



Extração supercrítica de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) e de compostos bioativos presentes na cortiça natural e sua retenção em polímeros molecularmente impressos

Cátia Juliana Pereira Afonso

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

Orientada por:

Professor Doutor Rolando Carlos Pereira Simões Dias

Dezembro, 2018

Agradecimentos

A realização da presente Dissertação foi possível graças a todas as pessoas que contribuíram para a sua execução, às quais manifesto os meus maiores e mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, ao meu Orientador Professor Doutor Rolando Dias, por toda a dedicação, conhecimento científico, apoio, disponibilidade, motivação, sugestões e críticas que me transmitiu ao longo de todo o trabalho.

Um especial agradecimento pelo apoio dos seguintes projetos:

- NORTE-01-0145-FEDER-000006 (financiado pelo NORTE2020 através do PT2020 e FEDER); POCI-01-0145-FEDER-006984 (financiado pelo FEDER através do COMPETE2020 – POCI e por fundos nacionais através da FCT).
- ZeroTCA – contrato de investigação entre a Amorim & Irmãos e FEUP/LEPABE. Neste contexto, agradeço à corticeira Amorim & Irmãos o fornecimento de materiais de cortiça e as análises SPME-GC-ECD.

Agradeço a todos os meus colegas do laboratório LSRE pelo apoio prestado, mas em especial à Catarina Gomes pela ajuda, apoio, paciência e amizade.

Um muito obrigado, do fundo do coração, aos meus amigos/as que me acompanharam ao longo da minha vida académica. Guardo todos os momentos que partilhamos juntos e levo-os no coração. Às amigas de sempre que mesmo à distância contribuíram de uma forma direta ou indireta para o meu percurso estudantil.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer aos meus pais, irmão e restante família pelo apoio incondicional, carinho, amor, confiança, incentivo, compreensão e paciência ao longo da minha vida. Muito obrigada, por todos os valores que me transmitiram, por serem o meu pilar e por terem feito de mim aquilo que sou hoje.

Obrigado Avô. Apesar de não estares entre nós, foste e serás sempre a minha força para continuar a ultrapassar estes momentos tal como eu serei sempre a tua menina. Sei que estarias muito feliz ao me veres concluir mais uma fase.

A todos, um enorme e sincero, Obrigado!

Resumo

Este trabalho incidiu no estudo da extração de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) e de compostos bioativos da cortiça natural, usando CO₂ supercrítico, e também na avaliação da retenção destes compostos em polímeros molecularmente impressos (MIPs). Pretendeu-se desta forma contribuir para a criação de conhecimento com aplicação em indústrias da cortiça, nomeadamente na área do fabrico de rolhas onde a erradicação do TCA é um problema importante. A valorização de resíduos de cortiça através da extração e posterior concentração/separação de compostos bioativos, nomeadamente polifenóis, foi outra vertente explorada nesta contribuição.

Realizaram-se estudos experimentais e de modelação matemática (usando o método das linhas em MATLAB) sobre a transferência e migração de TCA na cortiça, considerando como sistema modelo o contacto entre uma solução hidro-alcoólica e a cortiça. Mostrou-se que a migração do TCA para a cortiça depende de forma crítica da composição do solvente hidro-alcoólico, devido à influência das interações hidrofóbicas, o que pode ser útil no projeto de processos de extração de TCA da cortiça.

A extração de TCA da cortiça com CO₂ supercrítico foi testada considerando diferentes combinações entre pressão, temperatura, tempo de extração e presença de co-solvente. Foi também estudado o tratamento de rolhas de cortiça com CO₂ gasoso, para remoção do ar contido nas células da cortiça, tentando evitar a formação de “*papinhos*” nos tratamentos com vapor de água. Os testes realizados incluíram a utilização de rolhas positivas fornecidas pela corticeira Amorim & Irmãos com medições por SPME-GC-ECD. Os resultados obtidos revelam a migração substancial do TCA das zonas interiores da rolha para a sua superfície, indicando que o tratamento das rolhas não deverá incidir em zonas com profundidade superior a cerca de 3 mm.

Mostrou-se que a utilização de MIPs apresenta vantagens importantes na valorização de polifenóis presentes em extratos de cortiça, nomeadamente em comparação com outros adsorventes comerciais (ex. DAX8, XAD4 e XAD7HP). De facto, utilizando MIPs sintetizados com 4-vinilpiridina e análises por LC/MS/DAD, comprovou-se que é possível isolar o ácido elágico (ex.) presente em extratos de cortiça.

Palavras-chave: 2,4,6-tricloroanisol (TCA), CO₂ supercrítico, polímeros molecularmente impressos (MIPs), polifenóis

Abstract

This work was devoted to the extraction of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) and bioactive compounds from natural cork, using supercritical CO₂, and also to the assessment of the retention of these compounds in molecularly imprinted polymers (MIPs). It is intended to contribute for the development of knowledge with application in cork industries, namely in the cork stoppers fabrication, where the eradication of TCA is a critical problem. The valorization of cork residues through the extraction and subsequent concentration/separation of bioactive compounds, namely polyphenols, was other research line here explored.

The transfer and migration of TCA in the cork was experimentally and theoretically studied (through mathematical modeling in MATLAB using the method of the lines) with the system model concerning the contact between a hydro-alcoholic solution and the cork. It was shown that the migration of TCA to the cork strongly depends on the composition of the hydro-alcoholic solution, due to hydrophobic effects, which can be useful in the designing of processes to extract TCA from cork.

The extraction of TCA from cork with supercritical CO₂ was performed considering different combinations between pressure, temperature, extraction time and presence of a co-solvent. The treatment of cork stoppers with gaseous CO₂ was also considered for the removal of air in the cork cells, trying to avoid the formation of surface defects with the hot steam treatments. These studies included the use of positive corks stoppers, provided by the company Amorim & Irmãos with measurements of the TCA concentration using SPME-GC-ECD. The results obtained show the substantial migration of TCA from inner region to the surface of the corks stoppers, allowing estimating that the cork stopper treatment should not exceed c.a. 3 mm in depth.

It was shown that MIPs present important advantages comparatively to other commercial adsorbents (e.g. DAX8, XAD4 and XAD7HP) in the framework of the valorization of polyphenols present in cork extracts. Indeed, using MIPs synthesized with 4-vinylpyridine and LC/MS/DAD analyses, was proved that is possible the isolation of ellagic acid present in cork extracts.

Key-words: 2,4,6-trichloroanisole (TCA), supercritical CO₂, molecularly imprinted polymers (MIPs), polyphenols

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract.....	III
Índice Geral	IV
Índice de Figuras	VIII
Índice de Esquemas	XV
Lista de Anexos	XVII
Lista de Abreviaturas.....	XVIII
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Principais objetivos	2
1.2. Organização da dissertação	4
Capítulo 2 – Fundamentação Teórica.....	6
2.1. Cortiça	6
2.2. Principais propriedades e aplicações	7
2.2.1. Composição química	9
2.2.2. Componentes estruturais	10
2.2.3. Componentes não estruturais	12
2.3. Fabricação das rolhas de cortiça.....	12
2.4. Identificação e extração do 2,4,6-tricloroanisol (TCA) na cortiça.....	13
2.5. Compostos bioativos	15
2.5.1. Compostos lipofílicos e fenólicos	16
2.5.2. Propriedades antioxidantes.....	17
2.5.3. Impressão Molecular	18
2.6. Extração com fluido supercrítico (SFE).....	19
2.6.1. Características dos Fluidos Supercríticos.....	20

2.6.2.	Instrumentação/Operação.....	21
2.6.3.	Extração supercrítica de 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) na cortiça.....	22
2.6.3.1.	Quantificação do TCA extraído em ng/L.....	23
2.6.4.	Extração de compostos bioativos na cortiça	24
Capítulo 3 – Materiais e Equipamentos.....		26
3.1.	Reagentes usados na síntese dos MIPs	26
3.3.	Instrumentação utilizada nos testes de voltametria cíclica.....	29
3.4.	Outros equipamentos	31
Capítulo 4 - Modelação da difusão do TCA (2,4,6-tricloroanisol) na cortiça.....		32
4.1.	Desenvolvimento do modelo teórico para a difusão do TCA na cortiça.....	32
4.2.	Implementação numérica do modelo em MATLAB	34
4.2.1.	Parâmetros de ajuste do modelo	37
4.3.	Estudos experimentais	39
4.3.1.	Procedimento Experimental	39
4.3.2.	Quantificação de TCA através de HPLC gradiente com deteção UV	41
4.4.	Comparação dos resultados experimentais com previsões teóricas e ajuste de parâmetros do modelo	44
Capítulo 5 – Extração do TCA da cortiça com CO ₂ supercrítico, avaliação da deformação da cortiça e quantificação analítica do TCA.....		49
5.1.	Experiências de extração de TCA da cortiça com CO ₂ supercrítico e de Tratamento de Rolhas com CO ₂ gasoso.....	49
5.1.1.	Extração com CO ₂ supercrítico	49
5.1.2.	Experiências Realizadas	50
5.1.3.	Resultados obtidos.....	55
5.1.3.1.	Análise por HPLC gradiente dos extratos obtidos com CO ₂ supercrítico .	56
5.2.	Avaliação da deformação da cortiça em resultado do seu tratamento com CO ₂ gasoso e extração com CO ₂ supercrítico	58
5.3.	Avaliação da taxa de extração de TCA através de medições com SPME-GC-ECD60	

5.4. Avaliação da detecção e quantificação de TCA e polifenóis presentes em extratos de cortiça através de voltametria cíclica.....	62
5.4.1. Análise por voltametria cíclica do sistema redox Fe^{2+}/Fe^{3+}	64
5.4.2. Experiências relativas à avaliação da detecção de TCA por voltametria cíclica	65
5.4.3. Detecção e quantificação de polifenóis por voltametria cíclica	67
Capítulo 6 – Síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs) e sua avaliação na retenção de compostos bioativos	69
6.1. Síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs) com polifenóis como molécula modelo	69
6.1.1. Purificação dos MIPs	71
6.2. Testes de avaliação da retenção de polifenóis em MIPs e em adsorventes comerciais	72
6.2.1. Extração em fase sólida (SPE).....	72
6.2.2. Experiências realizadas	73
6.2.3. Resultados e Discussão.....	75
6.3. Extratos de cortiça obtidos por ultrassons e soxhlet.....	78
6.3.1. Extração por Soxhlet	79
6.3.2. Extração por ultrassons	80
6.3.3. Adsorção em SPE	81
6.4. Utilização dos MIPs para a retenção em processos contínuos de polifenóis presentes em extratos de cortiça	85
6.4.1. Processos contínuos.....	85
6.4.2. Procedimento Experimental	85
6.4.3. Resultados e Discussão.....	86
6.4.3.1. Processo de Saturação	86
6.4.3.2. Processo de Libertação	87
6.5. Identificação através de LC-MS dos polifenóis obtidos por tratamento de extratos de cortiça com MIPs.....	88

Capítulo 7 – Conclusões	93
Referências bibliográficas	95
Anexos	i

Índice de Figuras

Figura 1: Recolha de cortiça (A Cortiça, 2017).....	6
Figura 2: Produção anual de cortiça por país (Corticeira Amorim, 2015).	6
Figura 3: Representação esquemática da secção axial do sobreiro; (A) cortiça (tecido suberose), (B) zona de mudança súber-felogênio, (C) felogênio, (D) tecido entrecasca, (E) zona de mudança, (F) madeira, (G) casca, (H) canais lenticulares, (I) área para produção de rolhas, (J) anéis de crescimento anuais. Fonte: (Silva <i>et al.</i> , 2005).....	8
Figura 4: Diagrama das células de cortiça segundo três direções de corte. Adaptado de (Rosa <i>et al.</i> , 1990; Silva <i>et al.</i> , 2005).	9
Figura 5: Composição química média da cortiça (Gil, 1993).....	9
Figura 6: Reação genérica para a formação de polímero poliéster da suberina.	10
Figura 7: Estrutura molecular da suberina. Fonte: (Graça, 2015).	10
Figura 8: Monómeros da lenhina: (A) álcool cumarílico; (B) álcool sinapílico; (C) álcool coniferílico.....	11
Figura 9: Unidades repetitivas dos polímeros polissacarídeos presentes na cortiça: celulose (A); hemicelulose (B).	11
Figura 10: Componentes não estruturais (componentes extrativos) presentes na cortiça: n-alcanos (A); triterpeno (B); ácido gordo (C); glicerol (D); esterol (E); ácido gálico (F).	12
Figura 11: Estrutura química do 2,4,6-tricloroanisol (TCA).....	14
Figura 12: Formação do 2,4,6-tricloroanisol por bioconversão.	14
Figura 13: Estrutura benzénica (fenólica) C6 com grupo hidroxilo (OH).	16
Figura 14: Estruturas de alguns compostos bioativos identificados em extratos da cortiça. Adaptado de (Castola <i>et al.</i> , 2005; Santos <i>et al.</i> , 2010).	17
Figura 15: Esquema representativo da síntese de MIPs.	19
Figura 16: Instalação experimental usada neste trabalho na extração com fluido supercrítico (SFE).....	20
Figura 17: Diagrama de fases típico de uma substância pura.....	20

Figura 18: Esquema básico do processo de extração supercrítico. Adaptado de (Farias-Campomanes <i>et al.</i> , 2013).....	21
Figura 19: Esquema do potencial de onda triangular da voltametria cíclica. Adaptado de (Wang, 2006).....	24
Figura 20: Esquema relativo à difusão de TCA numa rolha de cortiça quando colocada em solução líquida contendo esta molécula. É considerada a variação no tempo da concentração de TCA na fase líquida, o transporte interfases e a difusão radial em estado transiente na rolha de cortiça.	33
Figura 21: Discretização do raio da rolha de cortiça (cilindro) para implementação do método das linhas (MOL).....	34
Figura 22: Registo fotográfico de uma experiência realizada para o estudo da difusão do TCA em rolhas de cortiça. A imersão de uma rolha numa solução contendo TCA foi acompanhada pela experiência análoga em “branco”.....	40
Figura 23: Varrimento espectral de uma solução de TCA em etanol indicando um máximo de absorvância a cerca de 280 nm.	42
Figura 24: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente com deteção UV de soluções contendo TCA ($\lambda=280$ nm). As soluções injetadas foram preparadas a partir de uma solução mãe de TCA em etanol com concentração 206 mg/L. (a) Diluição da solução mãe em ACN/H ₂ O (50/50) com fator de diluição F=1,5; (b) Diluição da solução mãe em ACN/H ₂ O (50/50) com F=2; (c) Diluição da solução mãe em EtOH/H ₂ O (12/88) com F=10.....	42
Figura 25: Exemplos de cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente de amostras contendo TCA ($\lambda=280$ nm). Foi realizado este tipo de análises para amostras retiradas ao longo do tempo nas experiências de estudo da difusão do TCA na cortiça.	43
Figura 26: Resultados para as simulações do modelo desenvolvido e implementado em MATLAB e comparação com os valores experimentais (Exp. 1): (a) Previsão da concentração de TCA na rolha em função do tempo e do espaço (b) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 1); (c) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 2).....	45

Figura 27: Resultados para as simulações do modelo desenvolvido e implementado em MATLAB e comparação com os valores experimentais (Exp. 2): (a) Previsão da concentração de TCA na rolha em função do tempo e do espaço (b) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 1); (c) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 2).....	46
Figura 28: Resultados para as simulações do modelo desenvolvido e implementado em MATLAB e comparação com os valores experimentais (Exp. 3): (a) Previsão da concentração de TCA na rolha em função do tempo e do espaço (b) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 1); (c) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 2).....	47
Figura 29: Esboço do diagrama de fases do CO ₂ e condições P-T para as diferentes experiências realizadas neste trabalho relativas à impregnação com CO ₂ gasoso e extração com CO ₂ supercrítico de materiais de cortiça.	54
Figura 30: Dinâmica de temperatura, pressão, taxa de CO ₂ e massa total de CO ₂ correspondentes a uma experiência de impregnação com CO ₂ gasoso (experiência 14 à qual correspondem os seguintes valores de <i>set-point</i> : T=90 °C e P = 26 bar com tempo total de operação de 3 h).....	55
Figura 31: Dinâmica de temperatura, pressão, taxa de CO ₂ e massa total de CO ₂ correspondentes a uma experiência de extração com CO ₂ supercrítico (experiência 17 à qual correspondem os seguintes valores de <i>set-point</i> : T=80 °C e P = 80 bar com tempo total de operação de 10 h).....	55
Figura 32: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente do extrato das rolhas de cortiça em dois comprimentos de onda (280 nm no gráfico da esquerda e 320 nm no gráfico da direita). Foi injetado um extrato recolhido no vaso após operação em CO ₂ supercrítico. Procedeu-se previamente à dissolução de 60 µL do extrato em 1,5 mL de ACN/H ₂ O (50/50).....	57
Figura 33: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente de extratos das rolhas de cortiça a 280 nm. Compara-se aqui o efeito da preparação da amostra para injeção, nomeadamente a concentração e solvente usado (60 µL de extrato em ACN/H ₂ O (50/50) ou 120 µL de extrato em ACN/H ₂ O (90/10)).	57

