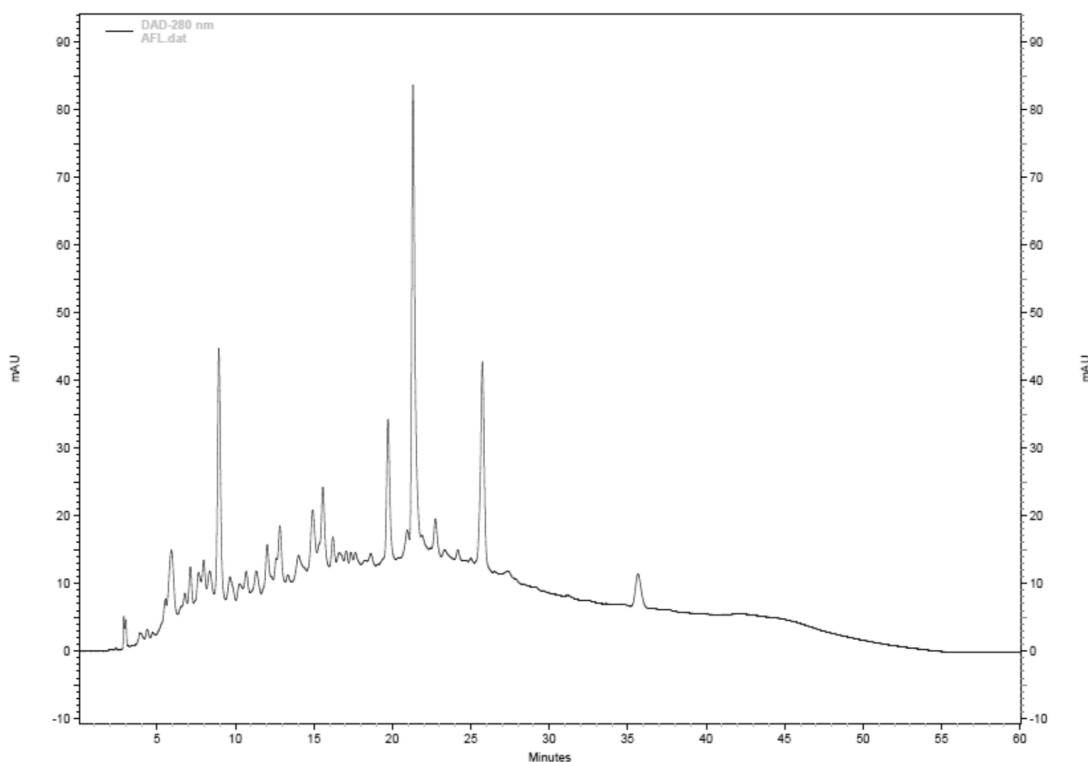


Figura 27 - Cromatograma a 280 nm da amostra AFL analisada pelo método 1

O cromatograma obtido para amostra AFL apresenta vinte picos pertencentes a compostos fenólicos, nos quais se identifica o ácido gálico, o ácido vanílico e a vanilina através da comparação dos tempos de retenção espectros obtidos na análise da amostra como os dos padrões. Pela substituição do “y” das equações da reta das regressões lineares (Anexos) dos padrões pela área do pico correspondente a cada composto, calculou-se a concentração do ácido gálico, do ácido vanílico e da vanilina. Na tabela 10 estão apresentados estes resultados.

Tabela 10 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra AFL analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
4,27	272	Ácido Gálico	225644	0,87
5,88	255 e 373		1689653	
7,09	274 e 315		915373	
7,94	257 e 321		972762	
8,90	276		3328282	
10,63	270 e 310		1140940	
11,79	260 e 290	Ácido Vanílico	2140453	5,69
12,58	266 e 329		759127	
12,78	271		1752224	
13,94	279 e 310	Vanilina	2915679	7,52
14,88	262, 275 e 355		2498502	
15,53	275 e 346		3234602	
16,16	272		1524281	
17,59	265		1786301	
19,68	259 e 346		5232044	
21,28	258, 307 e 338		6602331	
22,70	280 e 370		2445680	
24,13	269		1786918	
25,70	279, 296 e 352		5449055	
35,64	275 e 328		2277482	

O cromatograma da amostra AFC está apresentado na figura 28.

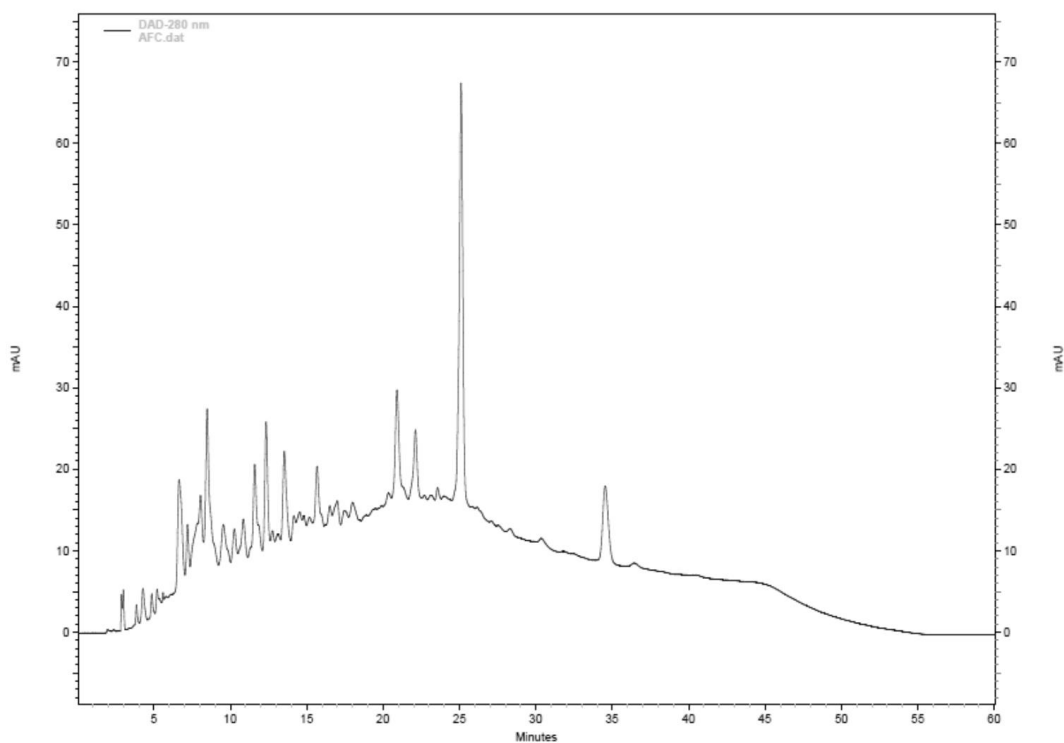


Figura 28 - Cromatograma a 280 nm da amostra AFC analisada pelo método 1

Analisando o cromatograma da amostra AFC deteta-se a presença de vinte e um picos de compostos fenólicos, destes identifica-se o ácido gálico, o ácido protocatecuico, o aldeído protocatecuico, o ácido vanílico e a vanilina pela comparação dos tempos de retenção e espectros obtidos com os dos padrões. A concentração dos compostos identificados foi calculada pela substituição do “y” da equação da reta de regressão linear de cada padrão (Anexos) pela área do pico correspondente ao composto na amostra AFC, exceto a do ácido protocatecuico. Não foi possível determinar a concentração do ácido protocatecuico, devido a presença de dois compostos no mesmo pico. A tabela 11 mostra estes resultados.

Tabela 11 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra AFC analisada pelo método 1, respetivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
3,82	243 e 295		198736	
4,27	271	Ácido Gálico	378486	1,37
4,82	270 e 310		332082	
5,17	269		248860	
6,62*	280		2417778	
6,85*	261 e 289	Ácido Protocatecuico		
7,15	280 e 310		830706	
8,02	264		1259062	
8,59	279 e 310	Aldeído Protocatecuico	3385779	9,86
9,54	278		2050527	
10,21	270 e 302		1216648	
10,81	268		1775732	
11,79	260 e 300	Ácido Vanílico	3014287	7,99
12,31	271		2062216	
13,94	277 e 310	Vanilina	2493310	6,44
15,63	273		2841799	
20,86	254 e 366		5358486	
22,08	358		1500251	
24,92*	257 e 301		8101316	
25,06*	260, 280 e 297			
34,49	278 e 328		4694383	

*Picos sobrepostos

Na figura 29 está apresentado o cromatograma na análise da amostra AFC.