Figura 34: Impregnação de rolhas com CO ₂ gasoso (experiência 11: 100 °C – 56 bar – 3 h). 1: Rolhas iniciais; 2: Rolhas após a primeira fase; 3: Rolhas após a imersão em água fervente; 4: Rolhas após a segunda fase.	59
Figura 35: Imagens de rolhas de cortiça após a extração com CO ₂ supercrítico (experiência 2: 40 °C – 160 bar – 2 h).....	59
Figura 36: Registo fotográfico das rolhas de cortiça usadas na experiência 15. As rolhas foram inicialmente submetidas a um pré-tratamento com CO ₂ gasoso (esquerda) e depois à extração com CO ₂ supercrítico (direita). Figura à esquerda: 1: Rolhas iniciais; 2: Rolhas após a primeira fase de pré-tratamento com CO ₂ gasoso; 3: Rolhas após a imersão em água fervente; 4: Rolhas após a segunda fase de pré-tratamento com CO ₂ gasoso (90 °C – 26 bar – 3 h). Figura à direita: 1: Antes da extração; 2: Depois da extração com CO ₂ supercrítico (60 °C – 160 bar – 10 h).	60
Figura 37: Comparação da concentração inicial de TCA nas rolhas com aquela medida após a extração com CO ₂ supercrítico. São aqui apresentados dados relativos às experiências 9 e 10.	60
Figura 38: Comparação da concentração inicial de TCA nas rolhas com aquela medida após o tratamento com CO ₂ gasoso e extração com CO ₂ supercrítico. São aqui apresentados dados relativos às experiências 11, 12 e 13.	61
Figura 39: Comparação da concentração inicial de TCA nas rolhas com aquela medida após o tratamento com CO ₂ gasoso e extração com CO ₂ supercrítico. São aqui apresentados dados relativos às experiências 14, 15 e 16.	61
Figura 40: Comparação da concentração inicial de TCA nas rolhas com aquela medida após a extração com CO ₂ supercrítico. São aqui apresentados dados relativos às experiências 17 e 18.	61
Figura 41: Sistema de análise eletroquímica usado neste trabalho para estudos de voltametria cíclica. O sistema inclui a célula eletroquímica (elétrodo, eletrólito e sistema de purga) e o potencióstato XPOT da ZAHNER.....	63
Figura 42: Resultados referentes à voltametria cíclica do sistema redox Fe ²⁺ /Fe ³⁺ com velocidades de varrimento de 25, 50 e 100 mV/s. Foi utilizado em elétrodo de platina da Metrohm com uma área de 3,142 mm ² como elétrodo de trabalho. As análises foram realizadas a 25 °C em solução aquosa contendo FeCl ₂ ·4H ₂ O (0,05 M), FeCl ₃ (0,05 M) e HCl (0,5 M).	64

Figura 43: Voltamogramas obtidos na análise de soluções com diferentes concentrações TCA considerando a velocidade de varrimento de potencial de 100 mV/s. Foi utilizado um eletrodo de prata da <i>Alfa Aesar</i> com uma área superficial útil de 19,625 mm ² (ET) e como eletrólito TBAB (0,1 M) numa mistura de ACN/H ₂ O (5:2). As análises foram realizadas a 25 °C.	66
Figura 44: Resultados obtidos na análise por voltametria cíclica de ácido cafeico com duas velocidades de varrimento (10 e 50 mV/s). Condições de análise: concentração de ácido cafeico 0,1 mM, pH=2,47 numa mistura HCl (0,1M)/H ₂ O/MeOH (88/12) a 25°C. Foi usado como eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo da <i>Metrohm</i> com uma área de 3,142 mm ²	67
Figura 45: Resultados obtidos na análise por voltametria cíclica de quercetina com velocidade de varrimento de 50 mV/s. Condições de análise: concentração de quercetina 0,1 mM numa mistura Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (0,2 M) a 25 °C. Foi usado como eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo da <i>Metrohm</i> com uma área de 3,142 mm ²	68
Figura 46: Método soxhlet considerado na purificação de MIPs e esquematização do aparelho (instalação experimental utilizada). Esquema adaptado de (Extração de lipídios em alimentos, 2010).	71
Figura 47: Representação esquemática das quatro fases da extração em fase sólida (Caldas <i>et al.</i> 2011).	73
Figura 48: Sistema de extração em fase sólida (SPE) usado neste trabalho.	74
Figura 49: Equipamento de espectrometria UV-vis utilizado neste trabalho.	75
Figura 50: Comparação da adsorção em SPE de diferentes compostos fenólicos com diferentes materiais molecularmente impressos (MIPs) e adsorventes comerciais: (a) quercetina (b) ácido cafeico (c) ácido gálico (d) e (e) ácido ferúlico. Em todas as experiências, na etapa de adsorção utilizou-se EtOH/H ₂ O (80/20) como solvente, na etapa de lavagem ACN e na etapa de eluição com MeOH/Ác. Acético (9/1). Os resultados apresentados em (e) correspondem à utilização de H ₂ O/MeOH (85/15) na etapa de adsorção. As medições foram realizadas pelo menos em duplicado (n=2).	76
Figura 51: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente da segunda etapa SPE para a adsorção de uma mistura de ga+pol+resv+cat+quer em diferentes MIPs: (a) MIP_1 (b) MIP_2 (c) MIP_3 e (d) MIP_4. Utilizou-se uma mistura de ACN/H ₂ O	

(70/30) no primeiro passo. Todas as análises foram feitas com sistema de HPLC gradiente e detecção UV a $\lambda=280$ nm.	78
Figura 52: Extração de granulado de cortiça através da técnica soxhlet. 1- Equipamento já com o cartucho colocado; 2- Extrato obtido onde se pode observar a formação de um precipitado.	79
Figura 53: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente do extrato de granulado de cortiça ($\lambda=280$ nm). Foi injetada a parte solúvel do extrato obtido diretamente pela extração de soxhlet. Utilizou-se EtOH/H ₂ O (80/20) como solvente na extração.....	80
Figura 54: Extração com ultrassons do granulado de cortiça. 1- Amostra e solvente preparado; 2- Solução submetida a filtração; 3-Extrato final.....	80
Figura 55: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente do extrato de granulado de cortiça ($\lambda=280$ nm). O extrato foi obtido através da extração por ultrassons em EtOH/H ₂ O (80/20) cuja parte solúvel foi diretamente injetada.....	81
Figura 56: Adsorção em SPE do extrato de cortiça obtido por ultrassons, comparando os materiais sintetizados (MIPs) e os adsorventes comerciais. O fator de diluição da solução mãe em EtOH/H ₂ O (80/20) foi F=10. A medição foi realizada pelo menos em duplicado (n=2).	82
Figura 57: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente da adsorção/lavagem/eluição em SPE do extrato de granulado de cortiça obtido por ultrassons. Foram usados dois materiais diferentes: (a) MIP_6 (b) MIP_7. Utilizou-se EtOH/H ₂ O (80/20) no passo de retenção.....	83
Figura 58: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente da adsorção/lavagem/eluição em SPE do extrato de rolha de cortiça. Foram usados dois materiais diferentes: (a) MIP_6 (b) MIP_7. Utilizou-se EtOH/H ₂ O (80/20) no passo de retenção.....	83
Figura 59: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente da adsorção/lavagem/eluição em SPE do extrato de granulado de cortiça obtido por soxhlet. Foi usado o material MIP_7 e EtOH/H ₂ O (80/20) no passo de retenção.	84

Figura 60: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente da adsorção em SPE do granulado de cortiça obtido por soxhlet após “spiking” com QUER+RUT+FER. Utilizou-se o MIP_7 como adsorvente e EtOH/H ₂ O (80/20) no passo de retenção.....	84
Figura 61: Coluna de enchimento usada em processos contínuos para adsorção e libertação de compostos fenólicos presentes em extratos de cortiça.	86
Figura 62: Coluna com a quantidade de MIP_7 já empacotado estando uma das extremidades ainda aberta.	86
Figura 63: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente de um extrato de granulado de cortiça antes e depois do processo de adsorção em coluna a operar em contínuo com reciclo. A análise foi feita com detecção UV a 280 nm.	86
Figura 64: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente da fração número 6. Esta fração foi obtida através do processo de desorção do extrato de cortiça anteriormente retido no MIP_7. A análise foi feita com detecção UV a 280 nm.	87
Figura 65: Cromatograma iônico total (LC-TIC) correspondente ao extrato de granulado de cortiça obtido por extração soxhlet e identificação dos compostos fenólicos presentes nesse extrato.	89
Figura 66: Cromatogramas correspondentes à análise por LC-MS do extrato de granulado de cortiça obtido por soxhlet. Apresenta-se aqui informação relativa à identificação do ácido elágico nesse extrato. (a) Varrimento total por LC-PDA do extrato, (b) Espectro UV correspondente ao tempo de retenção [15,32-16,98] min, (c) Valores dos iões moleculares [M-H] ⁻ experimentais para o pico com tempo de retenção 16,04 min (d) Picos de fragmentação MS ² correspondentes a m/z=301,00, (e) Cromatograma iônico total por LC-TIC correspondente ao branco, (f) Varrimento total por LC-PDA correspondente ao branco.	90
Figura 67: Cromatograma correspondente à análise por LC-TIC da fração 6, resultante do processo de recuperação dos compostos adsorvidos no MIP_7. Esta análise permite confirmar que o composto isolado é o ácido elágico.	91
Figura 68: Cromatograma correspondente à análise por LC-PDA da fração 6, resultante do processo de recuperação dos compostos adsorvidos no MIP_7. Esta análise permite confirmar que o composto isolado é o ácido elágico.	91

Índice de Esquemas

Esquema 1: Linhas de investigação e objetivos deste trabalho	3
--	---

Índice de Tabelas

Tabela 1: Reagentes utilizados no processo de síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs).....	26
Tabela 1: (Continuação).....	27
Tabela 2: Reagentes utilizados para a quantificação do TCA e dos polifenóis.....	28
Tabela 2: (Continuação).....	29
Tabela 3: Especificações técnicas do Potencióstato – XPOT.....	30
Tabela 4: Eléttodos utilizados na voltametria cíclica.....	30
Tabela 5: Descrição do conjunto de equipamentos utilizados nos diversos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.....	31
Tabela 6: Descrição genérica dos três parâmetros de ajuste do modelo desenvolvido. .	38
Tabela 7: Gamas típicas do coeficiente de difusão molecular em gases, líquidos e sólidos.	38
Tabela 8: Condições utilizadas nas experiências relativas ao estudo da difusão do TCA em rolas de cortiça.....	41
Tabela 9: Valores dos três parâmetros do modelo estimados com as diferentes condições experimentais consideradas.....	48
Tabela 10: Condições usadas nas experiências relativas à impregnação de materiais de cortiça com CO ₂ gasoso e na extração com CO ₂ supercrítico.....	51
Tabela 11: Condições experimentais usadas na impregnação com CO ₂ gasoso e extração com CO ₂ supercrítico do primeiro grupo das rolas positivas.....	52
Tabela 12: Condições experimentais usadas na impregnação com CO ₂ gasoso e extração com CO ₂ supercrítico do segundo grupo das rolas positivas.....	53
Tabela 13: Condições de polimerização utilizadas na preparação de diferente MIPs....	70

Tabela 13: (Continuação).	71
Tabela 14: Condições utilizadas no processo de libertação.	87
Tabela 15: Identificação por LC-MS de compostos fenólicos presentes no extrato de cortiça obtido diretamente com granulado de cortiça através da técnica de soxhlet.....	92

Lista de Anexos

- Anexo 1: Imagens de peças de cortiça antes e depois do seu tratamento com CO₂ gasoso e/ou da extração com CO₂ supercrítico. São também apresentados os perfis de temperatura, pressão, taxa de CO₂ e massa total de CO₂ para as experiências correspondentes.....ii
- Anexo 2: Espectros de varrimento UV-Vis de extratos de cortiça obtidos a partir de cubos e rolhas ((a) e (b)). São também apresentados cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente de extratos de cortiça (cubos, granulado). (c) 280 nm (d) 320 nm ambos para 60 µL de extrato em ACN/H₂O (50/50). (e) 60 µL de extrato em ACN/H₂O (50/50) e 120 µL de extrato em ACN/H₂O (90/10) (f) 120 µL de extrato em ACN/H₂O (90/10) ambos a 280 nm.....xv
- Anexo 3: Testes realizados por voltametria cíclica na detecção e quantificação de TCA com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s durante 2 ciclos.....xvi
- Anexo 4: Testes realizados por voltametria cíclica na detecção do polifenol ácido cafeico com uma concentração de 0,1 mM numa mistura HCl (0,1 M) /MeOH (88/12) a diferentes valores de pH e velocidades de varrimento. Este polifenol está em geral presente nos extratos de cortiça.....xvii
- Anexo 5: Testes realizados por voltametria cíclica na detecção de polifenóis (Ácido Gálico e Ácido Ferúlico). Estes polifenóis estão em geral presentes nos extratos de cortiça.....xviii
- Anexo 6: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente das restantes frações. Estas frações foram obtidas através do processo de dessorção do extrato de cortiça anteriormente retido no MIP_7.....xx
- Anexo 7: Cromatogramas correspondentes à análise por LC-MS do extrato de granulado de cortiça obtido por soxhlet. São aqui apresentados dados adicionais para identificação de compostos fenólicos presentes nesse extrato de cortiça.....xxi

Lista de Abreviaturas

4VP – 4-vinilpiridina

AA – Ácido Acrílico

ACN – Acetonitrilo

AIBN – 2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo

Ag/AgCl – Prata /Cloreto de Prata

CA – Ácido cafeico

CE – Contra elétrodo

CL - Reticulante

CO₂ – Dióxido de carbono

CV – Voltametria cíclica

DI – Água desionizada

DMA – N,N – Dimetilacrilamida

DMAEMA – Metacrilato de 2-dimetilamino Etilo

DMF – N,N-dimetilformamida

EGDMA – Etileno glicol dimetacrilato

ER – Elétrodo de referência

ESI – Electro-pulverização

ET – Elétrodo de trabalho

EtOH – Etanol

FA – Ácido ferúlico

FeCl₂4H₂O – Cloreto de ferro (II) tetra-hidratado

FeCl₃ – Cloreto de Ferro (III)

GA – Ácido gálico

HCl – Ácido Clorídrico

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

KCl – Cloreto de Potássio

LC/PDA – Cromatografia líquida com detetor de díodos

LC/TIC – Cromatografia líquida com cromatograma de iões totais

LS/MS/DAD – Cromatografia líquida com espectroscopia de massa e detetor de díodos

M – Monómero funcional

MM – Molécula modelo

MeOH – Metanol

MIPs – Polímeros molecularmente impressos

[M-M] – Iões moleculares

[MS²] – Picos de fragmentação

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico

NaH₂PO₄ – Fosfato monossódico

NaOH – Hidróxido de Sódio

S – Solução

SFE – Extração com fluido supercrítico

SPE – Extração com fase sólida

SPME/GC/ECD – Microextração em fase sólida com cromatografia gasosa e deteção por captura de eletrões

TBAB – Tetrafluoro borato de tetrabutilamónio

TBAP – Perclorato de tetrabutilamónio

TCA – 2,4,6 – tricloroanisol

UV – vis – Ultravioleta visível

$\Lambda_{\text{máx}}$ – Comprimento de onda máximo

Δ - Diferença entre a massa prevista e a massa teórica em LS-MS-DAD

Capítulo 1 – Introdução

A cortiça é um material natural com propriedades únicas devido à sua particular morfologia e composição química. O seu componente principal é a suberina (aproximadamente 45 % em peso) que lhe confere propriedades mecânicas específicas, como por exemplo a elasticidade, a leveza e a impermeabilidade de gás/líquido. Os restantes constituintes da cortiça são a lenhina (aproximadamente 27 %), que forma a estrutura das paredes celulares, os polissacarídeos (aproximadamente 12 %), que ajudam a definir a textura da cortiça e os extrativos (ceras e taninos) que representam cerca de 12 % do material. O isolamento térmico e acústico, a combustão lenta e a resistência ao atrito são outras propriedades importantes inerentes à cortiça. No entanto, a cortiça é suscetível a diferentes tipos de contaminações microbiológicas, levando à formação de metabolitos secundários voláteis e semi-voláteis, que têm um importante efeito prejudicial nas suas propriedades (Silva *et al.*, 2005).

O guaiacol, o 2-metilisoborneol e o 2,4,6-tricloroanisol (TCA) são exemplos de contaminações microbiológicas da cortiça, sendo o TCA considerado como o principal problema associado ao uso deste material em rolhas para o sector vinícola. O TCA é suscetível a causar o cheiro a mofo no vinho mesmo quando presente em concentração muito baixa, cerca de 1 nanograma por litro (ng/L), devido ao contato do líquido com a superfície de uma rolha de cortiça contaminada (Gómez-Ariza *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2000). Como consequência das contaminações por TCA foram observadas perdas importantes para as empresas de cortiça nas últimas décadas, nomeadamente devido à substituição das rolhas de cortiça por vedantes artificiais. Assim, a extração de TCA e de outros compostos voláteis da cortiça natural é uma questão importante para as empresas da indústria da cortiça.

Métodos baseados no uso de vapor de água são em geral considerados com a finalidade de extrair o TCA, mas uma baixa confiabilidade e eficiência são frequentemente observadas. A degradação das propriedades mecânicas da cortiça também é uma possível consequência indesejada desses processos. A extração com fluidos supercríticos (SFE), nomeadamente o dióxido de carbono (CO₂), é uma técnica interessante neste contexto devido à combinação de boas condições de solubilidade associadas a líquidos e com alta taxa de difusão associada aos gases. Um menor impacto sobre as propriedades mecânicas da cortiça quando o CO₂ supercrítico é usado, assim

como a extração de compostos bioativos que eventualmente possam estar presentes na cortiça são outros benefícios potenciais deste processo de extração (Gomes *et al.*, 2007).

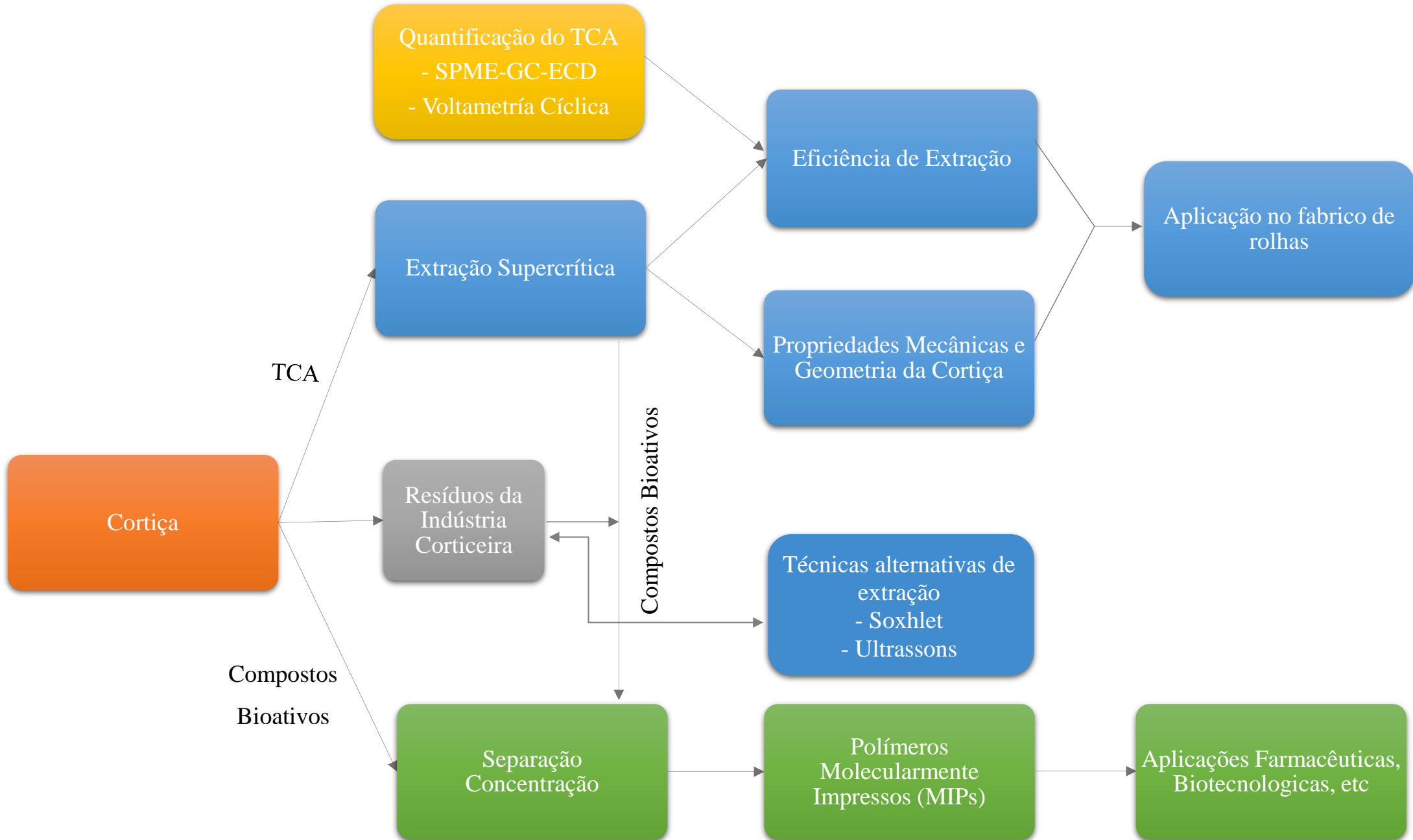
Este produto natural contém uma fração de compostos não estruturais, os extrativos, que podem ser facilmente removidos e que incluem principalmente compostos fenólicos e triterpênicos. Os polifenóis foram selecionados como compostos alvo neste trabalho devido ao seu efeito antioxidante, antiviral, anticancerígeno, antibacteriano e anti-inflamatório, como é amplamente reportado na literatura. Neste contexto, é importante o desenvolvimento de técnicas para purificar e concentrar os diferentes tipos de polifenóis presentes nos extratos da cortiça. A técnica considerada nesta investigação explora o uso dos Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs) na purificação e concentração, bem como na sua retenção e liberação seletiva.

1.1. Principais objetivos

A presente dissertação é dedicada ao estudo da extração da cortiça com CO₂ supercrítico (SFE), nomeadamente a influência das condições de operação (temperatura, pressão, co-solvente) na eficiência do processo e o seu efeito sobre as suas propriedades mecânicas e geometria das peças de cortiça. Além disso, a valorização dos extratos da cortiça obtidos através da extração supercrítica usando CO₂ será avaliada considerando a identificação, separação e concentração de compostos bioativos que possam eventualmente ser obtidos. Para efeitos comparativos, além dos extratos obtidos com CO₂ supercrítico, serão também considerados extratos de cortiça obtidos por soxhlet, ultrassons ou extração hidro-alcoólica. Os compostos lipofílicos tais como a fredelina e o ácido betulínico e os compostos aromáticos tais como o ácido protocatecuico, elágico e o gálico são exemplos de compostos bioativos presentes em extratos da cortiça. O reconhecimento molecular de tais compostos será testado com o uso de MIPs sintetizados, com ênfase na família de polifenóis presentes na cortiça.

O esquema apresentado na página seguinte descreve genericamente as principais linhas de investigação sobre as quais incide este trabalho.

Esquema 1: Linhas de investigação e objetivos deste trabalho



1.2. Organização da dissertação

Neste primeiro capítulo foi feito o enquadramento genérico desta investigação, tendo também sido descritos de forma resumida os principais objetivos deste trabalho.

O segundo capítulo aborda de forma geral as propriedades da cortiça e suas aplicações. É analisada a estrutura celular da cortiça, composição química e seus componentes estruturais/não estruturais. É também descrito de forma resumida o processo de fabricação de rolhas de cortiça, sendo ainda analisada a problemática associada à presença do TCA na cortiça e potenciais prejuízos causados na indústria corticeira. Faz-se ainda uma análise do tipo de compostos bioativos potencialmente presentes em extratos de cortiça, nomeadamente diferentes tipos de polifenóis e compostos triterpénicos.

No terceiro capítulo faz-se a descrição dos materiais e equipamentos utilizados nos diferentes procedimentos experimentais executados nesta investigação. Síntese, purificação e teste de MIPs com polifenóis, extração da cortiça com CO₂ supercrítico, quantificação de TCA por HPLC gradiente com deteção UV, deteção e quantificação de TCA e polifenóis por voltametria cíclica constituem alguns exemplos de tarefas experimentais realizadas neste âmbito.

O quarto capítulo incide sobre o estudo da migração do TCA na cortiça quando colocada em contacto com uma fase líquida. Foram realizadas experiências que incluíram a amostragem da fase líquida ao longo do tempo para quantificação da quantidade de TCA transferida para o sólido (cortiça). Dada a elevada gama de concentrações de TCA considerada (na ordem de mg/L) foi possível fazer as medições com HPLC gradiente com deteção UV. Foi também desenvolvido e implementado em MATLAB (através do *método das linhas* - MOL) um modelo teórico para descrição do processo de migração do TCA. Os estudos realizados, considerando fases líquidas com diferente carácter hidrófilo, mostram que as interações hidrofóbicas têm um papel relevante no mecanismo de transferência de TCA entre fases (líquido/sólido). Estes resultados são relevantes para o desenho de processos de extração do TCA da cortiça, nomeadamente os solventes usados (ex. o CO₂ por ser uma molécula apolar apresenta elevada afinidade com o TCA).

No quinto capítulo explora-se a extração de TCA da cortiça com CO₂ supercrítico e também o efeito do tratamento de rolhas de cortiça com CO₂ gasoso para remoção do ar contido nas células da cortiça, tentando evitar desta forma a formação de “*papinhos*” durante os tratamentos com vapor de água. Foram usadas diferentes condições de extração

P-T-tempo, tendo também sido incluídas nos testes rolhas positivas (com quantidade conhecida de TCA), fornecidas pela corticeira Amorim & Irmãos. Neste contexto a medição de TCA, na gama de ng/L, foi realizada por microextração em fase sólida com cromatografia gasosa e deteção por captura de eletrões (SPME-GC-ECD), também pela corticeira Amorim & Irmãos. Com as condições de operação usadas, foram observadas deformações geométricas importantes na cortiça e os resultados indicam também que, em consequência do tratamento com CO₂ gasoso/supercrítico, houve uma migração substancial do TCA situado nas zonas interiores da rolha para a sua superfície. Estas observações são importantes no desenho de processos eficientes de extração de TCA da cortiça pois mostram que o tratamento não deve incidir em zonas com profundidade superior a 3 mm. A voltametria cíclica foi também testada como técnica alternativa (mais simples e barata do que SPME-GC-ECD) à quantificação de TCA na gama de ng/L. Os resultados obtidos mostram que são necessários aperfeiçoamentos importantes na configuração de voltametria cíclica considerada para que sejam possíveis as medições pretendidas. Por outro lado, mostrou-se que a voltametria cíclica é uma técnica que permite quantificar compostos fenólicos presentes em extratos de cortiça, podendo ser útil em processos de valorização deste tipo de resíduos.

No sexto capítulo avalia-se a retenção de compostos fenólicos presentes em extratos de cortiça através do uso de Polímeros Molecularmente Impresso (MIPs). Descreve-se a síntese de MIPs e o seu desempenho comparativo com outras resinas comerciais usadas para adsorver polifenóis (resinas DAX8, XAD4 e XAD7HP). Os testes realizados incluem diversos extratos de cortiça e diferentes processos de retenção (ex. SPE e operação em contínuo com coluna de enchimento). De entre todos os adsorventes testados, dois MIPs (sintetizados com 4-vinilpiridina como monómero funcional) mostram um desempenho muito superior na retenção de polifenóis em comparação com os restantes materiais. Estes resultados foram potenciados para isolar compostos fenólicos presentes em extratos de cortiça e demonstra-se que esses MIPs podem ser usados para obter, por exemplo, ácido elágico com elevado grau de pureza. Neste contexto, a identificação dos compostos fenólicos foi feita por HPLC gradiente com deteção UV e também por cromatografia líquida com espectroscopia de massa e detetor de díodos (LC/MS/DAD).

Capítulo 2 – Fundamentação Teórica

2.1. Cortiça

A cortiça é a casca externa de uma árvore de carvalho (Figura 1), *Quercus suber* L. vulgarmente conhecida como sobreiro.



Figura 1: Recolha de cortiça (A Cortiça, 2017).

A Europa possui cerca de 60 % da área de produção total de florestas de cortiça e produz mais de 80 % da cortiça no mundo (Figura 2). Da extensão total de floresta de sobreiro, extraem-se anualmente cerca de 200 mil toneladas de cortiça. Portugal, que detém um terço da área global de sobreiros, é o maior produtor, sendo responsável por cerca de 50 % da transformação mundial. O setor da cortiça desempenha um papel especialmente importante nestes países, quer no plano económico, social e ambiental (Silva *et al.*, 2005).

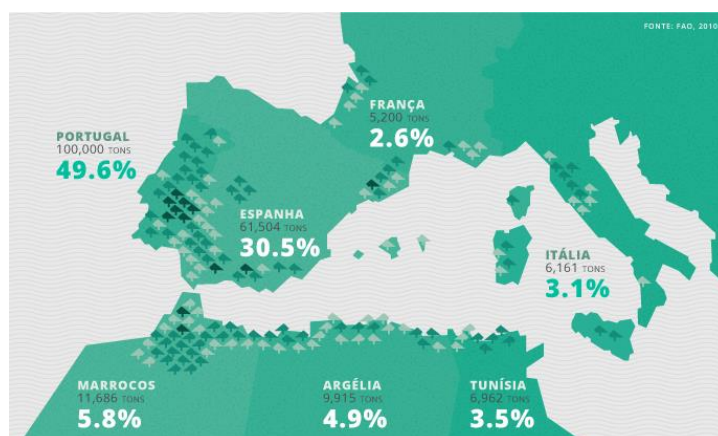


Figura 2: Produção anual de cortiça por país (Corticeira Amorim, 2015).

A cortiça pode ser facilmente extraída no Verão, quando o seu crescimento é maior, coincidindo com um período de maior geração celular, o que permite uma fácil

separação das camadas de cortiça (Silva *et al.*, 2005). A primeira recolha de cortiça ocorre quando a árvore atinge os 25-30 anos de idade e depois de atingir 25 cm de diâmetro, dependendo da região de cultura. Esta extração é conhecida como “cortiça virgem”, uma vez que apresenta uma estrutura, uma espessura e uma densidade irregulares. A “cortiça virgem” apenas pode ser usada para juntas, isolamentos, solas de sapatos, entre outros (Silva *et al.*, 2005; Touati *et al.*, 2015). A segunda colheita, “cortiça de reprodução”, colhida 9 anos depois, apresenta uma estrutura mais regular, mas é de qualidade insuficiente para rolhas de cortiça. Apenas na terceira colheita, ou seja, após um novo ciclo (9 a 12 anos) resulta num material de melhor qualidade, denominado de “amadia”. Este é utilizado para a produção de rolhas de cortiça, enquanto todos os outros tipos de cortiça podem ser usados para painéis de aglomerados (Silva *et al.*, 2005). No processo de colheita a casca externa de um tronco de sobreiro é cuidadosamente removida manualmente por profissionais altamente especializados sempre entre Maio e Agosto, quando a árvore se encontra numa fase mais ativa de crescimento e se torna mais fácil de descortiçá-la sem ferir o tronco. A colheita regular melhora a saúde e o vigor da árvore.

A cortiça é uma matéria-prima 100 % natural, renovável e biodegradável sendo a única árvore cuja casca se autorregenera, adquirindo uma textura mais lisa após cada extração (Fernandes *et al.*, 2011). O ser humano aproveita esse material nobre, há alguns séculos, mesmo antes de conhecer a sua composição química ou as suas aplicações mais avançadas.

2.2. Principais propriedades e aplicações

A cortiça é a principal matéria-prima produzida pela espécie *Quercus suber L.*, mostrando propriedades específicas importantes, nomeadamente físicas, químicas e mecânicas. Devido às suas propriedades peculiares, a cortiça apresenta algumas características macroscopicamente distintas, tais como: impermeabilidade (a cortiça é impermeável aos líquidos e aos gases, proporcionando capacidades de vedação superiores), elasticidade (é flexível e recupera facilmente o seu tamanho e a sua forma original), apresenta baixa condutividade (de calor, som e vibrações), durabilidade, resistência ao calor (tolerância extremamente alta), leveza (mais de 50 % do seu volume é ar) e baixa densidade, como apresentado na Figura 3 (Aroso *et al.*, 2015). Este conjunto notável de propriedades, que resulta principalmente da sua morfologia distinta e composição química, torna a cortiça num material adequado para várias aplicações

(Touati *et al.*, 2015). A cortiça pode ser usada numa ampla gama de aplicações, como rolhas, painéis de isolamento e pavimentos, calçados, materiais têxteis, acessórios e brinquedos. As rolhas para engarrafamento de vinho, champanhe e os pisos de cortiça são os produtos mais representativos da indústria. A cortiça também foi incorporada em escudos térmicos e placas de revestimento das naves espaciais da NASA e da ESA (Amorim Cork, 2016).

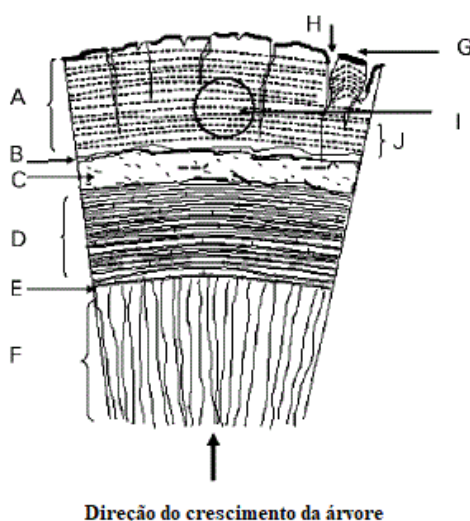


Figura 3: Representação esquemática da secção axial do sobreiro; (A) cortiça (tecido suberose), (B) zona de mudança súber-felogênio, (C) felogênio, (D) tecido entrecasca, (E) zona de mudança, (F) madeira, (G) casca, (H) canais lenticulares, (I) área para produção de rolhas, (J) anéis de crescimento anuais. Fonte: (Silva *et al.*, 2005).

A cortiça possui uma estrutura celular distinta; podendo dizer-se que 95 % das células da cortiça são hexagonais apresentando uma estrutura anisotrópica. Não havendo uma disposição comum célula-célula, não existem canais de comunicação nem espaços intercelulares, notando-se apenas a presença de canais lenticulares (Fernandes *et al.*, 2011; Gil, 1993 ; Silva *et al.*, 2005). Ao ser realizada uma secção tangencial, ou seja, perpendicular à direção radial, observa-se o arranjo semelhante a um “favo de mel” nas células da cortiça. Se as secções forem radiais (perpendicular à direção tangencial), ou transversais (perpendicular à direção axial), as células da estrutura são prismas retangulares empilhadas base com base dispostas em colunas paralelas à direção radial da árvore (Silva *et al.*, 2005).

De modo a facilitar a compreensão relativamente à posição dos diferentes arranjos que as células da cortiça podem ter, apresenta-se na Figura 4 a disposição das células face às direções e a sua nomenclatura.