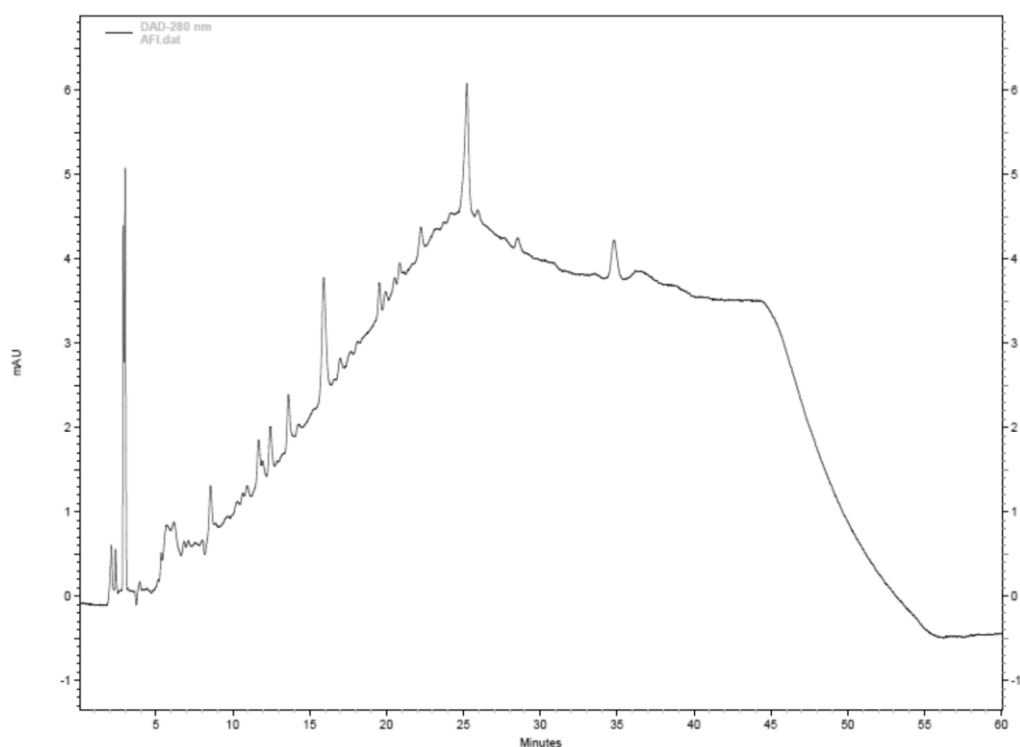


Figura 29 - Cromatograma a 280 nm da amostra AFI analisada pelo método 1

O cromatograma da amostra AFI mostra dez picos correspondentes a compostos fenólicos, dos quais se consegue detetar o aldeído protocatecuico, o ácido vanílico e a vanilina pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros obtidos como os dos padrões. A concentração dos compostos fenólicos identificados não se conseguiu calcular, pois as concentrações dos compostos estão abaixo do limite de quantificação, estes resultados são apresentados na tabela 12.

Tabela 12 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da amostra AFI analisada pelo método 1, respetivos compostos e áreas

T_R (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área
8,59	271 e 310	Aldeído Protocatecuico	47876
10,93	268		25869
11,79	264 e 290	Ácido Vanílico	62327
12,42	268		57170
13,94	271 e 310	Vanilina	77859
15,88	273		308320
19,90	261		108305
22,20	263		363327
25,18	265 e 300		520843
34,77	266		43645

4.6.2 Extração por SPE

Na extração por SPE, os compostos fenólicos foram analisados por HPLC-DAD usando o método 1. As extrações foram realizadas em triplicado.

A figura 30 mostra os cromatogramas do filtrado das três extrações realizadas por SPE. Pela sobreposição dos três cromatogramas consegue-se verificar que os resultados das três extrações são concordantes.

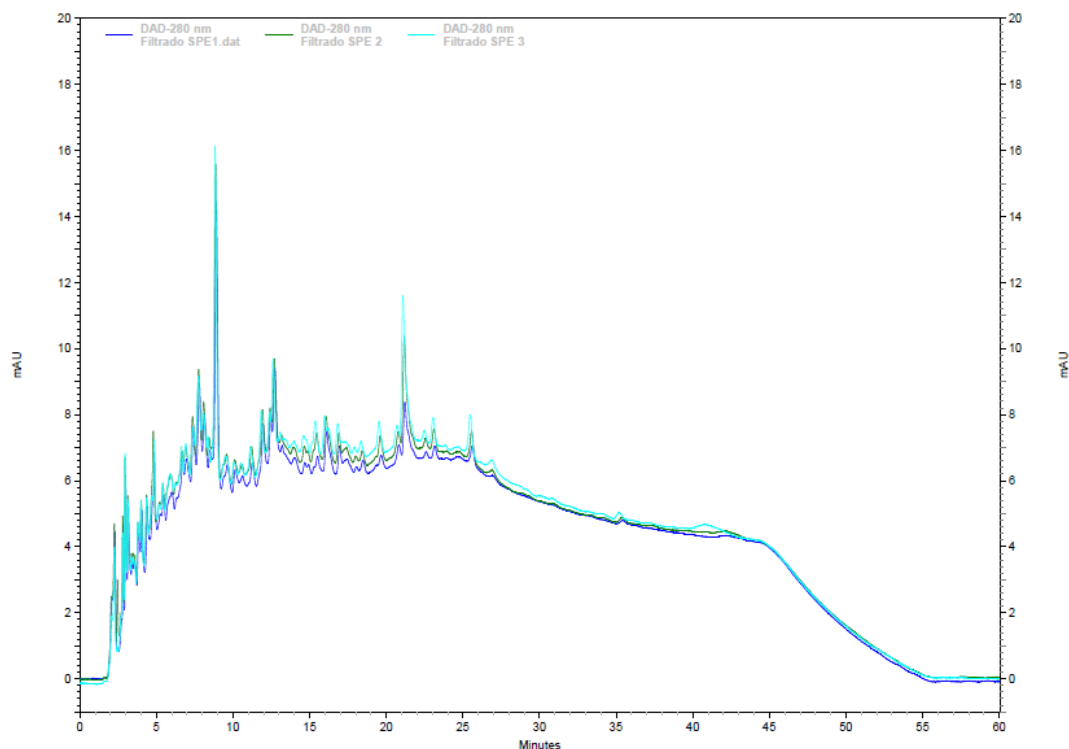


Figura 30 - Cromatogramas a 280 nm dos filtrados das extrações por SPE analisadas pelo método 1

Nesta análise verifica-se a presença de doze compostos fenólicos no filtrado, sendo quantificados o aldeído protocatecuico e o ácido vanílico através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros obtidos com os dos padrões. A concentração do ácido vanílico e do aldeído protocatecuico foram calculadas através da equação da reta da regressão linear dos padrões (Anexos). Os resultados desta análise estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm do filtrado da extração por SPE analisada pelo método 1 e respectivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
2,25	267e350		171183	
3,13	259		202310	
3,80	229 e 271		177660	
4,01	265		221368	
4,36	266		227851	
7,37	260 e 318		441333	
8,59	270 e 316	Aldeído Protocatecuico	461795	1,06
8,88	275		869467	
11,79	259 e 285	Ácido Vanílico	575107	1,58
12,69	268		522346	
16,06	267		397564	
21,17	258, 310 e 340		193031	

A figura 31 mostra a sobreposição dos cromatogramas obtidos pela análise dos produtos resultantes das três extrações por SPE.

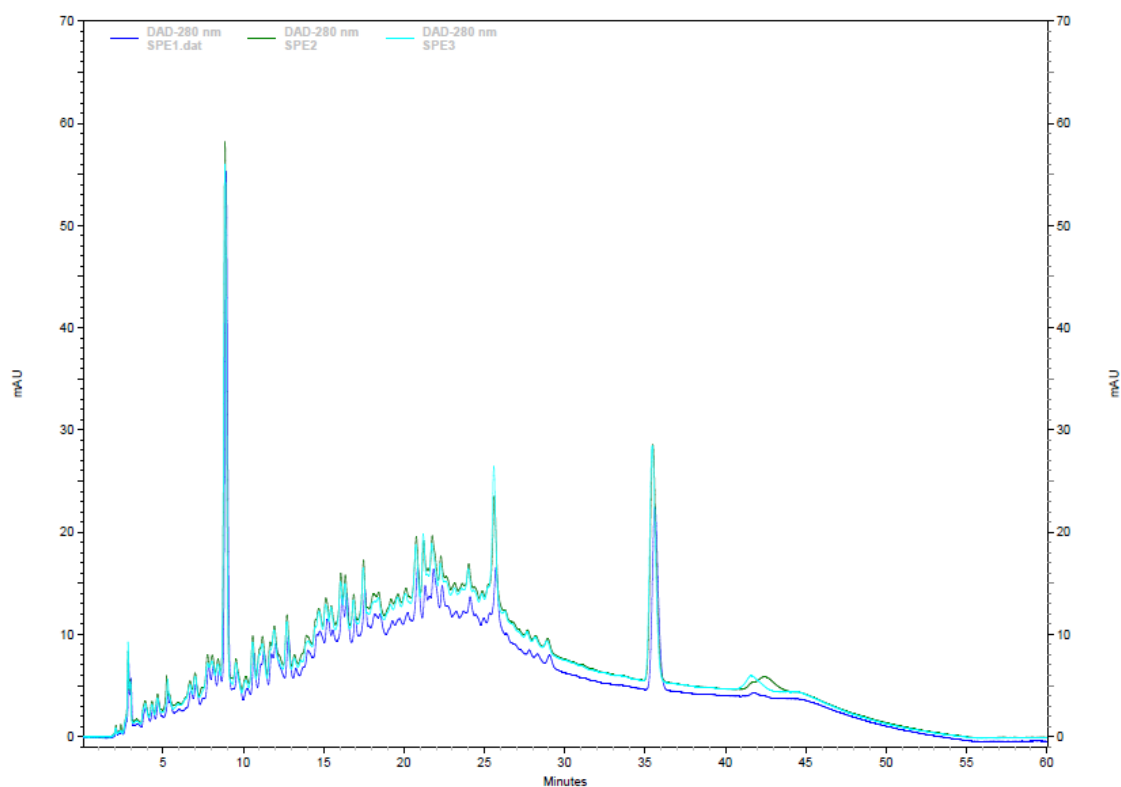


Figura 31 - Cromatogramas a 280 nm da extração por SPE analisada pelo método 1

Observando os três cromatogramas verifica-se a semelhança ente eles, o que significa que os resultados foram iguais para as três extrações por SPE. Nesta análise denota-se a presença de dezasseis picos correspondentes a compostos fenólicos, dois dos quais pertencem a um glicosídeo e a um derivado do aldeído protocatecuico, pois os seus espectros são iguais ao do

padrão do aldeído protocatecuico mas o tempo de retenção não são coincidentes. Identificaram-se ainda o ácido gálico, o aldeído protocatecuico e a vanilina pela correspondência do tempo de retenção e dos espectros destes com os dos padrões. A concentração dos compostos identificados foi calculada através das equações das retas de regressão linear dos padrões (Anexos). Na tabela 14 estão apresentados estes resultados.