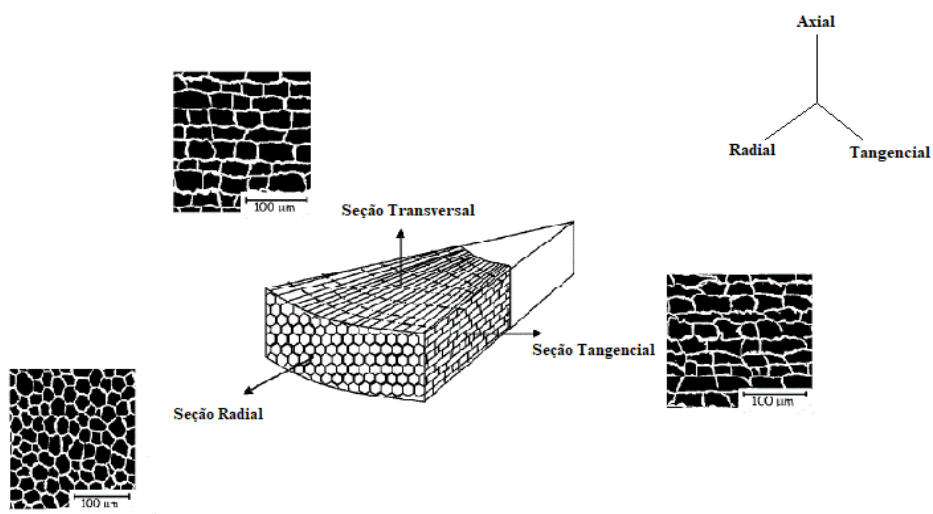


Figura 4: Diagrama das células de cortiça segundo três direções de corte. Adaptado de (Rosa *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2005).

2.2.1. Composição química

A composição química da cortiça encontra-se dependente de vários fatores tais como a origem geográfica, as condições de solo e do clima, a origem genética, a dimensão e a idade da árvore (virgem ou reprodução) e as condições de crescimento (Silva *et al.*, 2005).

A cortiça engloba na sua composição vários tipos de compostos naturais, como apresentado na Figura 5, que tradicionalmente estão divididos em cinco grupos, com os seguintes valores típicos: suberina (45 %), lenhina (27 %), polissacarídeos (12 %), ceras (6 %) e taninos (6 %).

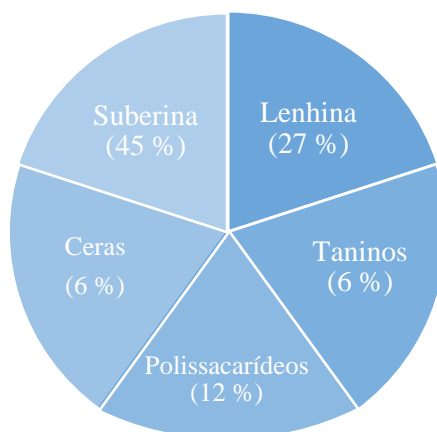


Figura 5: Composição química média da cortiça (Gil, 1993).

Estes cinco grupos são assim considerados face ao conjunto de compostos que incluem e ao seu modo de obtenção/separação. As percentagens típicas mencionadas podem ter variações elevadas e podem também ser relativas a diferentes tipos de cortiça e métodos de análise (Gil, 1993).

A nível químico, a cortiça pode ser dividida em dois tipos de componentes, os estruturais e os não estruturais.

2.2.2. Componentes estruturais

Os componentes estruturais da cortiça são: suberina, lenhina e os polissacarídeos. Estes compostos são macromoléculas insolúveis de natureza polimérica e representam cerca de 85 % da constituição da cortiça.

A suberina (Figura 7) é o composto maioritário da cortiça e é constituída por monómeros alifáticos de cadeia longa, glicerol e éster de glicerol, dando origem a um polímero poliéster (Figura 6). A obtenção dos monómeros de suberina é feita por despolimerização onde são quebradas ligações éster por hidrólise alcalina (Graça, 2011).

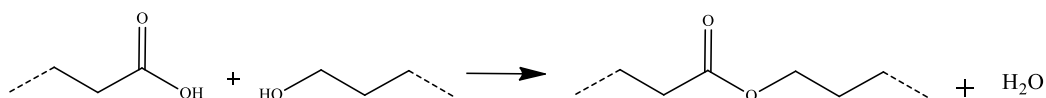


Figura 6: Reação genérica para a formação de polímero poliéster da suberina.

Devido à sua abundância e composição única, é o componente mais promissor para o desenvolvimento de novos produtos químicos e materiais de subprodutos da cortiça (Santos *et al.*, 2010).

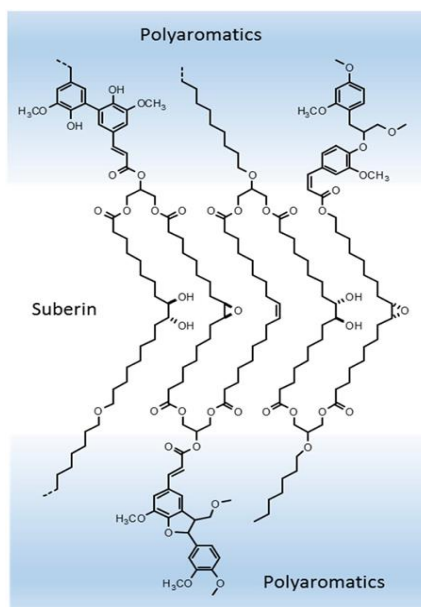


Figura 7: Estrutura molecular da suberina. Fonte: (Graça, 2015).

A lenhina é um heteropolímero de natureza fenólica formada pela polimerização de três álcoois: álcool cumarílico, álcool sinapílico e álcool coniferílico como apresentados na Figura 8. Este composto apresenta um elevado peso molecular, sendo a que confere rigidez à parede celular (Garcia *et al.*, 2015; Gil, 1993.; Silva Pereira *et al.*, 1999).

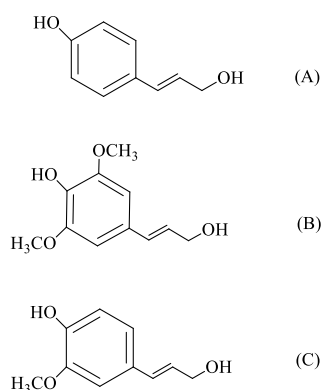


Figura 8: Monómeros da lenhina: (A) álcool cumarílico; (B) álcool sinapílico; (C) álcool coniferílico.

Para além das macromoléculas principais existem outros componentes presentes em concentrações mais baixas que exercem uma influência importante nas suas propriedades físicas e químicas da cortiça. Os polissacarídeos são constituídos por dois tipos de polímeros: a celulose (homopolímero) e hemicelulose (heteropolímeros), como representados na Figura 9. Os monómeros destes polímeros apresentam baixo peso molecular e são obtidos geralmente através de hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (Silva *et al.*, 2005).

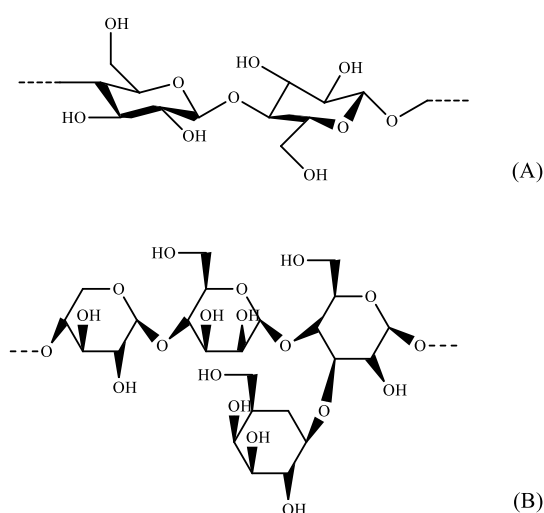


Figura 9: Unidades repetitivas dos polímeros polissacarídeos presentes na cortiça: celulose (A); hemicelulose (B).

Os polissacarídeos proporcionam rigidez estrutural e, juntamente com a lenhina, são os principais responsáveis pela estrutura de suporte das paredes das células da cortiça.

2.2.3. Componentes não estruturais

Os componentes não estruturais dividem-se em componentes extrativos e não extrativos. Estes são compostos orgânicos presentes na casca da cortiça, e são geralmente do tipo n-alcenos, triterpenos, ácidos gordos, glicerol, esteróis e polifenóis (Figura 10). Os dois componentes mais importantes são as ceras e os taninos.

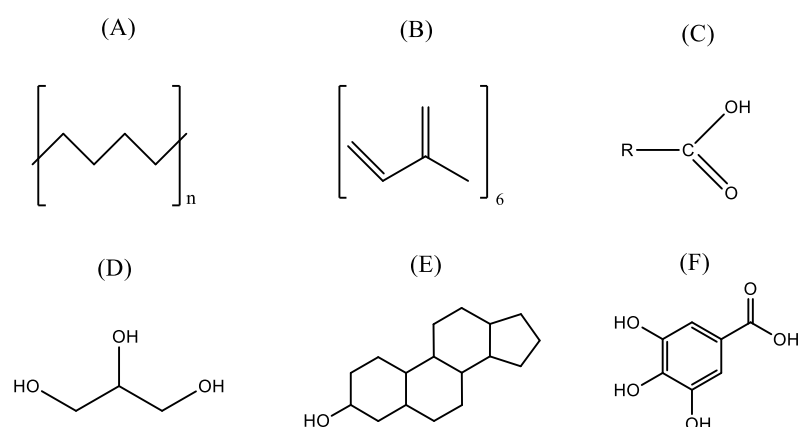


Figura 10: Componentes não estruturais (componentes extrativos) presentes na cortiça: n-alcenos (A); triterpeno (B); ácido gordo (C); glicerol (D); esterol (E); ácido gálico (F).

Os taninos, obtidos da cortiça por extração com água são os componentes existentes em maior percentagem. Estes são compostos fenólicos que aparecem numa forma polimerizada, sendo usualmente divididos em dois grupos: taninos condensados e taninos hidrolisáveis (Silva *et al.*, 2005).

Relativamente às ceras, estas são responsáveis pela impermeabilidade da cortiça e apresentam na sua estrutura grupos alifáticos e aromáticos muito diversos. Os alifáticos são compostos de cadeia longa tais como n-alcenos, ácidos gordos, álcoois gordurosos, glicerol e alguns triglicéridos (Silva *et al.*, 2005).

2.3. Fabricação das rolhas de cortiça

Em Portugal a colheita da cortiça ocorre a cada nove anos através de um processo que não prejudica a árvore, tornando-se um dos produtos florestais mais sustentáveis e ecológicos (Aroso *et al.*, 2015).

Desde a prancha até à rolha, a cortiça passa por um conjunto de etapas que se diferenciam quanto ao tipo de rolha que se pretende produzir. As rolhas de cortiça natural são fabricadas por brocagem a partir de uma peça única de cortiça. Após a sua extração, as cascas da cortiça são expostas ao ar livre por um período de estabilização de pelo menos seis meses e são ordenadas por tamanho e qualidade. Esta estabilização melhora a qualidade da cortiça (Cork Institute of America, 2008). Após o período de estabilização ou repouso, as pranchas de cortiça são cozidas em água limpa e a ferver com a duração de pelo menos uma hora. Antes da cozedura, as células da cortiça estão comprimidas de forma irregular, mas durante este processo, o gás contido dentro das células expande, o que torna a estrutura da cortiça mais regular e o seu volume aumenta em cerca de 20 %. Após a cozedura, decorre a estabilização da cortiça. Só depois deste período, que se estende por duas a três semanas, é que se procede à seleção das pranchas. No processo de brocagem obtém-se assim, uma rolha cilíndrica em conformidade com os limites dimensionais desejados. Todos os desperdícios da fase de brocagem são aproveitados para granulado de cortiça, atualmente queimada para produzir energia. Após a brocagem, a retificação servirá para obter as dimensões finais previamente especificadas e para regularizar a superfície da rolha. Após a retificação, procede-se à lavagem das rolhas que pode ser feita usando por exemplo, a água oxigenada ou o ácido peracético. Esta lavagem serve para limpar e desinfetar as rolhas de cortiça, mas podem ser utilizados outros métodos. Após esta etapa, o teor de humidade é estabilizado, obtendo-se assim uma otimização da performance da rolha como vedante e reduzindo, em simultâneo, a contaminação microbiológica (Associação Portuguesa da Cortiça, 2015).

2.4. Identificação e extração do 2,4,6-tricloroanisol (TCA) na cortiça

No setor industrial vinícola é possível constatar a existência de um defeito organolético nos vinhos, que pode ter consequências economicamente desfavoráveis, sendo uma grande ameaça ao setor. Este defeito tem origem num composto químico que pode estar presente nas rolhas de cortiça. A presença deste composto no vinho resulta na perda dos seus aromas naturais dando lugar a um aroma desagradável, o chamado “mofo” que muitas vezes é também denominado por “gosto a rolha” pelo facto de estar frequentemente associado à rolha de cortiça (Silva Pereira *et al.*, 1999).

O problema deste aroma desagradável está relacionado, geralmente, com a migração de compostos, que podem ter origem em microrganismos presentes na rolha de cortiça (Silva Pereira *et al.*, 1999).

Têm sido identificados diversos compostos que podem ser responsáveis por alterações organoléticas no vinho, tais como cloroanisóis, guaiacol, 1-octeno-3-ol, 1-octeno-3-ona, geosmina, 2-metil-isoborneol, 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina, 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA), 2,3,4,5,6-pentacloroanisol (PCA), 2,4,6-tribromoanisol (TBA) e o 2,4,6-tricloroanisol (TCA) (Campillo *et al.*, 2010; Juanola *et al.*, 2005). Este último composto é considerado o principal responsável pelo desvio organolético do vinho associado ao aroma a mofo.

O TCA (Figura 11) é um haloanisol derivado do metoxibenzeno (anisol) e é um composto volátil facilmente absorvido pela cortiça (Filomena E., 2014).

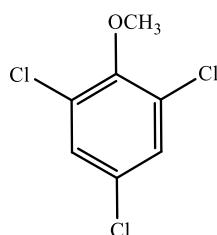


Figura 11: Estrutura química do 2,4,6-tricloroanisol (TCA).

Existem várias hipóteses para a formação de cloroanisóis, sendo que a mais aceita é a síntese direta por biometilação (*o*-metilação) de clorofenóis por microrganismos. Dos vários clorofenóis que originam o 2,4,6-tricloroanisol, o precursor 2,4,6-triclorofenol (TCP) é o mais significativo. Na bioconversão, a presença da enzima clorofenol *o*-metiltransferase (CPMOT) é a responsável pelos anisóis formados. Deste modo, na Figura 12, está representada a formação do TCA através do precursor mais eficiente, o 2,4,6-TCP por *O*-metilação. No entanto, nem o TCA nem o TCP são tóxicos para a saúde humana, nas concentrações que são normalmente encontradas (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002; Candeias, 2007; Prak *et al.*, 2007).

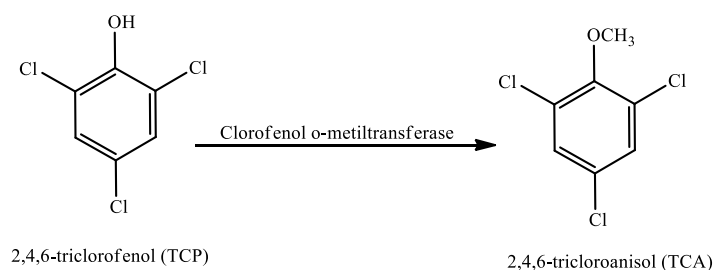


Figura 12: Formação do 2,4,6-tricloroanisol por bioconversão.

Pelo facto de existir uma crescente exigência do consumidor e da preferência pelo vinho com elevada qualidade, as rolhas de cortiça colocam-se numa categoria mais exigente onde a sua qualidade é de relevante importância. O TCA pode ser detetado em

diversas etapas do processo de fabrico das rolhas de cortiça. Durante este processo a água de cozedura das pranchas bem como a água de lavagem das rolhas podem ser analisadas de modo a detetar o TCA libertável.

Devido à complexidade da matriz das amostras e à baixa concentração de TCA nelas contida, é muitas vezes necessário proceder-se à preparação das amostras, recorrendo a pré-concentrações ou extrações. As técnicas para a determinação do TCA são: a microextração em fase sólida (SPME) (Alzaga *et al.*, 2003; Ezquerro *et al.*, 2006; Juanola R. *et al.*, 2005), a pervaporação (PV) (Garcia *et al.* 2015; Gómez-Ariza *et al.*, 2004), a extração por fluido pressurizado (PFE) (Ezquerro *et al.*, 2006), a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) (Campillo *et al.*, 2010), a extração por soxhlet (Ezquerro *et al.*, 2006), a extração por micro-onda (Ezquerro *et al.*, 2006) e a extração por fluido supercrítico (SFE) (Ezquerro *et al.*, 2006; Lack *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2000).

Um método muito relevante neste contexto é o sistema ROSA[®] (*Rate of Optimal Stream Application*), que usa vapor de água controlado para eliminar qualquer vestígio de TCA. O êxito deste método foi comprovado, tanto em testes de dimensão industrial, como em pesquisas independentes por laboratórios de renome em três continentes (Amorim Cork, 2016).

Para detetar a presença de TCA no vinho, Alzaga *et al.*, (2003) recorreram à cromatografia gasosa com deteção por captura de eletrões (GC-ECD), após se realizar a microextração em fase sólida (SPME) o que permitiu quantificar concentrações de TCA entre 2,9 e 18 ng/L. Enquanto Taylor *et al.*, (2000) conseguiram quantificar TCA na cortiça, através da extração por fluido supercrítico (SFE), acoplada à cromatografia gasosa – espectrometria em massa com monitoração seletiva de iões (GC-MS/SIM), com quantidades detetáveis entre 0,13-2,11 µg/g de cortiça.

Para quantificar o TCA libertável nas rolhas de cortiça, Juanola *et al.*, (2004) analisaram amostras de rolhas de cortiça não contaminadas e naturalmente contaminadas, após realizar extração com *n*-pentano, tendo quantificado concentrações de TCA entre 0,08 e 105,01 µg/kg.

2.5. Compostos bioativos

Os compostos bioativos de natureza antioxidante, naturalmente presentes nos alimentos e subprodutos, têm interesse devido aos efeitos benéficos para a saúde e bem-estar e ainda para a prevenção de doenças.

Os extrativos da cortiça habitualmente classificam-se em dois grupos: os constituídos por lípidos e os constituídos por compostos fenólicos. Os lípidos são cerca de um terço do total de extrativos (5-8 % da cortiça) e os compostos fenólicos são representados por taninos em mais de 90 % (Rosa *et al.*, 1989).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido executados com o objetivo de avaliar a presença de compostos fenólicos em rolhas de cortiça e a sua interação com o vinho. Sousa *et al.*, (2006) realizaram diversos estudos sobre a composição polifenólica bem como na identificação de diversos polifenóis de baixo peso molecular na cortiça.

2.5.1. Compostos lipofílicos e fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem à classe dos compostos que inclui uma diversidade de estruturas simples e complexas pela presença de um sistema benzénico com um ou mais grupos hidroxilo (Figura 13). Os ácidos fenólicos não têm uma influência direta sobre as propriedades organoléticas do vinho, mas alguns deles são precursores de fenóis voláteis, ou seja, contribuem para a sua cor e sabor (Fernandes *et al.*, 2011).

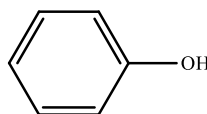


Figura 13: Estrutura benzénica (fenólica) C6 com grupo hidroxilo (OH).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em várias classes, os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos (Touati *et al.*, 2015). Para alguns autores, os ácidos fenólicos (ácido elágico, ácido protocatecuico e ácido vanílico) são os mais identificados na cortiça, embora também seja detetado ácido cafeico, escopoletina, ácido ferúlico, coniferaldeído, sinapaldeído, ácido benzóico, ácido *p*-cumárico, entre outros (Figura 14). Silva *et al.*, (2005) identificaram os taninos elagitaninos, em particular a castalagina. A abundância relativa de cada composto fenólico identificado demonstra ser variável mediante a origem geográfica da cortiça (Touati *et al.*, 2015). Em Portugal e Espanha, o ácido elágico, gálico e protocatechuico, foram identificados como os principais compostos presentes na cortiça (Touati *et al.*, 2015).

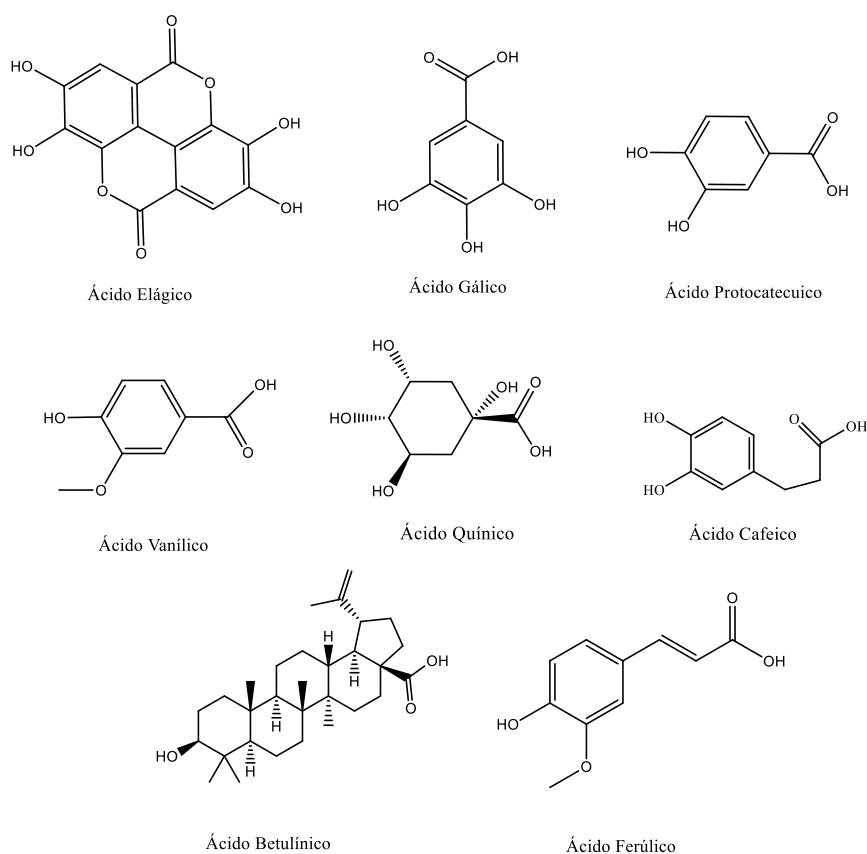


Figura 14: Estruturas de alguns compostos bioativos identificados em extratos da cortiça. Adaptado de (Castola *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010).

2.5.2. Propriedades antioxidantes

O interesse pelos compostos fenólicos naturais baseia-se numa grande variedade de propriedades relevantes, nomeadamente na indústria de alimentos, cosméticos, plásticos e farmacêutica, tais como, propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, eliminadores de radicais e antimicrobianas, anticancerígenas, anti-HIV, antibacterianas, antimutagénicas, antialérgicas, antifúngicas e outras atividades biológicas, quando isoladas de várias plantas (Santos *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2005). Desta forma, a importância destes compostos tem aumentado de forma evidente, não só pela sua capacidade de neutralizar radicais livres associados a doenças mas também por não apresentarem efeitos adversos como é frequente com os compostos sintéticos (Santos *et al.*, 2010).

Os principais compostos triterpénicos dos extrativos da cortiça são: fredelina, betulina, ácido betulínico, cerina e β -sitosterol. A fredelina é um composto conhecido como analgésico e anti-inflamatório. Vários autores relataram as atividades antifúngicas

deste composto e concluíram que deveria ser um potencial candidato no tratamento de algumas doenças infecciosas. Relativamente ao ácido betulínico, este cativa uma especial atenção, uma vez que mostra uma grande variedade de propriedades biológicas e medicinais. Alguns autores mencionaram que o ácido betulínico apresenta várias propriedades farmacológicas e outras atividades biológicas, quando isoladas de várias plantas. Este composto é conhecido principalmente por ser usado no tratamento de doenças cancerígenas. No caso da betulina, verificou-se que possui propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes. Enquanto o β -sitosterol é um composto capaz de reduzir o colesterol alto prevenindo assim doenças cardíacas (Manrique, 2016).

2.5.3. Impressão Molecular

Devido às inúmeras propriedades acima referidas, tem sido verificado um crescimento no interesse por estes compostos naturais, nomeadamente pelas indústrias farmacêutica, biomédica, biotecnológica e cosmética.

A técnica de impressão molecular visa a criação de cavidades feitas sob medida, com uma alta especificidade e afinidade em relação a uma molécula alvo particular, dentro de uma rede de polímero, desempenhando assim um papel de anticorpos artificiais como apresentado na Figura 15. Esta técnica foi sugerida em trabalhos recentes para obter materiais que juntam características de reconhecimento molecular. Devido à simplicidade da preparação e à sua estabilidade química, os polímeros molecularmente impressos (MIPs) abrangem diferentes tipos de aplicações, incluindo separação (cromatografia e bio-separações), sistemas de extração em fase sólida (SPE) e entre outros (Gomes *et al.*, 2017; Kadhivel *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

Após a formação da rede (muitas vezes através de uma polimerização de radicais livres usando um alto conteúdo de agente reticulante), os locais de ligação concedidos devem preservar a estabilidade geométrica, permitindo assim a absorção e a libertação da molécula alvo em vários ciclos. A fim de assegurar a estabilidade geométrica e a reversibilidade do processo de reconhecimento molecular, uma grande quantidade de agente de reticulação (80 % ou mais) é frequentemente utilizado na síntese de MIPs (Oliveira *et al.*, 2016). No entanto, vários autores notaram que o desempenho dos MIPs é afetado por vários fatores, nomeadamente o processo de preparação (a composição química, as interações entre a molécula modelo e o monómero funcional) e pelo mecanismo da reação em solução, massa ou precipitação/suspensão (Oliveira *et al.*, 2016). O comportamento dos MIPs no reconhecimento molecular também é afetado pela

morfologia dos materiais obtidos devido à possível limitação dos mecanismos de transferência de massa (o tamanho da molécula alvo desempenha um papel importante) e da área superficial disponível (Gomes *et al.*, 2017).

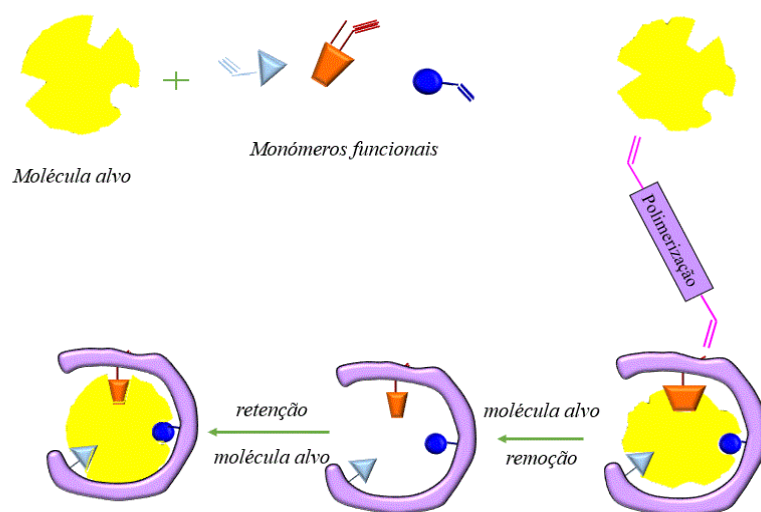


Figura 15: Esquema representativo da síntese de MIPs.

Além disso, o desempenho no reconhecimento molecular por parte dos MIPs depende também das condições de aplicação, particularmente a extensão das interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre os MIPs e as moléculas alvo, bem como das suas interações com os solventes considerados e as diferentes moléculas presentes nas soluções. Neste contexto, um dos parâmetros mais importantes é a polaridade do solvente considerado nos processos de sorção/dessorção (Gomes *et al.*, 2017; Kadhivel *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

Esta técnica vai ser utilizada neste trabalho para a concentração, retenção e libertação controlada de compostos bioativos presentes em extratos de cortiça, nomeadamente polifenóis.

2.6. Extração com fluido supercrítico (SFE)

A extração com fluido supercrítico tem vindo a ser explorada pela indústria (Galicia-Luna *et al.*, 2000), uma vez que é conhecida como uma tecnologia “verde” e com um grande potencial de expansão industrial em Portugal (Gomes *et al.*, 2007). Na Figura 16 está representada a instalação de extração com fluido supercrítico (CO₂) usada neste trabalho.

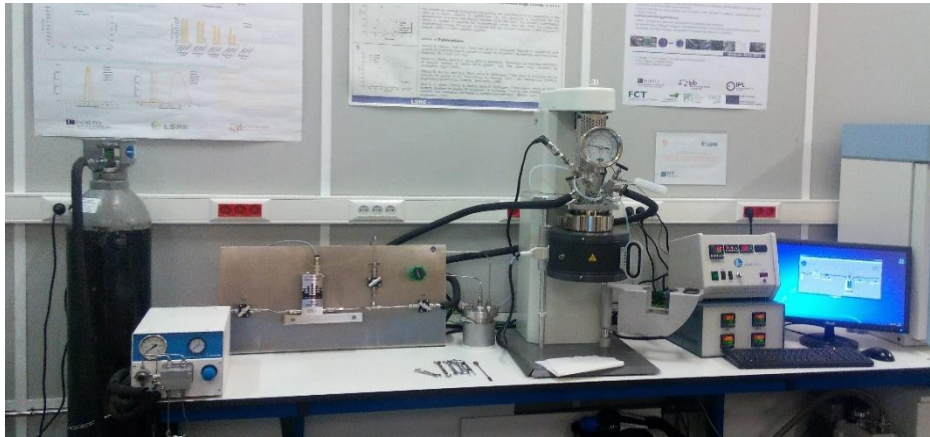


Figura 16: Instalação experimental usada neste trabalho na extração com fluido supercrítico (SFE).

2.6.1. Características dos Fluidos Supercríticos

Do ponto de vista termodinâmico, o diagrama de fases de uma substância é uma representação gráfica onde é possível observar-se as condições de equilíbrio entre fases termodinamicamente distintas. Um diagrama de fases, seja de uma substância pura ou de uma mistura de substâncias, mostra em que regiões de pressão e temperatura as diversas fases são termodinamicamente estáveis conforme pode ser observado sob o ponto de vista genérico na Figura 17 (Herrero *et al.*, 2010, McHugh *et al.*, 1994).

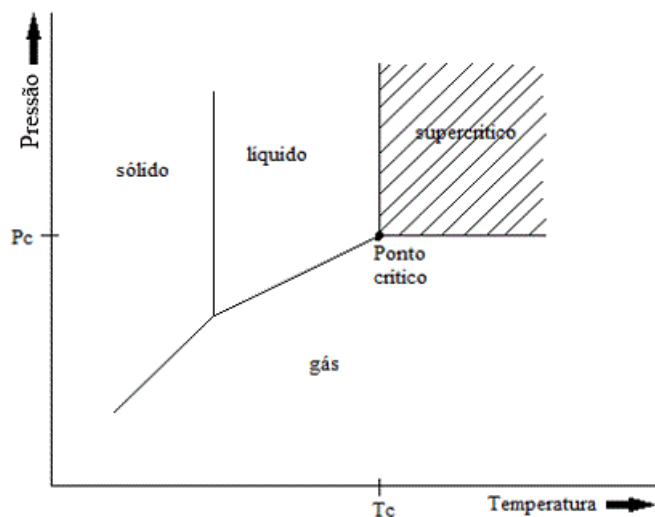


Figura 17: Diagrama de fases típico de uma substância pura.

A pressão crítica pode ser definida como a pressão mínima necessária para fundir um gás a uma determinada temperatura, enquanto a temperatura crítica pode ser definida como a temperatura acima da qual é impossível fundir um gás por compressão. Assim, uma substância acima da temperatura crítica ainda se comportará como um gás, independente da pressão aplicada (Mukhopadhyay, 2000).

No estado supercrítico, as substâncias possuem características intermediárias entre um gás e um líquido. Os fluidos supercríticos possuem coeficientes de difusão próximos aos de um gás. A sua capacidade de difusão chega a ser superior à dos líquidos em uma a duas ordens de magnitude, o que proporciona uma rápida e eficiente transferência de massa. Outra característica é a sua baixa viscosidade e a ausência de tensão superficial, o que facilita a penetração dos fluidos supercríticos na matriz sólida (Carrilho *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2010; McHugh *et al.*, 1994; Mukhopadhyay, 2000). O CO₂ é muito usado em processos supercríticos dado que é possível operar em condições amenas de temperatura e pressão e também porque, dada a sua abundância, é relativamente um gás barato.

2.6.2. Instrumentação/Operação

Um sistema de extração supercrítica com CO₂ (Figura 16 e Figura 18) inclui basicamente os seguintes componentes: uma fonte de CO₂, um compressor ou bomba de alta pressão, um vaso extrator, uma válvula de decompressão e uma câmara de separação, além de diversos controladores de temperatura e pressão. O CO₂ pressurizado, no estado líquido, é fornecido ao sistema através do compressor, passando por um pré-aquecimento, onde a temperatura é elevada, ocorrendo assim a passagem do estado líquido para o estado supercrítico. O CO₂ supercrítico, à medida que flui no sistema, passa pela matriz sólida localizada na câmara de extração. Após a mistura soluto-solvente este é submetido à despressurização. Quando a pressão e temperatura são reduzidas, o extrato precipita no extrator (Carrilho *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2010; McHugh *et al.*, 1994; Mukhopadhyay, 2000).

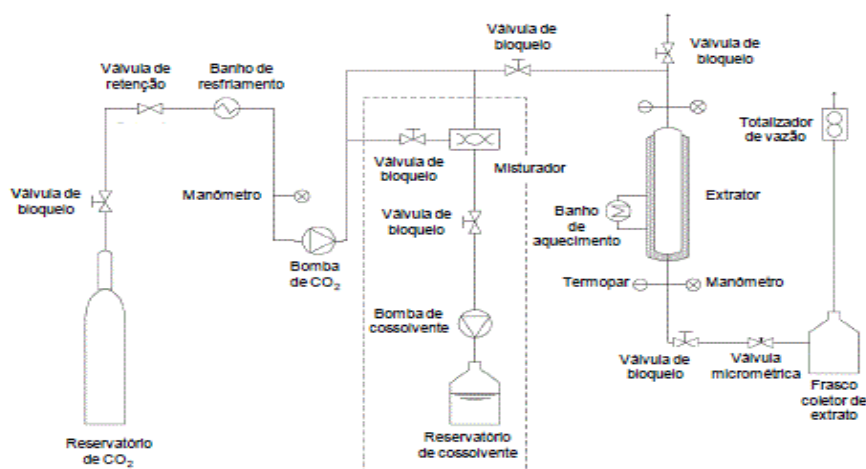


Figura 18: Esquema básico do processo de extração supercrítica. Adaptado de (Farias-Campomanes *et al.*, 2013).

Como foi atrás mencionado, a extração com CO₂ supercrítico é atualmente utilizada em processos sustentáveis e em áreas de grande variedade, incluindo a indústria alimentar, farmacêutica e engenharia ambiental (Santos *et al.*, 2012).

Apesar do CO₂ ser um solvente de baixa polaridade e sua seletividade variar consideravelmente com a densidade, a extração supercrítica permite um ajuste das condições de extração de acordo com as necessidades específicas das substâncias a serem extraídas, assim como o fracionamento dos extratos (Manrique, 2016; McHugh *et al.*, 1994; Mukhopadhyay, 2000).