Tabela 14 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da extração por SPE analisada pelo método 1 e respectivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
4,27	271	Ácido gálico	160345	0,66
4,69	282		270222	
5,28	270 e 310		404253	
7,03	273 e 311	Glicosídeo Aldeído Protocatecuico	366240	
8,59	277 e 308	Aldeído Protocatecuico	481466	1,12
8,89	276		3018084	
10,64	274 e 311	Derivado do Aldeído Protocatecuico	541804	
12,76	274		786530	
13,94	278 e 310	Vanilina	1133395	2,93
16,41	280 e 310		1039543	
17,53	281		1440115	
20,82	278		1696952	
21,29	260, 290 e 310		948050	
21,82	278		1669126	
25,68	279, 310 e 350		2206979	
35,56	276, 301 e 333		2463703	

4.6.3 Extração por Ultra Sons

A extração por ultra sons de compostos fenólicos da amostra inicial foi realizada inicialmente com cinco solventes, o éter dietílico, o diclorometano, o acetato de etilo, o metanol e o clorofórmio.

A extração com metanol não deu resultado, a fase aquosa e a fase orgânica desta extração não se separaram.

As amostras resultantes da extração com o éter dietílico, o diclorometano, o acetato de etilo e o clorofórmio foram analisadas pelo método 1 e os cromatogramas obtidos nestas análises foram sobrepostos e estão apresentados na figura 32.

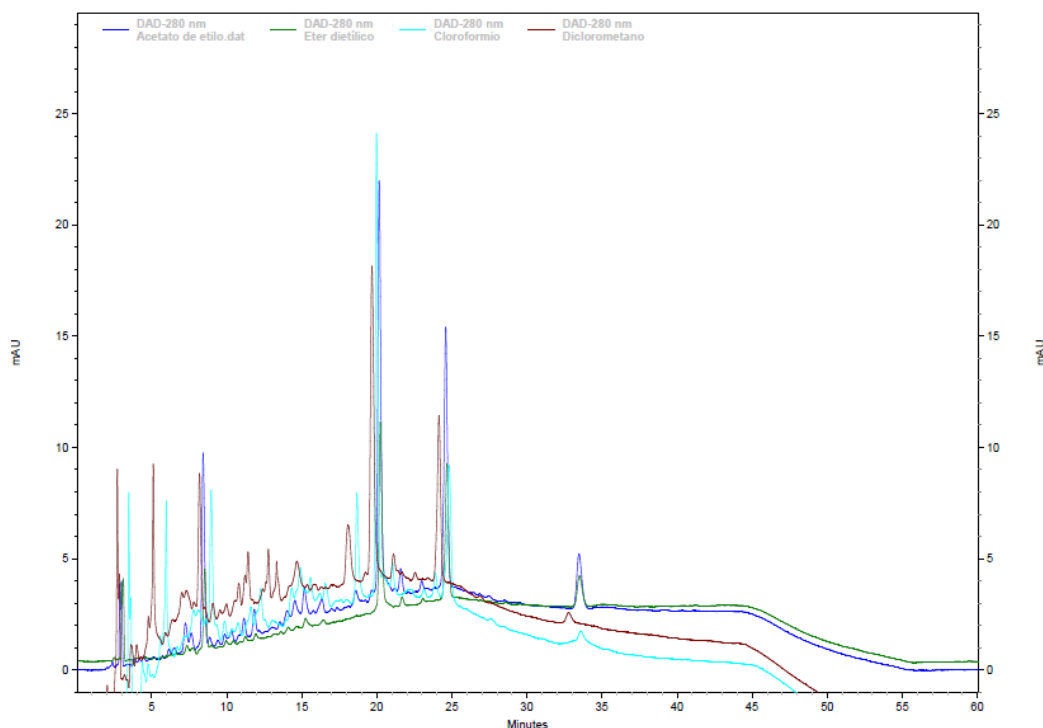


Figura 32 - Cromatogramas a 280 nm dos extratos com vários solventes utilizados na extração por ultra sons, analisados pelo método 1

Pela observação da figura 32 verifica-se que os melhores solventes para a extração são o éter dietílico e o acetato de etilo, pois são os que apresentam um cromatograma com picos mais intensos, ou seja com uma área maior. Assim, foram testados vários tempos de extração para os dois solventes selecionados.

As figuras 33 e 34 correspondem a sobreposição dos cromatogramas das amostras extraídas por ultra sons com éter dietílico e acetato de etilo, respetivamente, aos diferentes tempos.

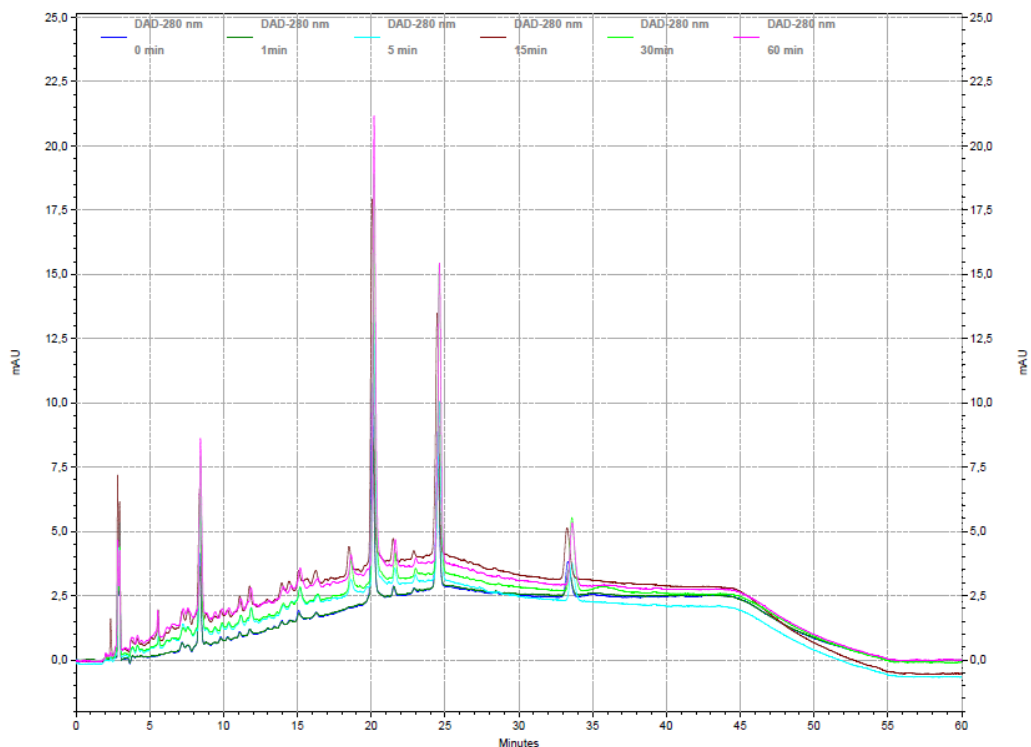


Figura 33 - Cromatogramas a 280 nm dos vários tempos utilizados na extração por ultra sons com éter dietílico, analisados pelo método 1

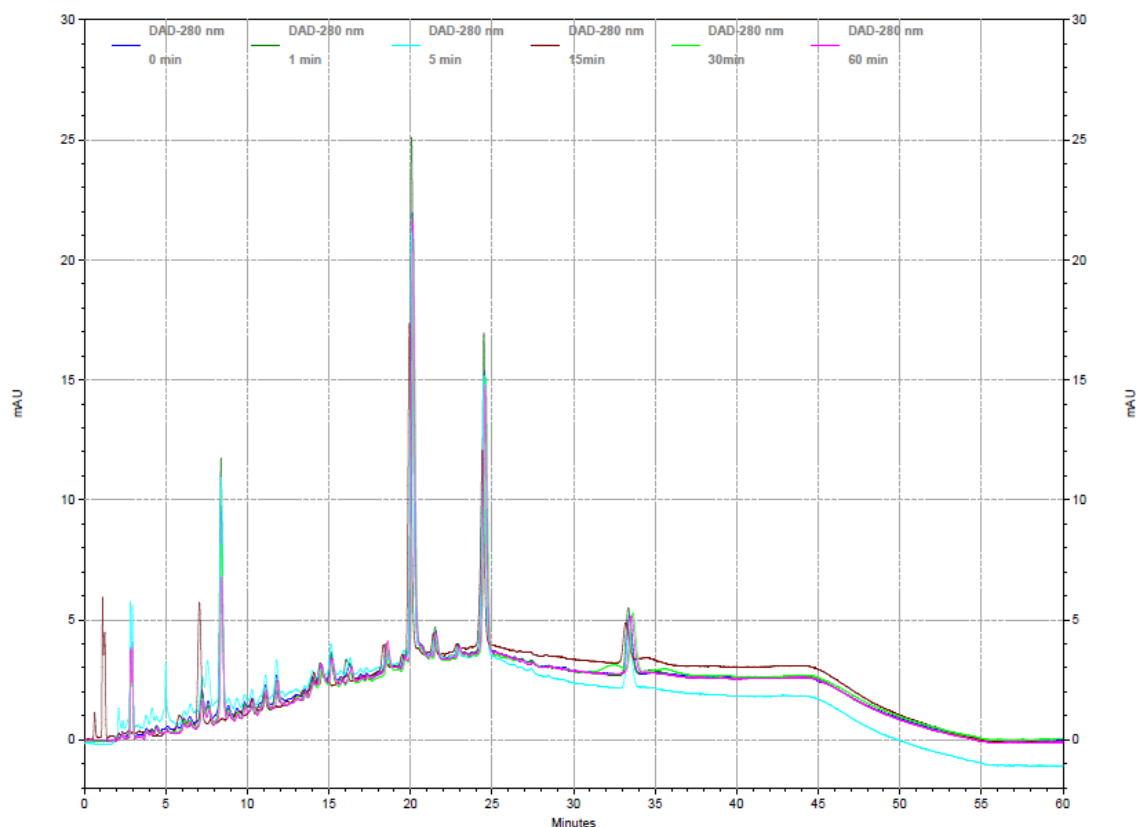


Figura 34 - Cromatogramas a 280 nm dos vários tempos utilizados na extração por ultra sons com acetato de etilo, analisados pelo método 1

Comparando as figuras 33 e 34 verifica-se a semelhança entre os cromatogramas da amostra extraída com éter dietílico e a com acetato de etilo. Nesta análise observa-se que o tempo não influencia a eficiência da extração. Verifica-se a presença de quatro compostos fenólicos, dos

quais se identifica o álcool vanílico pela correspondência do tempo de retenção e do espectro obtido com os do respectivo padrão. A concentração do álcool vanílico foi calculada pela substituição do “y” da equação da reta de regressão linear do padrão (Anexos) pela área do pico correspondente ao álcool vanílico. Estes resultados estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da extração por ultra sons analisada pelo método 1 e respectivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
7,65	276	Álcool Vanílico	295305	3,00
19,93	259, 307 e 337		993392	
24,42	279, 310 e 352		853744	
33,20	266 e 328		185717	

4.6.4 Hidrólise ácida

Na extração por hidrólise ácida foram testadas três temperaturas: 40, 50 e 70°C e as amostras resultantes das extrações analisadas pelo método 1. Os cromatogramas obtidos foram sobrepostos e estão apresentados na figura 35.

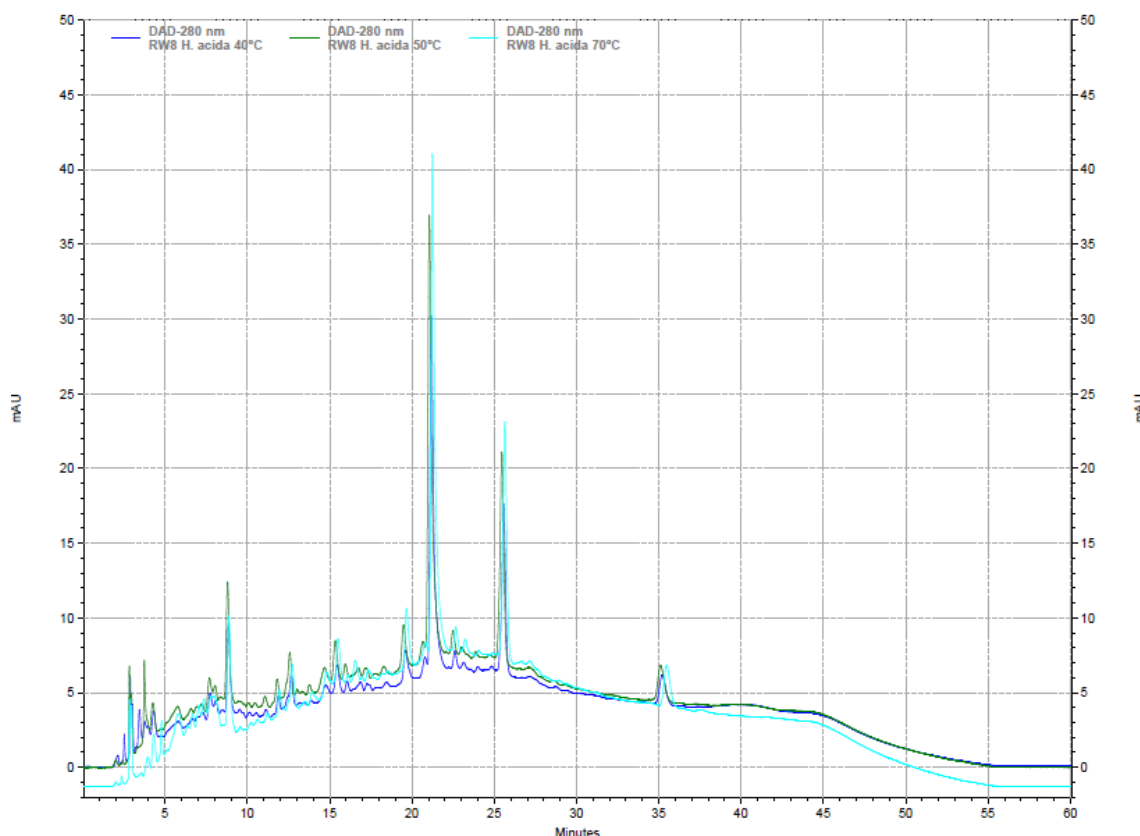


Figura 35 - Cromatogramas a 280 nm das várias temperaturas utilizadas na extração por hidrólise ácida, analisados pelo método 1

Observando a figura 35 verifica-se que os cromatogramas para as três temperaturas são semelhantes, o que nos leva a concluir que a extração com 40°C é tão eficiente como com 70°C.

A figura 36 mostra a sobreposição do cromatograma obtido para amostra extraída a 70°C e o do controlo da reação, que foi exposto as mesma condições reacionais, exceto a presença de ácido clorídrico.

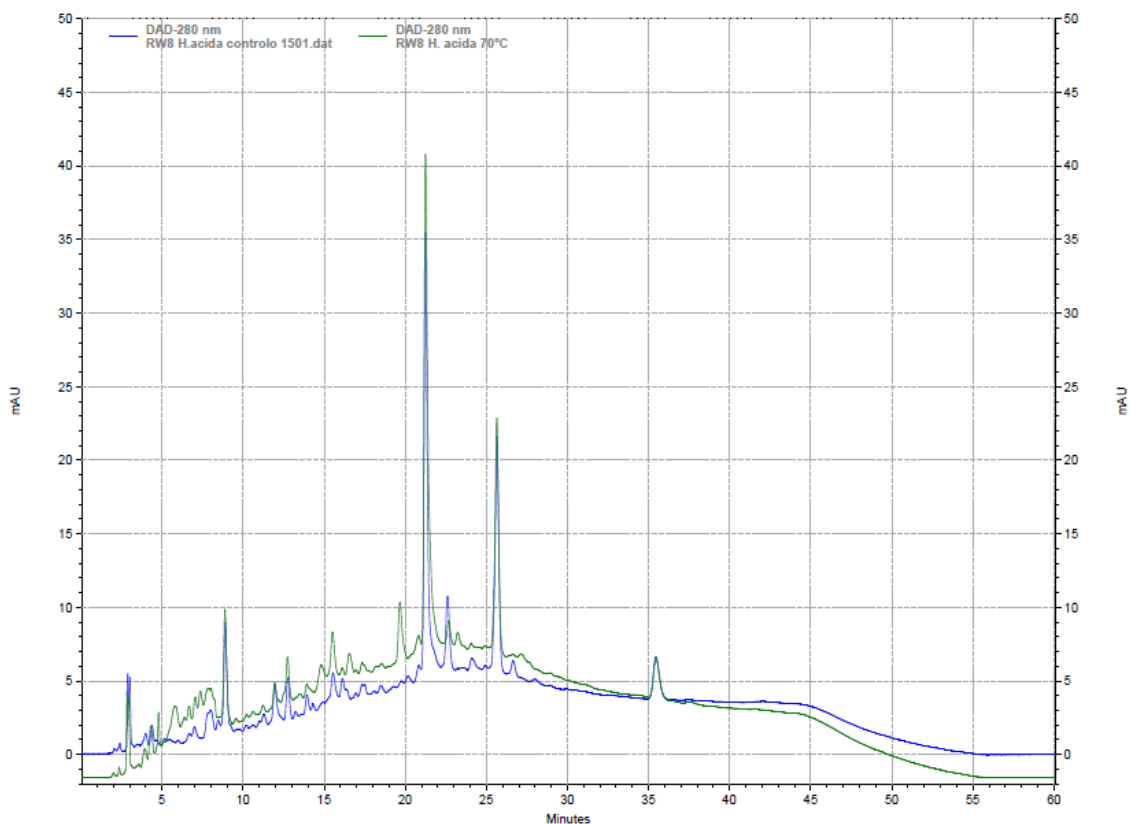


Figura 36 - Cromatogramas a 280 nm da extração por hidrólise ácida a 70°C e do controlo, analisados pelo método 1

Os dois cromatogramas não apresentam diferenças significativas, o que nos leva a concluir que o que influencia a extração dos compostos fenólicos da amostra é a temperatura e não a presença do ácido.

Analisando o cromatograma obtido para a extração a 70°C verifica-se a presença de catorze picos correspondentes a compostos fenólicos, nos quais se identifica o ácido gálico, o ácido vanílico e a vanilina pela comparação dos tempos de retenção e espectros obtidos com os dos padrões. A concentração dos compostos fenólicos identificados foi calculada através da equação da reta de regressão linear dos padrões (Anexos). Estes resultados constam na tabela 16.