Em geral, neste tipo de processos, o *software* utilizado ajuda a visualizar todas as condições de operação de uma forma simples, podendo haver um bom controle da experiência e também monitorizar e registrar todas as condições de operação (temperatura, pressão, etc.) nos intervalos de tempo definidos.

2.6.3. Extração supercrítica de 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) na cortiça

O TCA é o composto mais frequentemente associado à contaminação de cortiça nos vinhos. Os valores encontrados na bibliografia para os limites de TCA diferem de autor para autor. Os bons especialistas em vinhos reconhecem um teor de TCA de cerca de 2 ng/L, enquanto os consumidores usuais observam concentrações entre 5-10 ng/L (Juanola *et al.*, 2004; Lack *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2000).

A extração com fluido supercrítico (SFE) oferece um método de extração rápido e seletivo que usa pequenos volumes de solventes orgânicos e resulta em extratos concentrados. Lack *et al.*, (2005) indicam que o CO₂ supercrítico permite uma redução do conteúdo de TCA abaixo do limite detetável, 0,5 ng/L. A cortiça tem uma densidade aparente muito baixa (cerca de 60 kg/m³), o que torna necessário um cuidado especial no equipamento para a carga e descarga dos extratos. Lack *et al.*, (2005) concluíram que durante o processo SFE, pressões entre 100-300 bar e temperaturas entre 40-60 °C, o comportamento da elasticidade da cortiça não é alterada e se a rolha no processo final for deformada, 97 % da forma original é novamente alcançada em cerca de 30 segundos.

A extração supercrítica vai ser testada neste trabalho para a remoção de 2,4,6-tricloroanisol. Será também estudado o tratamento de rolhas de cortiça com CO₂ gasoso para remoção do ar contido na cortiça e evitar a formação de “*papinhos*” nos tratamentos com vapor de água, conforme discutido no capítulo 5.

2.6.3.1. Quantificação do TCA extraído em ng/L

O TCA é o principal responsável pelo desenvolvimento de aroma a mofo no vinho engarrafado, devido à sua migração para as rolhas de cortiça, o que resulta em enormes perdas para a indústria do vinho (Peres *et al.*, 2013).

Uma técnica que foi recentemente equacionada para quantificar a presença de TCA, em ng/L, é a voltametria cíclica (CV), uma vez que é um método rápido, de baixo custo, portátil e de utilização fácil (Peres *et al.*, 2013). A CV é a técnica mais frequentemente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta do facto de fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica de processos de oxidação-redução (Pacheco *et al.*, 2013). O varrimento é feito em dois sentidos, a uma velocidade constante e conhecida, permitindo desta forma o estudo de reações eletroquímicas diretas e inversas, através da observação de picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa (Wang, 2006).

Em voltametria cíclica, é aplicado um potencial de onda triangular variável ao Eléctrodo de Trabalho (ET). Como se pode verificar pelo esquema da Figura 19 entre os tempos t_0 e t_1 é aplicada um potencial que inverte o sentido em t_1 , quando atinge um dado potencial, retornando em seguida ao valor inicial de potencial, no tempo t_2 . Dependendo da composição da amostra, a direcção do varrimento inicial pode ser positiva ou negativa. Um varrimento direccionado para valores de potencial mais negativo é designado por varrimento normal, enquanto o varrimento na direcção oposta é denominado por varrimento inverso (Wang, 2006).

Esta técnica vai ser considerada neste trabalho para avaliar a possibilidade de quantificar o TCA em extratos de cortiça. No entanto, será também usado o método mais consensualmente usado na indústria corticeira que é baseado em microextração em fase sólida com cromatografia gasosa e deteção por captura de electrões (SPME-GC-ECD). As análises realizadas neste contexto (deteção na gama de ng/L) são fornecidas pela corticeira Amorim & Irmãos. A quantificação de TCA em concentrações na gama de mg/L será aqui também realizada usando HPLC com deteção UV. Todos estes aspetos serão explorados nos capítulos 4 a 6 deste trabalho.

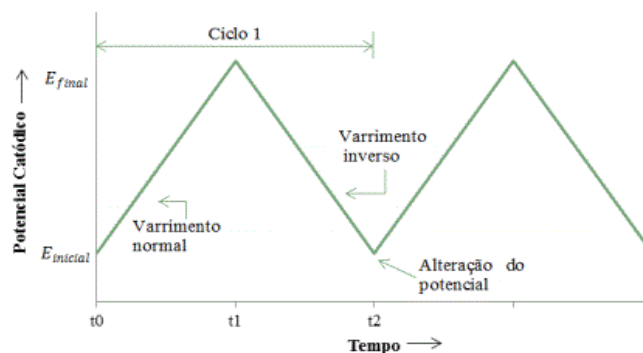


Figura 19: Esquema do potencial de onda triangular da voltametria cíclica. Adaptado de (Wang, 2006).

2.6.4. Extração de compostos bioativos na cortiça

A obtenção de compostos fenólicos presentes na cortiça, *Quercus suber L*, através da extração com CO₂ supercrítico tem também sido bastante explorada durante os últimos anos. Os compostos fenólicos em geral são moléculas muito instáveis, sendo facilmente oxidáveis e suscetíveis à degradação. Os principais fatores que podem desencadear a degradação destes são: temperaturas elevadas, valores extremos de pH e a presença de luz e oxigénio. A extração com fluido supercrítico apresenta uma alternativa para a obtenção de compostos fenólicos, uma vez que proporciona a obtenção de extratos relativamente limpos, ou seja, sem a presença de açúcares, clorofilas e pigmentos, em temperaturas baixas, o que garante a estabilidade destes compostos (Junior *et al.*, 2014; Stalikas, 2007). Geralmente com este método de extração, usam-se pressões mais elevadas, na faixa dos 150 a 300 bar, ou adiciona-se co-solvente. Relativamente à temperatura, normalmente são aplicadas temperaturas amenas, na faixa de 35 a 60 °C com o objetivo de evitar a degradação térmica destes. Os co-solventes mais utilizados são: metanol, etanol e acetona (Junior *et al.*, 2014).

A extração supercrítica da casca da cortiça utilizando CO₂ puro resulta na obtenção de compostos lipofílicos e fenólicos. Castola *et al.*, (2005) verificaram a capacidade de CO₂ supercrítico para extrair triterpenos da cortiça. Em primeiro lugar, o material foi previamente pesado (50 g de pó de cortiça) e este foi submetido com uma taxa de fluxo de CO₂ de 0,8 kg/h resultando na obtenção de um rendimento de extrato certa de 7 % nas melhores condições de extração: 220 bar e 50 °C. Após 6 h, a taxa de extração era maior e, após esse tempo, não foram observados aumentos significativos na recuperação do extrato total.

Este método de extração vai também ser considerado neste trabalho para a extração de compostos bioativos na cortiça. No entanto, para efeitos comparativos, serão

também consideradas técnicas alternativas de extração, nomeadamente extração soxhlet, por ultrassons e hidro-alcoólica.

Capítulo 3 – Materiais e Equipamentos

Nesta secção é apresentada uma listagem dos reagentes, equipamentos e materiais utilizados nas sínteses, purificações, testes e aplicações práticas consideradas. Os detalhes sobre a utilização desses materiais e equipamentos são fornecidos nos capítulos 4 a 6 deste documento.

3.1. Reagentes usados na síntese dos MIPs

Na Tabela 1 são descritos os reagentes usados na síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs). Os materiais produzidos foram testados na retenção de polifenóis presentes em extratos de cortiça, conforme explorado no capítulo 6.

Tabela 1: Reagentes utilizados no processo de síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs).

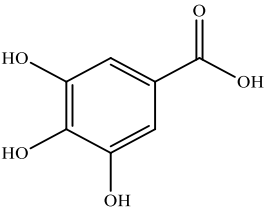
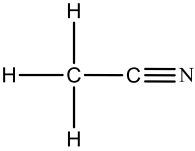
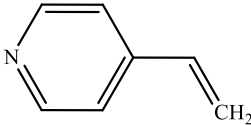
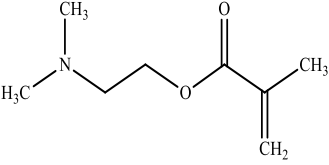
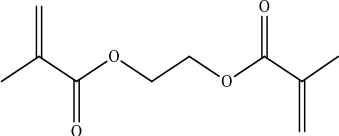
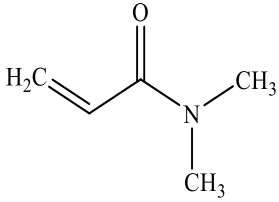
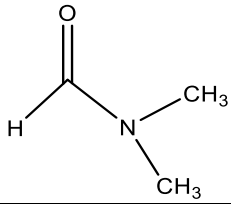
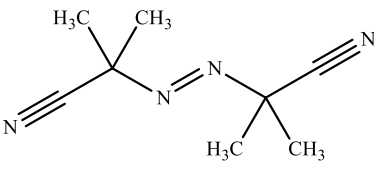
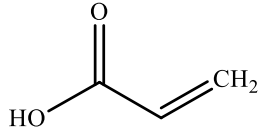
Reagentes	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Massa volúmica (g/ml)	Fornecedor
Ácido gálico (GA)		170,12	1,7	Sigma-Aldrich
Acetonitrilo (ACN)		41,04	0,781	Fisher Chemical
4-vinilpiridina (4VP)		105,4	1,051	Alfa Aesar
Metacrilato de 2-dimetilamino Etilo (DMAEMA)		157,22	0,932	Sigma-Aldrich
Etileno glicol dimetacrilato (EGDMA)		198,22	1,051	Sigma-Aldrich

Tabela 1: (Continuação).

Reagentes	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Massa volúmica (g/ml)	Fornecedor
N,N - Dimetilacrilamida 99 % (DMA)		99,13	0,962	Sigma-Aldrich
N,N-dimetilformamida (DMF)		73,09	0,944	Fisher Chemical
2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo (AIBN)		164,21	1,1	Sigma-Aldrich
Ácido Acrílico (AA)		72,06	1,051	Sigma-Aldrich
Amberlite® XAD4	-	-	1,02	Sigma-Aldrich
Amberlite® XAD7HP	-	-	1,05	Sigma-Aldrich
Supelite™ DAX-8	-	-	1,09	Sigma-Aldrich

3.2. Reagentes utilizados na quantificação de TCA e de polifenóis.

Na tabela 2 são apresentados reagentes utilizados em diversas tarefas relacionadas com a migração de TCA na cortiça e sua quantificação (ex. por HPLC gradiente) e estudos envolvendo a quantificação por voltametria cíclica de TCA e também de polifenóis. Esses aspetos serão explorados fundamentalmente nos capítulos 4 e 5 deste trabalho mas algumas dessas moléculas são também consideradas no capítulo 6 (retenção em MIPs).

Tabela 2: Reagentes utilizados para a quantificação do TCA e dos polifenóis.

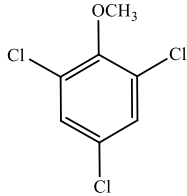
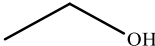
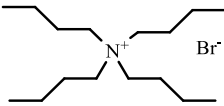
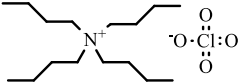
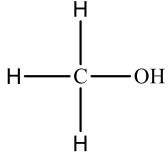
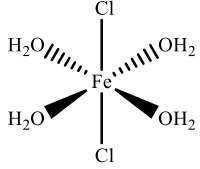
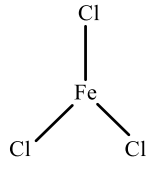
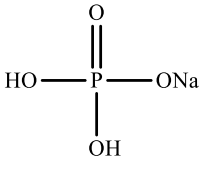
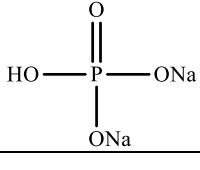
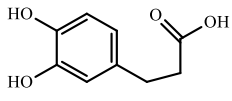
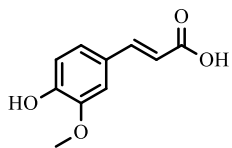
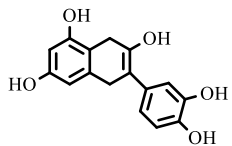
Reagentes	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Densidade (g/mL)	Fornecedor
2,4,6-tricloroanisol 99 % (TCA)		211,47	~1,4	Sigma-Aldrich
Etanol (EtOH)		46,06	0,789	PanReac AppliChem
Tetrafluoro borato de tetrabutilamônio (TBAB)		329,27	-	Sigma - Aldrich
Perclorato de tetrabutilamônio (TBAP)		341,91	-	Sigma – Aldrich
Ácido clorídrico (HCl)	HCl	36,46	1,18	Panreac
Cloreto de Potássio (KCl)	KCl	74,55	1,98	Labkem
Metanol (MeOH)		32,04	0,79	Fisher Chemical
Hidróxido de Sódio (NaOH)	NaOH	39,99	2,13	Vencilab

Tabela 2: (Continuação).

Reagentes	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Densidade (g/mL)	Fornecedor
Cloreto de ferro (II) tetra-hidratado		198,84	-	Sigma - Aldrich
Cloreto de ferro (III)		162,20	-	Acros Organics
Fosfato monossódico (NaH ₂ PO ₄)		120,00	2,03	Panreac
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)		141,96	0,5	Panreac
Ácido Cafeico (CA)		180,16	1,48	Acros Organics
Ácido Ferúlico (FA)		194,18	1,14	Acros Organics
Quercetina Hidratada		302,24	1,8	Acros Organics

Nota: Na preparação das soluções aquosas foi utilizado água desionizada;

3.3. Instrumentação utilizada nos testes de voltametria cíclica

Nos testes realizados por voltametria cíclica (capítulo 5) foi utilizado um potencióstato XPOT da ZaHNER. Este potencióstato opera numa gama de corrente de ± 500 mA e um intervalo de potencial de ± 10 V. As especificações técnicas do instrumento XPOT considerado são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Especificações técnicas do Potencióstato – XPOT.

Modo de operação	pot/gal
Intervalo de potencial	$\pm 4 \text{ V} / \pm 10 \text{ V}$
Precisão da potência	$\pm 0,1 \% / \pm 1 \text{ mV}$
Intervalo de corrente	$\pm 10 \text{ nA} - \pm 500 \text{ mA}$
Precisão de corrente	$0,2 \% / 100 \text{ pA}$
Dissipação da potência	$30 \text{ W} @ T_a$
Potência de saída	$12 \text{ W} @ T_a$
Intervalo de frequência	$10 \mu\text{Hz} - 200 \text{ kHz}$
Intervalo de impedância	$0,1 \Omega - 1 \text{ G}\Omega$
Temperatura ambiente do equipamento	$0 \text{ }^\circ\text{C} \dots 20 \text{ }^\circ\text{C}$
Requisitos do sistema	IM6/Zennium + EPC42

Nos testes de voltametria cíclica foram utilizados elétrodos com diferentes características dado que a magnitude dos diversos mecanismos eletrolíticos estudados depende das propriedades da superfície dos materiais usados. Na Tabela 4 apresentam-se as especificações fundamentais dos elétrodos utilizados neste trabalho.

Tabela 4: Elétrodos utilizados na voltametria cíclica.

Tipo de eletrodo	Geometria	Diâmetro (mm)	Área (mm²)	Configuração	Fornecedor
Platina (Pt)	Quadrado		400	Contra-elétrodo (CE)	Sensortechnik
Platina (Pt)		2	3,142		Metrohm
Ag/AgCl	Circular	5	19,625	Elétrodo de referência (ER)	Metrohm
Carbono Vítreo		2	3,142	Elétrodo de Trabalho (ET)	Metrohm
Prata		5	19,625		Alfa Aesar
Aço		4	12,566		-
Cobre		5	19,625		-

3.4. Outros equipamentos

Nas diferentes tarefas experimentais e testes realizados neste trabalho foi usado um conjunto de outros equipamentos cujas características fundamentais estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Descrição do conjunto de equipamentos utilizados nos diversos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.

Equipamento	Modelo	Marca	Software
Balança Analítica	AS/220/C/2	RADWAG	-
GPC	GPC Max VE2001		
	TODA 203	VISCOTEK	Paralab
	UV detector 2520	KNAUER	
Extractor Soxhlet	HM01 Series	Labbox	-
Espectrofotômetro UV-vis	V-530	JASCO	VWS-580 Spectra Manager
Bomba de vácuo	RE30022C	Stuart	-
Reator/extrator supercrítico	Parr 4848	Parr instrument CO	LabWIEW
Sistema de extração em fase sólida	Manifold Standard 12 – Port Model	SIGMA ALDRICH	-
Medidor de pH	inoLab	WTW	-
Bomba de HPLC	Azura P 4.1 S	KNAUER	-
Banho de ultrassons	ULTRASONS-H	P SELECTA	-

Capítulo 4 - Modelação da difusão do TCA (2,4,6-tricloroanisol) na cortiça

Neste capítulo apresentam-se resultados relativos ao estudo da difusão do TCA na cortiça. Com este objetivo, foram realizadas experiências de imersão de rolhas de cortiça em soluções líquidas contendo quantidades conhecidas de TCA. Os estudos experimentais foram complementados com o desenvolvimento de um modelo teórico para descrever o equilíbrio de fases líquido/sólido e a difusão do TCA no sólido (cortiça). Neste contexto, apenas foi considerada a difusão radial do TCA na rolha de cortiça, uma vez que é plausível um efeito muito superior relativamente à difusão axial, em consequência da geometria da rolha (elevada razão da área superficial radial relativamente à área dos topos). A organização celular interna da cortiça (meio anisotrópico) e a forma como as rolhas são produzidas também justifica o domínio da difusão radial em relação à axial. Sob o ponto de vista experimental, foi medida a concentração de TCA na fase líquida ao longo do tempo. Com este propósito, fez-se a amostragem do líquido e determinou-se a concentração de TCA através de HPLC gradiente com deteção UV. Note-se que a determinação da concentração de TCA através desta técnica analítica só foi possível porque foram consideradas gamas de concentração muito elevadas (da ordem de mM) em comparação com aquelas em geral encontradas na cortiça (usualmente na ordem de ng/L). A determinação da concentração de TCA na gama de ng/L é na prática feita por microextração em fase sólida com cromatografia gasosa e deteção por captura de eletrões (SPME-GC-ECD), como será explorado no capítulo 5 deste trabalho. A solução do modelo teórico desenvolvido para a difusão do TCA na cortiça foi obtida por implementação do *método das linhas* (MOL) em MATLAB.