Tabela 16 - Tempo de retenção (T_R), comprimento de onda máximo (λ_{max}) dos picos do cromatograma a 280 nm da extração por hidrólise ácida analisada pelo método 1 e respectivos compostos, áreas e concentrações

Tr (min)	λ_{max} (nm)	Composto	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
4,32	270	Ácido Gálico	199780	0,79
5,78	254 e 370		684143	
7,37	260 e 316		371778	
8,89	276		842889	
11,96	259 e 290	Ácido Vanílico	691521	1,89
12,73	269		753051	
13,91	280 e 310	Vanilina	581274	1,50
14,78	280 e 350		812487	
15,51	272 e 360		1006162	
16,56	264 e 322		661612	
19,66	259 e 343		1428050	
21,24	259, 307 e 338		3857752	
25,56	279, 300 e 351		2034548	
35,49	275, 300 e 330		439461	

A análise cromatográfica mostra a presença de dois compostos fenólicos na amostra inicial e nas amostras C1 pH 4,91, C11S pH 1,77, AFL e nas extraídas por SPE, ultra sons e hidrólise ácida. Um dos compostos possui um tempo de retenção perto dos 21 min e o outro perto dos 25 min, as figuras 37 e 38 mostram os espectros dos dois compostos fenólicos.

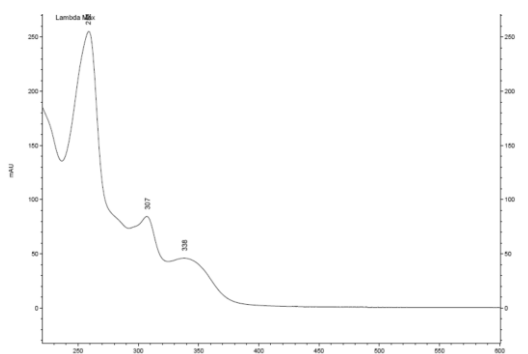


Figura 37 - Espectro do composto fenólico com tempo de retenção perto dos 21 min

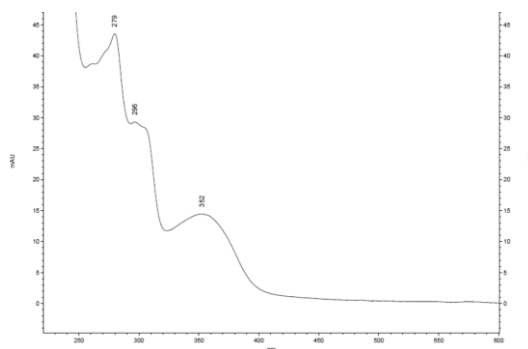


Figura 38 - Espectro do composto fenólico com tempo de retenção perto dos 25 min

4.7 Determinação dos fenóis totais

A determinação da quantidade de fenóis totais nas amostras resultantes das várias extrações e da inicial foi realizada pelo método de Folin-Cionalteu, método que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com formação de complexo azul, cuja intensidade aumenta linearmente a 765nm.

Para a quantificação dos fenóis totais, inicialmente foi contruída a reta de calibração do ácido gálico (figura 39), utilizando as diferentes absorvancias a 765nm em função das concentrações de ácido gálico. A reta de calibração foi usada para calcular o conteúdo de compostos fenólicos presente nas diferentes amostras, em equivalente em ácido gálico. Estes valores encontram-se registados na tabela 17.

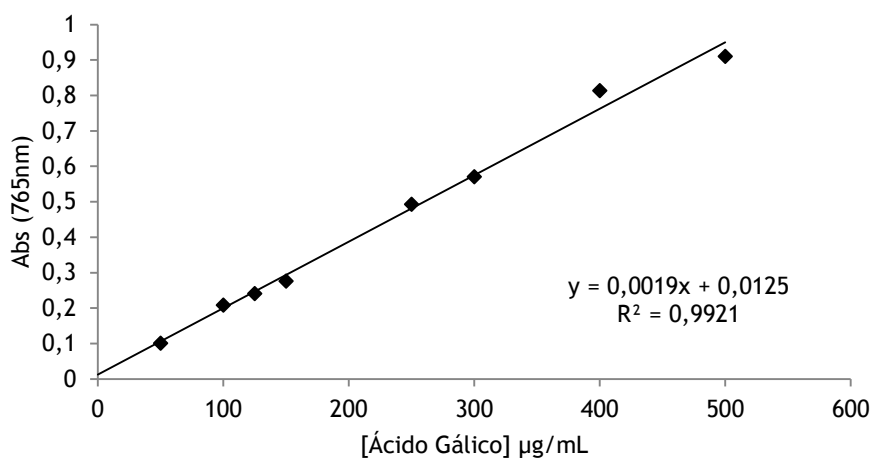


Figura 39 - Reta de calibração do ácido gálico

Tabela 17 - Equivalentes de ácido gálico (µg/mL) nas amostras das diferentes extrações

Extração	Amostra	Equivalentes de Ácido Gálico (µg/mL)
-	Inicial	261,49 ± 0,001
Acetato de etilo	C1 pH 4,91	189,91 ± 0,008
	C11S pH 1,77	132,19 ± 0,001
	Resíduo pH 1,77	42,72 ± 0,007
	AFL	166,05 ± 0,017
	AFI	8,16 ± 0,001
	AFC	186,23 ± 0,042
SPE		84,30 ± 0,007
Ultra sons		222,72 ± 0,029
Hidrólise ácida		664,74 ± 0,053

Com os valores apresentados na tabela 17 foi contruído um gráfico de barras (figura 40) para facilitar a análise do teor em equivalentes de ácido gálico nas diferentes amostras.

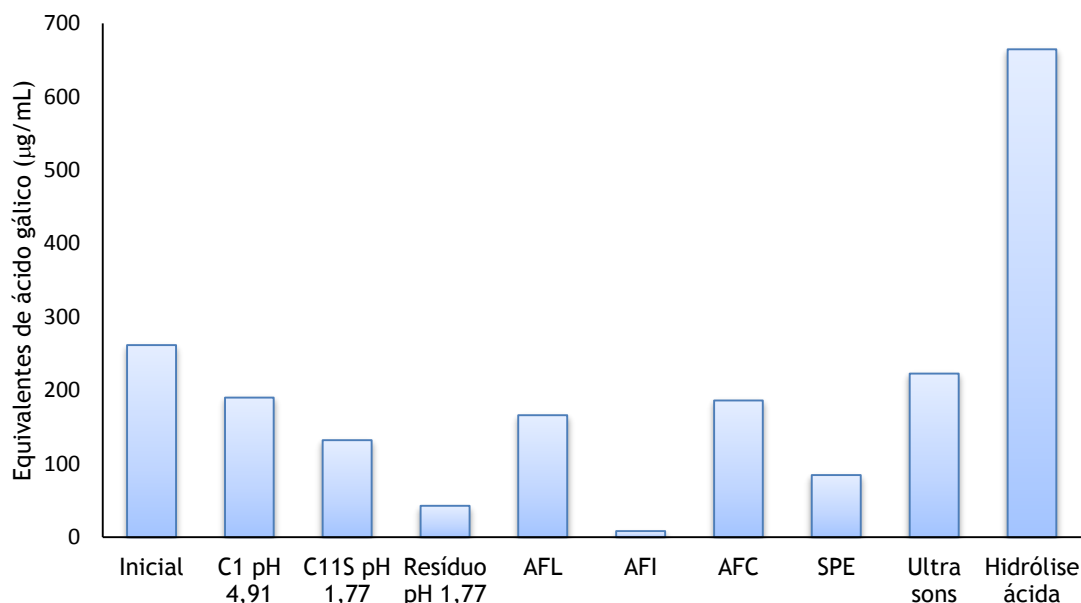


Figura 40 - Equivalentes de Ácido Gálico (µg/mL) nas amostras das diferentes extrações

Pela observação do gráfico verifica-se que a amostra extraída por hidrólise ácida possui a maior quantidade de equivalentes em ácido gálico, o que nos leva a concluir que a hidrólise ácida foi a mais eficaz na separação dos glicosídeos do ácido gálico.

A análise do gráfico mostra também que as amostras Resíduo pH 1,77, AFI e a extraída por SPE são as que apresentam um menor conteúdo em equivalentes de ácido gálico.

4.8 Análise da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes nas diferentes amostras foi avaliada pelo método do DPPH, que se baseia na transferência de elétrons por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura. O DPPH é reduzido a difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção.

A atividade inibitória foi calculada pela fórmula 4:

$$I\% = \left[\frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \right] \times 100 \quad (5)$$

onde a Abs_0 é a absorvância do branco e Abs_1 é a absorvância na presença do composto, em diferentes concentrações.

Para determinar concentração de cada amostra capaz de inibir 50% de DPPH (IC_{50}) foi construído um gráfico da concentração das amostras *versus* o correspondente efeito inibitório (%) e o “y” da equação da reta substituído por 50, os valores estão registados na tabela 18.

De modo a se poder calcular a concentração de DPPH remanescente em cada tubo, construiu-se uma reta de calibração do DPPH (figura 41) e através da substituição do “y” da equação da reta pela absorvância do branco obteve-se a concentração do DPPH.

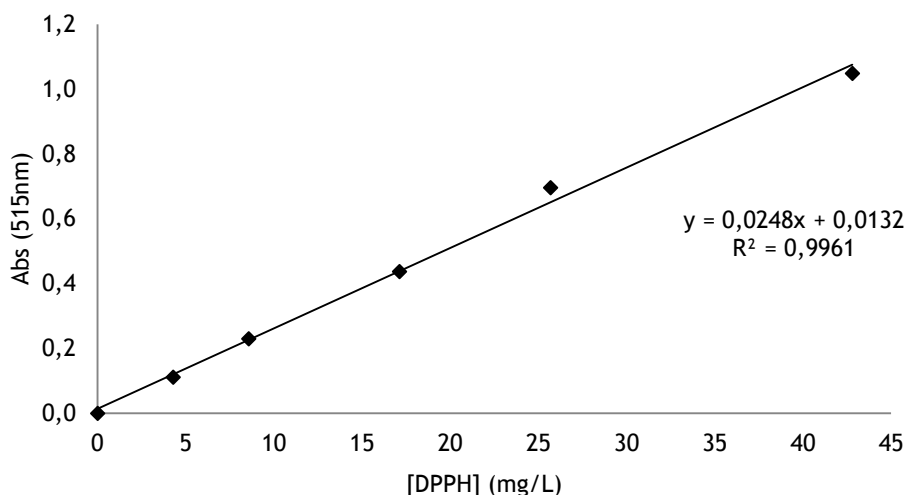


Figura 41 - Retas de calibração do DPPH

O índice de atividade antioxidante (AAI) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$AAI = \frac{\text{Concentração final de DPPH } (\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})}{IC_{50} (\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})}$$

Os valores da AAI estão registados na tabela 18, e foi ainda avaliada como fraca quando AAI < 0,5; moderada quando AAI entre 0,5 e 1,0; forte quando AAI entre 1,0 e 2,0; e muito forte quando AAI > 2,0 (Scherer & Godoy 2009).

Tabela 18 - IC₅₀ e índice de atividade antioxidante (AAI) nas amostras das diferentes extrações

Extração	Amostra	IC ₅₀	AAI	Efeito Antioxidante
Acetato de etilo	C1 pH 4,91	564,54	4,42	Muito Forte
	C11S pH 1,77	93,36	21,11	Muito Forte
	Resíduo pH 1,77	329,70	4,70	Muito Forte
	AFL	91,07	22,97	Muito Forte
	AFI	3914,58	0,49	Fraca
	AFC	4232,13	0,48	Fraca
SPE		799,69	2,97	Muito Forte
Ultra sons		1314,42	1,86	Forte
Hidrólise ácida		928,87	2,63	Muito Forte

Os resultados da tabela 18 mostram que a amostra AFI e AFC possuem um efeito oxidante fraco. A amostra extraída por ultra sons apresenta um efeito oxidante forte, enquanto que as restantes apresentam um efeito oxidante muito forte. No caso das amostras C11S pH 1,77 e AFL o efeito oxidante é muito forte, mas quando comparados os valores de atividade antioxidante destas amostras com os das restantes amostra que possuem um efeito oxidante muito forte, verifica-se que o valor de atividade antioxidante destas é muito superior.

4.9 Derivatização

A derivatização da amostra foi realizada com um agente de derivatização, o BSTFA 5% TCMS, e inicialmente foram testados três solventes: a piridina, o tetra-hidrofurano e o acetato de etilo, pela análise dos cromatogramas verificou-se que o melhor solvente era o acetato de etilo. Assim o solvente utilizado na derivatização dos padrões de compostos fenólicos e da amostra AFL.

Foram derivatizados compostos fenólicos padrão para determinar o tempo de retenção e os espectros de massa destes. O tempo de retenção, ião molecular, pico base e outros picos dos compostos fenólicos padrão estão apresentados na tabela 19.

Os resultados da derivatização da amostra AFL não foram os desejados, uma vez que o cromatograma obtido não apresentou picos bem definidos, não se conseguindo assim identificar nenhum composto fenólico na amostra. Estes resultados levam-nos a concluir que o método derivatização e/ou o método de separação por GC-MS utilizados não foram os mais adequados para este tipo de amostras.

Tabela 19 - Tempo de retenção (T_R), íon molecular (M⁺), pico base (Pb) e outros picos de compostos fenólicos padrão derivatizados

Tr (min)	Compostos derivatizados	M ⁺	Pb	Outros picos
11,245	Fenol	166	151	32
16,239	Octanol	204	187	41/69/73/75/89/101/103/188
18,662	Ácido Benzoico	194	32	40/51/77/105/135/179/180
21,423	Aldeído Cinâmico	132	131	51/77/78/103/104
21,657	Aldeído Salicílico	194	179	45/73/77/91/135/149/161/180
27,424	Ácido Salicílico	282*	267	32/45/73/135/209
28,423	Vanilina	224	32	73/193/194/195/209/224
28,677	Ácido Cinâmico	220	32	40/75/77/103/131/161
30,498	Aldeído Protocatecuico	282	73	32/45/193/267
34,582	Ácido Vanílico	312	297	32/45/73/126/133/136/165/193/223/224/253/254/267/268/282
36,089	Ácido Protocatecuico	370	193	44/73/132/147/165/223/267/281/311/255
36,765	Coniferaldeido	250	220	45/73/89/165,9/177/192/219/251
39,724	Ácido Gálico	458	73	281
43,019	Ácido Ferúlico	338	32	73/75/146/219/249/279/293/308/309/323/338

*Pico não visível

5 CAPÍTULO

Conclusão

O trabalho apresentado nesta dissertação consistiu essencialmente na utilização de quatro técnicas, para extrair compostos fenólicos do efluente da indústria corticeira, que posteriormente foram identificados e quantificados através de análises por HPLC-DAD. A atividade antioxidante dos extratos resultantes foi avaliada recorrendo ao método do DPPH e o teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em equivalentes de ácido gálico.

Foram desenvolvidos dois métodos analíticos de HPLC, tendo-se depois selecionado o melhor para desenvolver o trabalho, sendo aquele onde foram identificados um maior número de compostos fenólicos. Nas análises dos extratos realizadas por HPLC-DAD identificaram-se e quantificaram-se onze compostos fenólicos, sendo cinco deles ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido cafeico e ácido ferúlico), três aldeídos fenólicos (vanilina, aldeído protocatecuico e coniferaldeído), um álcool fenólico (álcool vanílico) e dois flavonoides (eriodictiol e narigenina).

Os resultados da determinação do teor em compostos fenólicos totais nos diferentes extratos mostram que a hidrólise ácida é a que apresenta um maior valor de equivalentes em ácido gálico ($664,74 \pm 0,053 \mu\text{g/mL}$), podendo se assim concluir que este é o melhor método para a obtenção de compostos fenólicos.

Em relação a atividade antioxidante, as amostras AFI e AFC apresentam atividades fracas (0,49 e 0,48, respetivamente), o que indica que estas amostras não possuem potencial como antioxidantes. A amostra extraída por ultra sons apresentou uma atividade forte (1,86) e as restantes muito forte (2,63; 2,97; 4,42; 4,70; 21,11; 22,97), o que leva a concluir que os compostos fenólicos presentes nestas amostras têm um grande potencial antioxidante.

Em conclusão final, este estudo mostra que o efluente da indústria corticeira detém um grande potencial como fonte de compostos fenólicos e sua valorização como antioxidantes naturais noutras indústrias, tais como a alimentar e a de cosméticos, reaproveitando assim este produto de forma a aumentar a rentabilidade económica do sector industrial da cortiça e obter a redução da carga poluente.

Perspetivas de trabalhos futuros:

Relativamente ao trabalho futuro que poderá ser desenvolvido para dar continuidade ao estudo aqui apresentado, podemos apontar algumas sugestões, tais como:

- Fazer a recolha da amostra a saída do tanque de cozimento.
- Tentar isolar e purificar os compostos fenólicos presentes na amostra.
- Tentar identificar por outros métodos espectroscópicos os compostos fenólicos que foram detetados mas não identificados.
- Aplicar outras técnicas de derivatização e outros métodos de análise de GC-MS.
- Melhorar as técnicas de extração para a posterior reutilização dos compostos com poder antioxidante, em outras indústrias.

6 CAPÍTULO

Referências bibliográficas

- Abbas, H.H., Elbashir, A. & Aboul-Enein, H.Y., 2014. Chromatographic Methods for Analysis of Triazine Herbicides. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(3), 226-240.
- Acero, J.L., Benitez, F.J., Heredia J.B. & Leal A.I., 2004. Chemical treatment of cork-processing wastewaters for potential reuse. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(10), 1065-1072.
- Alonso, A.G., Grande, B.C. & Gándara, J.S., 2004. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 175-180.
- Angelo, P.M. & Jorge, N., 2007. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão Phenolic compounds in foods - A brief review. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66(1), 1-9.
- APCOR, 2015, Cortiça - Cork 2015, Portuguese Cork Association, Santa Maria de Lamas, Portugal
- Arceusz, A., Wesolowski, M. & Konieczynski, P., 2013. Methods for Extraction and Determination of Phenolic Acids in Medicinal Plants: A Review. *Natural Product Communications*, 8, 1821-1829.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A. & Del Rio, J.A., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457-462.
- Benítez, F.J., Acero, J.L. & Leal, A.I., 2006. Application of microfiltration and ultrafiltration processes to cork processing wastewaters and assessment of the membrane fouling. *Separation and Purification Technology*, 50(3), 354-364.
- Benítez, J.F., Acero, J.L. & Leal, A.I., 2008 (a). Treatment of wastewaters from the cork process industry by using ultrafiltration membranes. *Desalination*, 229(1-3), 156-169.
- Benítez, F.J., Acero, J.L., Leal, A.I. & Real, F.J., 2008 (b). Ozone and membrane filtration based strategies for the treatment of cork processing wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 373-380.
- Benítez, F.J., Acero, J.L., Leal, A.I. & González M., 2009. The use of ultrafiltration and nanofiltration membranes for the purification of cork processing wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2-3), 1438-1445.