4.1. Desenvolvimento do modelo teórico para a difusão do TCA na cortiça

Para o estudo da difusão do TCA na cortiça foi considerada a segunda lei de Fick em coordenadas cilíndricas, apenas com difusão radial, conforme representado na equação 4.1:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{1}{r} \frac{\partial(rN_{Ar})}{\partial r} = D_A \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial C}{\partial r} \right) = D_A \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (4.1)$$

Como condição inicial do problema considerou-se:

$$t = 0, \quad 0 \leq r \leq R \quad C = C_{INIT} \quad (4.2)$$

A coordenada radial r percorre a rolha desde o seu centro ($r=0$) até à superfície externa ($r=R$). Se for considerado que no início do processo difusivo ($t=0$) a rolha não contém TCA, será $C_{INIT} = 0$.

As condições fronteira do problema consideradas foram:

$$t > 0, \quad r = 0, \quad \frac{\partial C}{\partial r} = 0 \quad (4.3)$$

Esta condição aplica-se genericamente no centro ($r=0$) de todos os sólidos de geometria cilíndrica devido à simetria do processo difusivo.

$$t > 0, \quad r = R, \quad D_A \frac{\partial C}{\partial r} \Big|_{r=R} = -N_{Ar}|_{r=R} = k_c(C_S - C_S^*) \quad (4.4)$$

A equação 4.4 descreve o transporte de TCA, da fase líquida para a fase sólida (cortiça) na superfície da rolha (igualdade dos fluxos convectivos e difusivos em $r=R$). Na Figura 20 é apresentado um esquema relativo à difusão de TCA na rolha de cortiça e sua relação com o transporte entre fases (líquido/sólido).

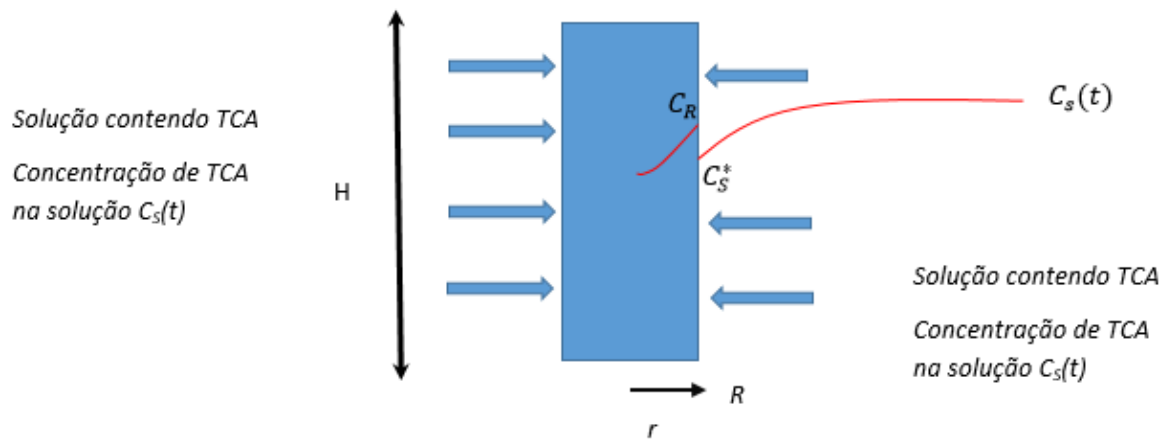


Figura 20: Esquema relativo à difusão de TCA numa rolha de cortiça quando colocada em solução líquida contendo esta molécula. É considerada a variação no tempo da concentração de TCA na fase líquida, o transporte interfases e a difusão radial em estado transiente na rolha de cortiça.

Por outro lado, o modelo inclui também o balanço material ao TCA na fase líquida, como representado pela equação seguinte:

$$V_S \frac{dC_S}{dt} = -2\pi RHk_c(C_S - C_S^*) \quad (4.5)$$

$$t = 0, C_S = C_{S0} \quad (4.6)$$

Note-se que $2\pi RH$ representa a área superficial da rolha de cortiça, k_c o coeficiente de transferência de massa por convecção na fase líquida e C_{S0} a concentração inicial de TCA na fase líquida (valor conhecido).

Considera-se também que na interface sólido/líquido ($r=R$) o TCA se encontra distribuído em equilíbrio termodinâmico entre as duas fases (cortiça/líquido), sendo este equilíbrio descrito por um coeficiente de partição K . O coeficiente de partição do TCA entre fases (cortiça/líquido) é dado pela seguinte equação:

$$K = C_R / C_S^* \quad (4.7)$$

4.2. Implementação numérica do modelo em MATLAB

A resolução numérica do modelo de convecção e difusão foi feita através do método das linhas (MOL – *Method Of the Lines*). Para este efeito é realizada a discretização do raio do cilindro, conforme representado na Figura 21 com a variável x representando a posição radial na rolha.

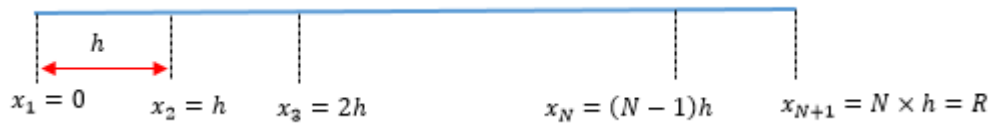


Figura 21: Discretização do raio da rolha de cortiça (cilindro) para implementação do método das linhas (MOL).

Os conceitos e definições fundamentais envolvidos na discretização e implementação das condições fronteira são descritos através das equações 4.8 a 4.20.

A discretização é feita em: N intervalos, sendo o comprimento de cada intervalo

$$h = \frac{R}{N} \quad (4.8)$$

A grelha de discretização contém portanto $N + 1$ pontos, cujas localizações são:

$$x_j = (j - 1)h \quad (4.9)$$

Com $j = 1, \dots, N + 1$

Consideram-se as seguintes aproximações para as derivadas do espaço de primeira e segunda ordem:

$$\left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{x_j} = \frac{C_{x_{j+1}} - C_{x_{j-1}}}{2h} \quad (4.10)$$

$$\left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_{x_j} = \frac{C_{x_{j+1}} - 2C_{x_j} + C_{x_{j-1}}}{h^2} \quad (4.11)$$

As equações diferenciais ordinárias (EDOs) resultantes nos pontos interiores ($j = 2, \dots, N$) são portanto:

$$\begin{aligned} \frac{dC_{x_j}}{dt} &= D_A \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) = D_A \left[\frac{C_{x_{j+1}} - 2C_{x_j} + C_{x_{j-1}}}{h^2} + \frac{1}{x_j} \frac{C_{x_{j+1}} - C_{x_{j-1}}}{2h} \right] = \\ &= D_A \left[\frac{C_{x_{j+1}} - 2C_{x_j} + C_{x_{j-1}}}{h^2} + \frac{C_{x_{j+1}} - C_{x_{j-1}}}{2x_j h} \right] \end{aligned} \quad (4.12)$$

A equação diferencial ordinária (EDO) no eixo da rolha ($x_1 = 0$) resulta da seguinte análise:

$$\begin{aligned} \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\partial C}{\partial t} &= \frac{dC_{x_1}}{dt} = \lim_{r \rightarrow 0} D_A \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) = D_A \left(\left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_{x_1} + \frac{\lim_{r \rightarrow 0} \frac{\partial C}{\partial r}}{\lim_{r \rightarrow 0} r} \right) \\ &= D_A \left(\left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_{x_1} + \frac{0}{0} \right) = D_A \left(\left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_{x_1} + \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\frac{\partial}{\partial r} \frac{\partial C}{\partial r}}{\frac{\partial r}{\partial r}} \right) = D_A \left(\left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_{x_1} + \left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_{x_1} \right) \\ &= 2D_A \left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_{x_1} \end{aligned} \quad (4.13)$$

Sendo que no eixo da rolha ($x_1 = 0$) se verificam as seguintes igualdades:

$$\frac{\partial C}{\partial r} = 0 \quad (4.14)$$

$$\frac{\partial C}{\partial x} \Big|_{x_1} = \frac{C_{x_2} - C_{x_0}}{2h} = 0 \quad (4.15)$$

Sendo portanto:

$$C_{x_0} = C_{x_2} \quad (4.16)$$

De onde resulta a EDO para a concentração de TCA no eixo da rolha:

$$\begin{aligned} \frac{dC_{x_1}}{dt} &= 2D_A \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \Big|_{x_1} = 2D_A \frac{C_{x_2} - 2C_{x_1} + C_{x_0}}{h^2} = 2D_A \frac{2C_{x_2} - 2C_{x_1}}{h^2} = \\ &= 4D_A \frac{C_{x_2} - C_{x_1}}{h^2} \end{aligned} \quad (4.17)$$

Sobre o raio externo da rolha ($x_{N+1} = R$), a respetiva equação diferencial ordinária (EDO) é resultado da seguinte manipulação:

$$D_A \frac{\partial C}{\partial x} \Big|_{x=R=x_{N+1}} = D_A \frac{C_{x_{N+2}} - C_{x_N}}{2h} = k_c(C_S - C_S^*) \quad (4.18)$$

Logo:

$$C_{x_{N+2}} = C_{x_N} + \frac{2hk_c(C_S - C_S^*)}{D_A} \quad (4.19)$$

Sendo portanto:

$$\begin{aligned} \frac{dC_{x_{N+1}}}{dt} &= D_A \left[\frac{C_{x_{N+2}} - 2C_{x_{N+1}} + C_{x_N}}{h^2} + \frac{C_{x_{N+2}} - C_{x_N}}{x_{N+1}h} \right] = \\ &= D_A \left[\frac{C_{x_N} + \frac{2hk_c(C_S - C_S^*)}{D_A} - 2C_{x_{N+1}} + C_{x_N}}{h^2} + \frac{C_{x_N} + \frac{2hk_c(C_S - C_S^*)}{D_A} - C_{x_N}}{x_{N+1}h} \right] = \\ &= D_A \left[\frac{2C_{x_N} + \frac{2hk_c(C_S - C_S^*)}{D_A} - 2C_{x_{N+1}}}{h^2} + \frac{\frac{2hk_c(C_S - C_S^*)}{D_A}}{x_{N+1}h} \right] \end{aligned} \quad (4.20)$$

O modelo fica completo se às $N + 1$ EDOs relativas à discretização do raio da rolha acrescentarmos a equação de conservação do TCA na fase líquida dada pela seguinte expressão e respetiva condição inicial:

$$V_S \frac{dC_S}{dt} = -2\pi RHk_c(C_S - C_S^*) \quad (4.21)$$

$$t = 0, C_S = C_{S0} \quad (4.22)$$

O sistema de $N + 2$ EDOs no domínio do tempo pode ser resolvido em MATLAB usando, por exemplo, a função ODE45.

Nas equações 4.23 a 4.25 apresenta-se a análise dimensional das equações fundamentais do modelo considerado. Optou-se por usar um sistema de unidades com ligação direta às medições realizadas, nomeadamente mM para concentração, cm para espaço e s para tempo.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_A \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (4.23)$$

$$\frac{mM}{s} = \frac{cm^2}{s} \left(\frac{mM}{cm^2} + \frac{mM}{cm^2} \right)$$

$$D_A \frac{\partial C}{\partial r} \Big|_{r=R} = k_c(C_S - C_S^*) \quad (4.24)$$

$$\frac{cm^2}{s} \frac{mM}{cm} = \frac{cm}{s} mM$$

$$V_S \frac{dC_S}{dt} = -2\pi RHk_c(C_S - C_S^*) \quad (4.25)$$

$$cm^3 \frac{mM}{s} = cmcm \frac{cm}{s} mM$$

4.2.1. Parâmetros de ajuste do modelo

O modelo desenvolvido contém três parâmetros de ajuste essenciais para o estudo da difusão do TCA na cortiça. A Tabela 6 descreve os parâmetros de ajuste considerados

neste estudo e a Tabela 7 contém gamas típicas para a difusividade molecular em gases, líquidos e sólidos.

Tabela 6: Descrição genérica dos três parâmetros de ajuste do modelo desenvolvido.

Difusividade do TCA na cortiça	Coefficiente de transferência de massa entre fases (líquido/sólido)	Coefficiente de partição do TCA entre as duas fases (líquido/cortiça)
D_A	k_c	K

Tabela 7: Gamas típicas do coeficiente de difusão molecular em gases, líquidos e sólidos.

Difusão em gases	Difusão em líquidos	Difusão em sólidos
D_A na ordem de 10^{-1} cm ² /s	D_A na ordem de 10^{-5} cm ² /s	D_A na ordem de 10^{-9} cm ² /s

No caso da difusão do TCA na cortiça, quando esta está em contacto com a fase líquida, um valor médio de difusividade (D_A) na ordem de 10^{-6} a 10^{-8} cm²/s deve ser razoável porque a cortiça vai incorporar algum líquido e o material também contém células vazias com ar. Já para o coeficiente de transferência de massa entre fases (k_c) pode obter-se uma primeira estimativa usando o valor limite do número de Sherwood para uma esfera sujeita apenas a convecção natural, dada pela seguinte equação:

$$Sh = \frac{k_c D_{esfera}}{D_{AB-líquido}} = 2 \quad (4.26)$$

Sendo D_{esfera} o diâmetro da esfera e $D_{AB-líquido}$ a difusividade do TCA na fase líquida. Para D_{esfera} pode usar-se o diâmetro da esfera que seria equivalente ao mesmo volume da rolha (dimensões médias de uma rolha $L \times D = 4,5 \times 2,6$ cm \times cm), ou seja:

$$V_{rolha} = 23,8 \text{ cm}^3 = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{D_{esfera}}{2} \right)^3 \quad (4.27)$$

Sendo portanto $D_{esfera} = 3,57$ cm. Assim, admitindo $D_{AB-líquido} \sim 10^{-5}$ cm²/s para a difusividade do TCA na fase líquida, uma primeira estimativa para o valor de k_c é:

$$k_c = 2 * \frac{D_{AB-líquido}}{D_{esfera}} = 5,6 \times 10^{-6} \text{ cm/s} \quad (4.28)$$

Note-se que é possível obter estimativas mais precisas para o valor da difusividade do TCA no líquido $D_{AB-líquido}$ usando por exemplo a equação de Stokes-Einstein,

modelo de Wilke and Chang ou o modelo de Hayduk and Laudie (ver páginas 438-440 de Fundamentals of Momentum, Heat, and Mass Transfer, J. R. Welty, C. E. Wicks, R. E. Wilson, G. Rorrer, Wiley, 5th Edition, 2007). No entanto, o valor considerado $D_{AB-líquido} \sim 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ é suficientemente preciso tendo em consideração que apenas se pretende obter uma primeira estimativa para k_c . Este parâmetro será depois ajustado através da informação experimental disponível. Da mesma forma, uma correlação alternativa à descrita na equação 4.26 poderia também ser equacionada, mas, pelas mesmas razões anteriormente apontadas, esta relação simples é suficiente para obter uma primeira estimativa para o valor de k_c .

O coeficiente de partição do TCA entre as duas fases (líquido/cortiça), K , descreve a afinidade do TCA entre a fase líquida e a cortiça. Atendendo ao facto do TCA ser uma molécula hidrofóbica, é de esperar a sua maior preferência pela cortiça (elevado valor de K) quando na fase líquida a fração de água é grande.

4.3. Estudos experimentais

Nesta secção apresentam-se os resultados experimentais obtidos no contexto do estudo da difusão do TCA na rolha de cortiça. É também descrita a forma como foi feita a quantificação do TCA na fase líquida através do método analítico HPLC gradiente com deteção UV. Foram realizadas três experiências (casos de estudo) diferenciando-se essencialmente o carácter hidrófilo da fase líquida através da variação da percentagem de água em misturas etanol/água.

4.3.1. Procedimento Experimental

Preparou-se uma solução com concentração conhecida de TCA em EtOH. Esta solução (solução mãe) foi utilizada para preparar todas as soluções de TCA utilizadas neste estudo.

Uma solução contendo TCA com concentração $C=94,82 \text{ mg/L}$ foi preparada a partir da solução mãe usando EtOH/H₂O (12/88) como novo solvente. Verificou-se no entanto a precipitação de algum TCA nestas novas condições, tendo sido feita a recomposição do sistema, por adição de ACN, até atingir condições que permitissem a obtenção de uma solução homogénea. Posteriormente, cerca de 100 mL desta solução foram colocados num recipiente fechado contendo uma rolha de cortiça (que iria ficar submersa no líquido). A solução de partida foi injetada no sistema HPLC gradiente com

deteção UV para se conhecer a resposta UV do TCA na solução inicial ($t=0$). Após 24 h, voltou-se a injetar a solução de partida que tinha sido colocada num frasco de plástico. Verificou-se um decréscimo acentuado e inesperado, de cerca de 80 %, da área do pico do TCA. A explicação para esta observação é a elevada afinidade da molécula do TCA com o plástico (ambos hidrofóbicos) que terá funcionado como adsorvente.