- Bernardo, M., Santos, A., Cantinho P. & Minhalma, M., 2011. Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: A biodegradation and valorisation study. *Water Research*, 45(2), 904-912.
- Boots, A.W., Haenen, G.R.M.M. & Bast, A., 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2-3), 325-337.
- Broinizi, P.R.B., Andrade-Wartha E.R.S., Silva A.M.O., Novoa, A.J.V., Torres, R.P., Azeredo H.M.C., Alves, R.E. & Mancini-Filho, J., 2007. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(4), 902-908.
- Conde, E., Cadahía, E., García-Vallejo, M.C. & Gonzáles-Adrados, J.R., 1998 (a). Chemical Characterization of Reproduction Cork from Spanish *Quercus Suber*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 18(4), 447-469.
- Conde, E., Cadahía, E., García-Vallejo M.C. & Simón B.F., 1998 (b). Polyphenolic Composition of *Quercus suber* Cork from Different Spanish Provenances. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(8), 3166-3171.
- Conde, E., García-Vallejo, M.C. & Cadahía, E., 1999. Waxes composition of reproduction cork from *Quercus suber* and its variability throughout the industrial processing. *Wood Science and Technology*, 33(3), 229-244.
- Deng, J., Cheng, W. & Yang, G., 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430-1435.
- Dvořáková, M., Huín P., Karabín, M. & Dostálek P., 2007. Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(4), 182-188.
- Escarpa, A. & Gonzalez, M.C., 2001. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 119-127.
- Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W. & Walker, R.B., 2010. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139-8144.

- Fernandes, A., Santos D., Pacheco, M.J., Ciriaco, L., Simões, R., Gomes, A.C. & Lopes, A., 2014. Electrochemical treatment of cork boiling wastewater with a boron-doped diamond anode. *Environmental Technology*, 36(1), 26-35.
- Fortes, M.A., Rosa, M.E. & Pereira, H., 2004. *A Cortiça*, Lisboa: IST Press.
- Geraldes, V., Minhalma, M., Pinho, M.N., Anil, A., Ozgunay, H., Bitlisli, Sari, O., 2009. Nanofiltration of cork wastewaters and their possible use in leather industry as tanning agents. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(3), 353-357.
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A. & García-Viguera, C., 2010. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 327-345.
- Heredia, J.B., Domínguez, J.R. & López, R., 2004. Advanced oxidation of cork-processing wastewater using Fenton's reagent: Kinetics and stoichiometry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(4), 407-412.
- Junker-Buchheit, A. & Witzendacher, M., 1996. Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 737(1), 67-74.
- Machado, M., 2005. Degradação biológica de polifenóis: Isolamento e Caracterização de Bactérias Mesofílicas e Termofílicas de Água de Cozedura de Cortiça, *Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto*.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S. & Lima, J.L.F.C., 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., Provan, G. & Chesson, A., 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3), 323-330.
- Mendonça, E., Pereira, P., Martins, A. & Anselmo, A.M., 2004. Fungal biodegradation and detoxification of cork boiling wastewaters. *Engineering in Life Sciences*, 4(2), 144-149.
- Minhalma, M. & Pinho, M.N., 2001. Tannic-membrane interactions on ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 22-23, 479-488.

- Mira, N.V.M., Barros, R.M.C., Schiocchet, M.A., Noldin, J.A., Lanfer-Marquez, U.M., 2008. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.) *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(4), pp.994-1002.
- Moreira, A.V.B. & Mancini-Filho, J., 2004. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutricao*, 17(4), 411-424.
- Naczki, M. & Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- Nakatani, N., 1997. Antioxidants from spices and herbs. In F. Shahidi, ed. *Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications*. AOCS Press, 64-75.
- Pasrija, D. & Anandharamakrishnan, C., 2015. Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 935-950.
- Plazonić, A., Bucar, F., Maleš, Ž., Mornar, A., Nigović, B. & Kujundžić, N., 2009. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 14(7), 2466-90.
- Pourmorad, F., Hosseini-mehr, S.J. & Shahabimajid, N., 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.
- Queiroz, S.C.N., Collins, C.H. & Jardim, I.C.S.F., 2001. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, 24(1), pp.68-76.
- Santos, D., 2013. Redução da toxicidade e aumento da biodegradabilidade dos efluentes do cozimento da cortiça através da integração de tecnologias de membrana e ozonização, *Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior*.
- Santos, A.O.S., Pinto, P.C.R.O., Silvestre, A.J.D. & Neto, C.P., 2010. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products*, 31(3), 521-526.
- Scherer, R. & Godoy, H.T., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654-658.

- Shami, N. & Moreira, E., 2004. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutricao*, 17.
- Silva, P., 2012. Determinação de compostos fenólicos por HPLC, *Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior*.
- Silva, S.P., Sabino, M.A., Fernandes, E.M., Correlo, V.M., Boesel, L.F. & Reis R.L., 2005. Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 53(4), 256-256.
- Silva, T., 2011. *Avaliação dos antioxidantes presentes nas águas de processo da indústria corticeira, Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa*.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. & Glajch, J.L., 1997. *Practical HPLC method development 2nd ed.*, New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Spínola, V., Pinto, J. & Castilho, P.C., 2015. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 173, 14-30.
- Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268-3295.
- Szydłowska-Czerniak, A., Tulodziecka, A., Karlovits G. & Szlyk, E., 2015. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from mustard seed cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), 1445-1453.
- Teixeira, A.R.S., Santos, J.L.C. & Crespo, J.G., 2009. Sustainable membrane-based process for valorisation of cork boiling wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 66(1), 35-44.

Anexos

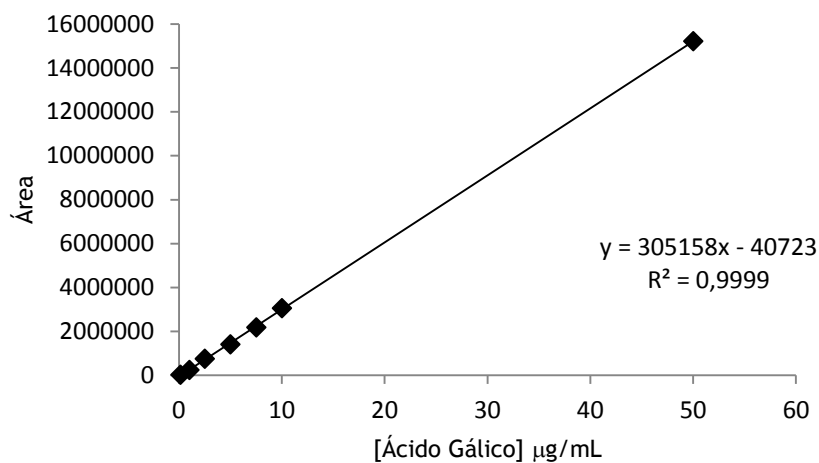


Figura 42 - Reta de calibração do ácido gálico

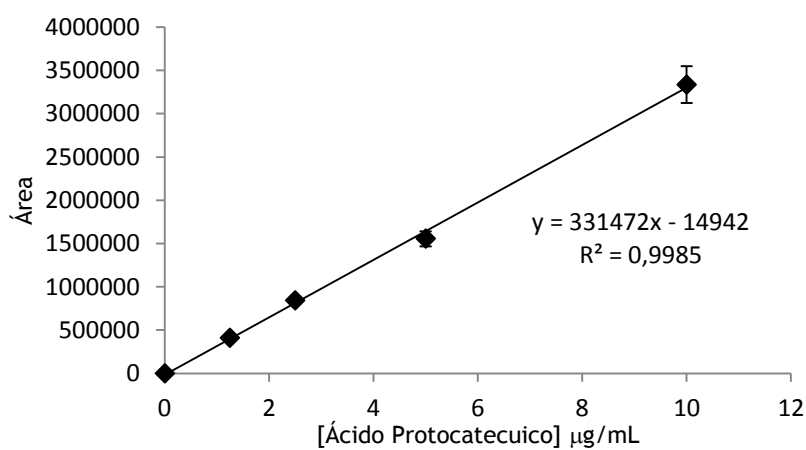


Figura 43 - Reta de Calibração do ácido protocatecuico

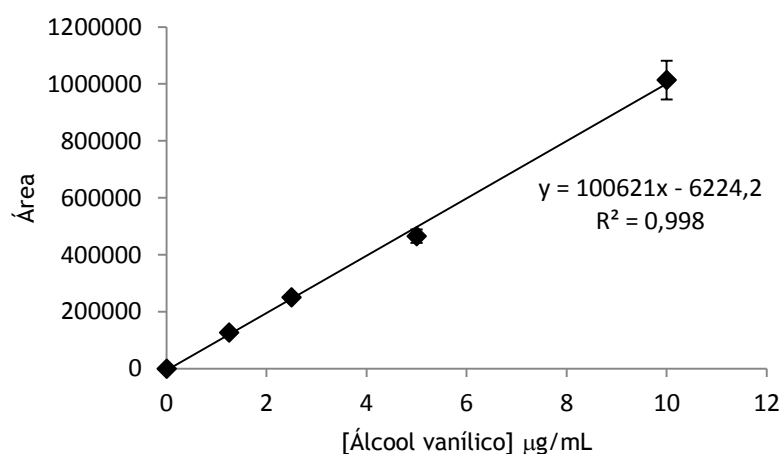


Figura 44 - Reta de calibração do álcool vanílico

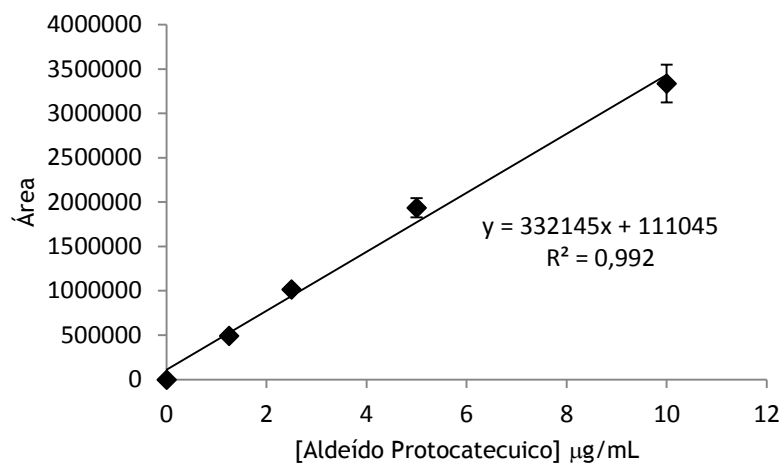


Figura 45 - Reta de calibração do aldeído protocatecuico

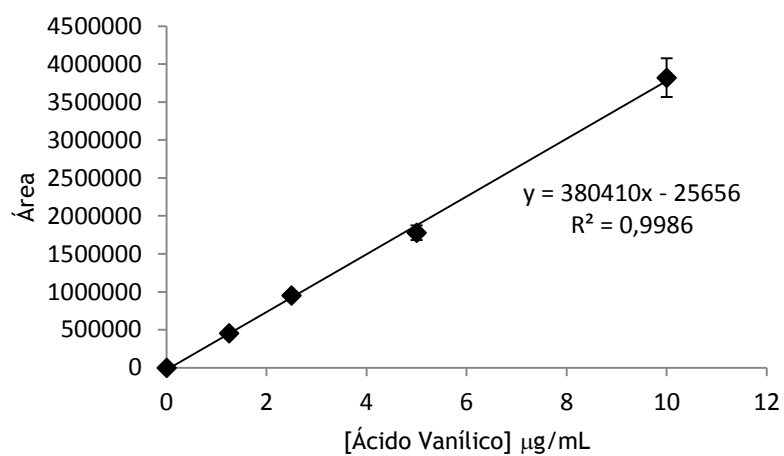


Figura 46 - Reta de calibração do ácido vanílico

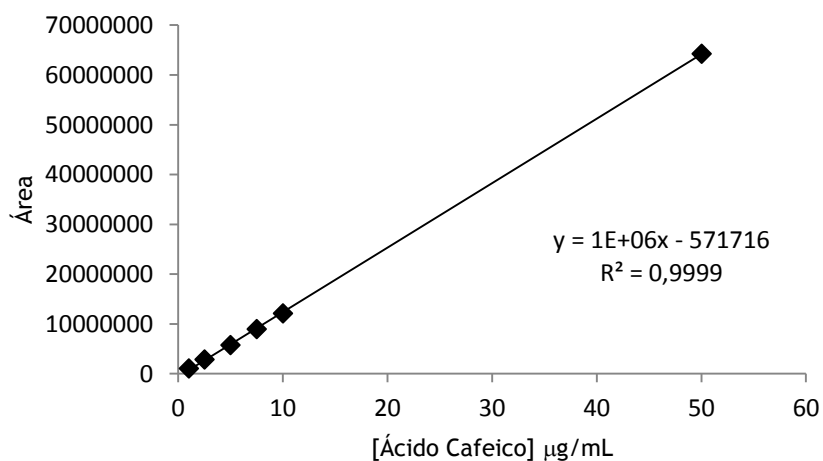


Figura 47 - Reta de Calibração do ácido cafeico

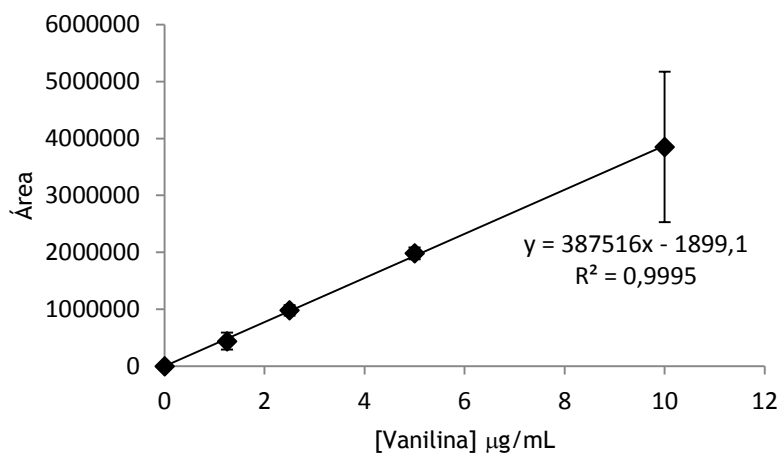


Figura 48 - Reta de calibração da vanilina

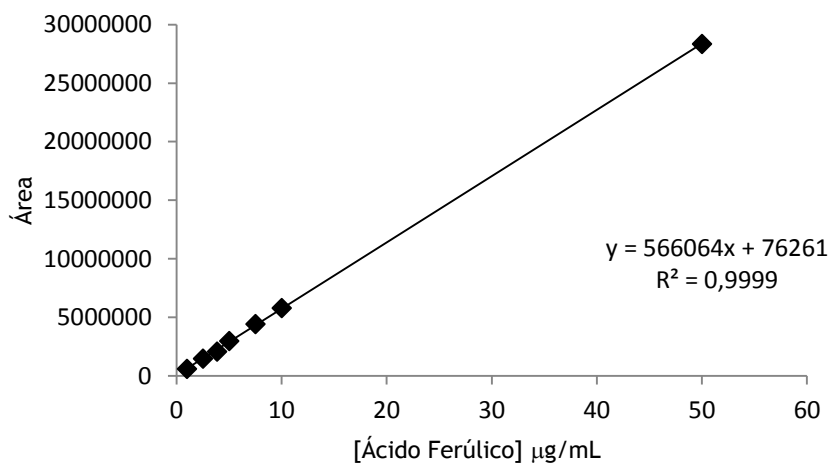


Figura 49 - Reta de calibração do Ácido ferúlico

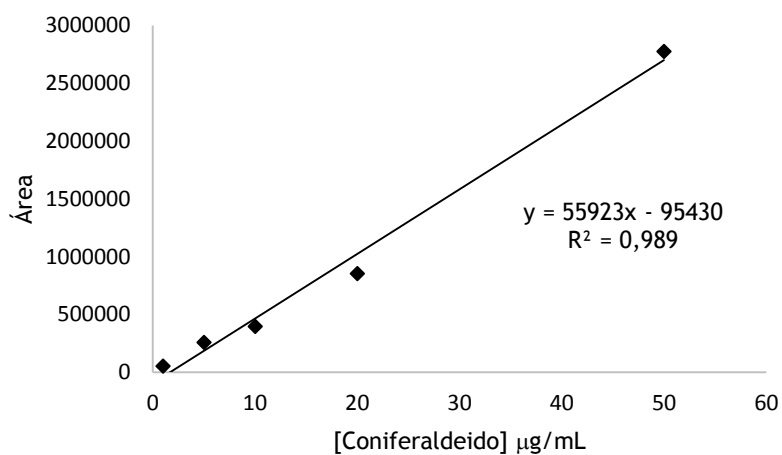


Figura 50 - Reta de calibração do Coniferaldeído

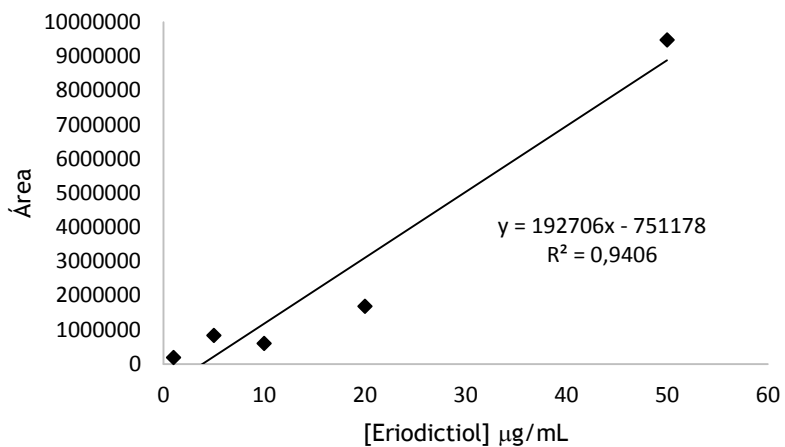


Figura 51 - Reta de calibração do Eriodictiol

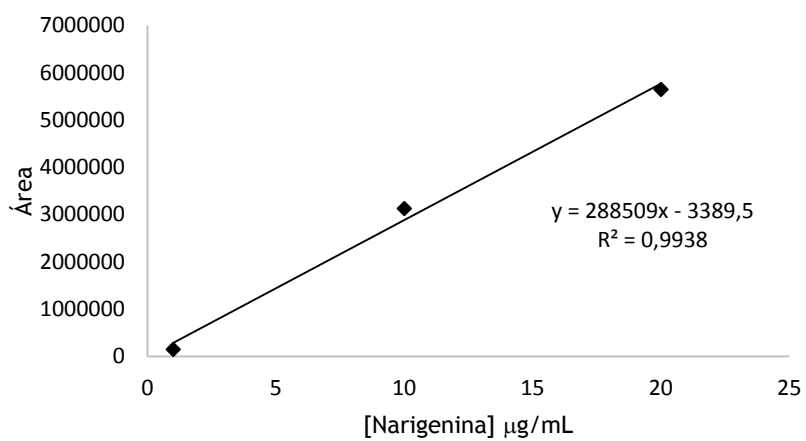


Figura 52 - Reta de calibração da Narigenina