Em consequência, decidiu-se recomeçar a experiência, substituindo frascos de plástico por frascos de vidro, e colocando também papel de alumínio a impedir o contacto da solução com a tampa de plástico (ver Figura 22). Desta forma, tentou-se impedir a migração de TCA para outros locais que não fossem a rolha de cortiça. De forma semelhante, foram realizadas outras experiências em que se fez variar a composição do solvente em termos da sua fração em água. Em todas as experiências, para além do sistema contendo a rolha de cortiça, foi considerado em paralelo um sistema em condições similares mas na ausência de rolha de cortiça (*branco*), conforme representado na Figura 22. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).



Figura 22: Registo fotográfico de uma experiência realizada para o estudo da difusão do TCA em rolhas de cortiça. A imersão de uma rolha numa solução contendo TCA foi acompanhada pela experiência análoga em “*branco*”.

Na Tabela 8 são resumidas as condições experimentais utilizadas para cada experiência realizada.

Tabela 8: Condições utilizadas nas experiências relativas ao estudo da difusão do TCA em rolhas de cortiça.

Experiência	V _{Solução mãe} (mL)	Solvente (v/v)	C _{final} (mg/L)
1	20,86	83 % H ₂ O/12 % EtOH/5 % ACN	94,82
2		65 % H ₂ O/35 % EtOH	
3		50 % H ₂ O/50 % EtOH	

4.3.2. Quantificação de TCA através de HPLC gradiente com detecção UV

Para estudar a difusão do TCA (2,4,6-tricloroanisol) numa rolha de cortiça, o método analítico considerado foi HPLC gradiente com detecção UV. Note-se que o uso desta técnica analítica só foi possível porque foram consideradas gamas de concentração de TCA muito mais elevadas (da ordem de mM) do que aquelas encontradas na cortiça (na ordem de ng/L). O uso de SPME-GC-ECD será explorado no capítulo 5 para quantificação de TCA em concentrações da ordem de ng/L. As amostras retiradas ao longo do tempo da fase líquida foram analisadas usando uma coluna Ascentis® C18, com um tamanho de partícula de 5 µm e com dimensões L × ID = 25 cm × 4,6 mm. A coluna foi colocada num sistema GPC Viscotek + Viscotek TDA 305, incorporando também um detetor UV. O gradiente de solvente usado iniciava-se com o solvente A=90 % de H₂O e 10 % de ACN a pH=3 (ajustado com ácido acético) e terminava no solvente B=10 % de H₂O e 90 % de ACN a pH=3 (ajustado com ácido acético). O tempo de análise foi de 45 minutos, a um caudal de Q=1 mL/min, com a coluna a 45 °C e considerando o comprimento de onda λ=280 nm (este comprimento de onda foi escolhido tendo em consideração o varrimento espectral apresentado na Figura 23).

Na Figura 24 apresentam-se cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente de soluções contendo TCA a diferentes concentrações (partiu-se de uma solução mãe com concentração de 206 mg/L). Essas análises mostram um pico correspondente ao TCA bem definido, por volta de 39 min, caso a concentração desta molécula seja suficientemente elevada. De facto, os resultados apresentados na Figura 24 mostram que a quantificação de TCA deixa de ser possível por esta técnica quando a sua

concentração é inferior a cerca de 20 mg/L. Nesse caso (ver Figura 24 (c)), apenas o sinal correspondente ao ruído do sistema é observável, como se conclui através da comparação com a análise do branco (note-se que o pico observado a cerca de 36 min é ruído intrínseco do sistema de análise).

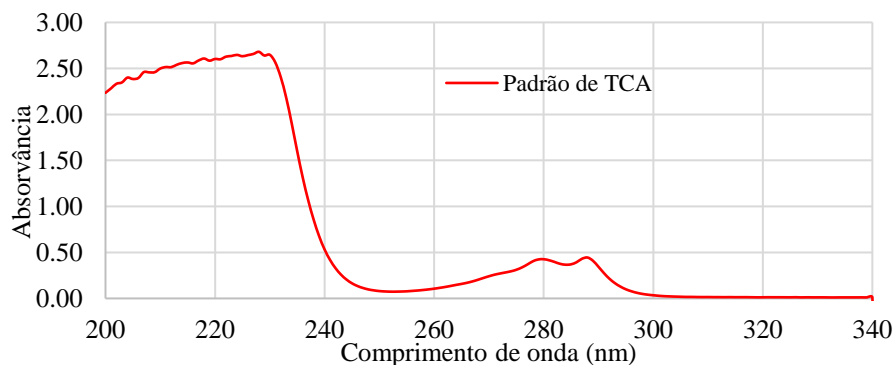


Figura 23: Varrimento espectral de uma solução de TCA em etanol indicando um máximo de absorvância a cerca de 280 nm.

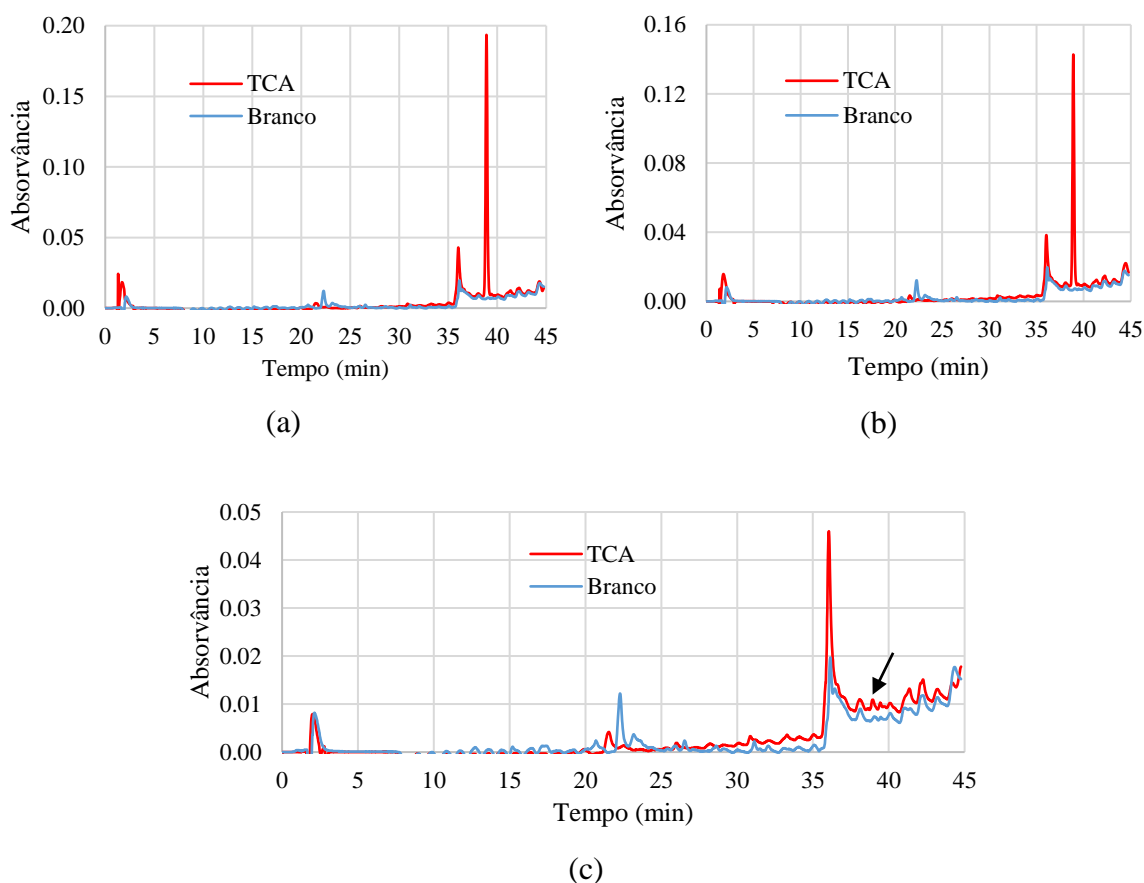


Figura 24: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente com detecção UV de soluções contendo TCA ($\lambda=280$ nm). As soluções injetadas foram preparadas a partir de uma solução mãe de TCA em etanol com concentração 206 mg/L. (a) Diluição da solução mãe em ACN/H₂O (50/50) com fator de diluição F=1,5; (b) Diluição da solução mãe em ACN/H₂O (50/50) com F=2; (c) Diluição da solução mãe em EtOH/H₂O (12/88) com F=10.

Deste modo, nas experiências para estudo da difusão do TCA nas rolhas de cortiça, a concentração de TCA na fase líquida foi estimada através do cálculo da área do pico observado por volta de 39 min (ver Figura 25). Em todos os casos, foi feita a análise da solução inicial ($t=0$) e também de amostras recolhidas da experiência em branco (ver Figura 25).

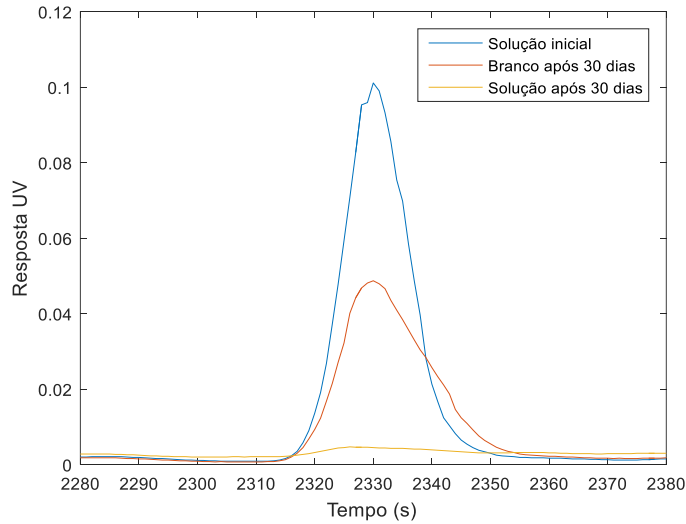


Figura 25: Exemplos de cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente de amostras contendo TCA ($\lambda=280$ nm). Foi realizado este tipo de análises para amostras retiradas ao longo do tempo nas experiências de estudo da difusão do TCA na cortiça.

Com base na quantidade de TCA na fase líquida, assim estimada para cada tempo de amostragem (A_s), e tendo em consideração o pico correspondente à solução inicial (A_0), foi calculada a fração de TCA transferida para rolha de cortiça, como representado na equação seguinte:

$$f_1 = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \quad (4.29)$$

No entanto, como se pode observar na Figura 25, a própria área do pico de TCA correspondente à experiência em branco varia com o tempo, o que pode indicar uma fonte não identificada de consumo de TCA, para além da rolha. Assim foi estimada uma segunda fração de TCA transferido para a cortiça, considerando também esta migração suplementar da molécula:

$$f_2 = \frac{A_B - A_s}{A_0} \quad (4.30)$$

Em que A_B representa a área do pico de TCA da amostra recolhida da experiência em branco, no mesmo tempo de amostragem em que se mediu A_S .

Os estudos de ajuste do modelo teórico desenvolvido e implementado numericamente em MATLAB foram realizados considerando dois cenários para os dados experimentais:

Caso 1: consideração direta dos valores experimentais correspondentes a f_1 , não contabilizando portanto fontes suplementares de retenção de TCA para além da cortiça.

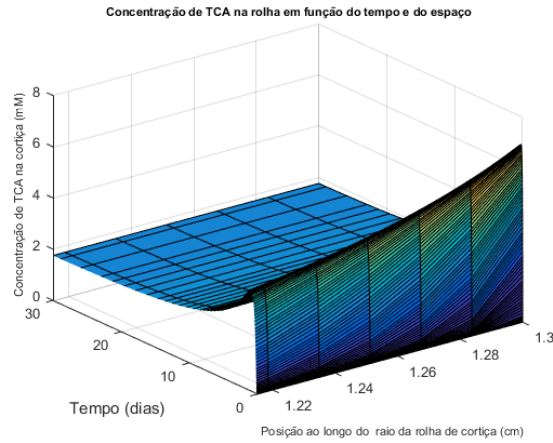
Caso 2: consideração da média dos valores de f_1 e f_2 e do respetivo desvio padrão. Neste caso inclui-se na análise o efeito de fontes suplementares de consumo de TCA e os desvios observados permitem avaliar o carácter aleatório dessas contribuições.

4.4. Comparação dos resultados experimentais com previsões teóricas e ajuste de parâmetros do modelo

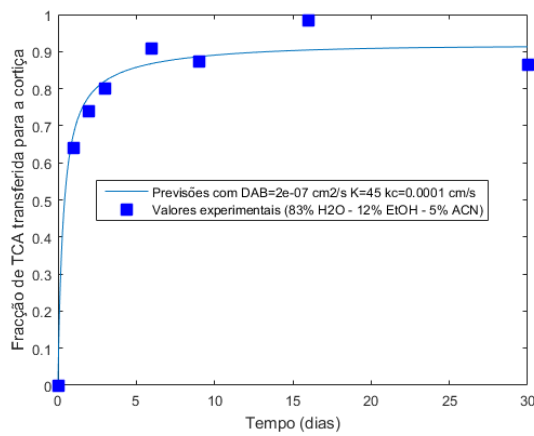
Nas Figuras 26 a 28 apresentam-se resultados relativos à solução do modelo teórico desenvolvido e implementado posteriormente em MATLAB, nomeadamente a variação da concentração de TCA na rolha de cortiça em função da posição no espaço (raio) e do tempo. Usou-se na integração do sistema de ODEs, resultante da discretização do espaço, a função ODE45 do MATLAB. Tipicamente, foi considerado um sistema de $N + 2 = 202$ EDOs simultâneas no domínio do tempo, tendo no entanto sido avaliado o efeito do aumento de N até não se observarem modificações na solução do problema.

A solução do problema fornece também a variação da concentração de TCA na fase líquida ao longo do tempo (Equação 4.21), permitindo portanto o cálculo da fração de TCA transferido para a cortiça, conforme previsões apresentadas nas Figuras 26 a 28. Essas previsões são também comparadas com os valores experimentais calculados em cada caso para os dois cenários atrás descritos.

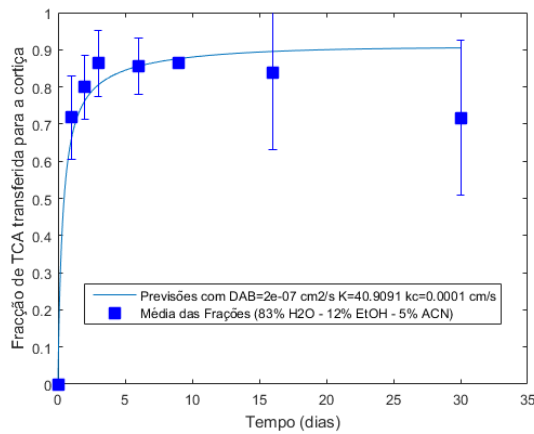
A análise da sensibilidade das simulações relativamente aos três parâmetros do modelo, D_{AB} , k_c e K , mostrou uma menor dependência em relação aos valores de D_{AB} e k_c e um forte efeito de K nas previsões. Desta forma, foi decidido fixar D_{AB} e k_c nas diferentes experiências e proceder à otimização do valor de K correspondente a cada experiência.



(a)

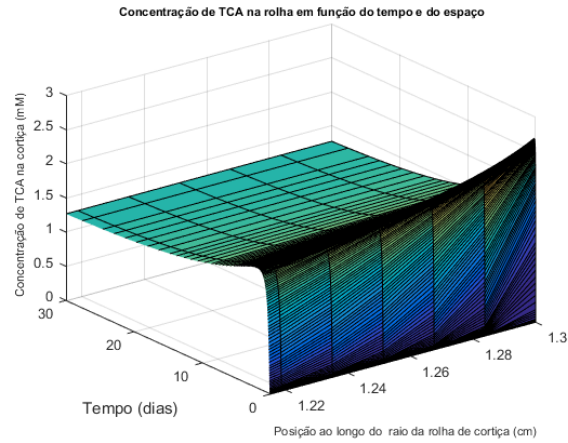


(b)

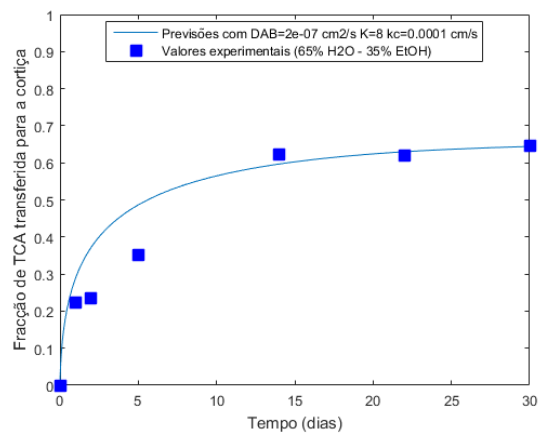


(c)

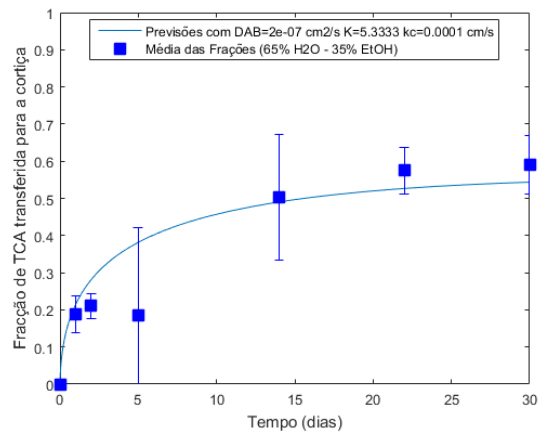
Figura 26: Resultados para as simulações do modelo desenvolvido e implementado em MATLAB e comparação com os valores experimentais (Exp. 1): (a) Previsão da concentração de TCA na rolha em função do tempo e do espaço (b) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 1); (c) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 2).



(a)

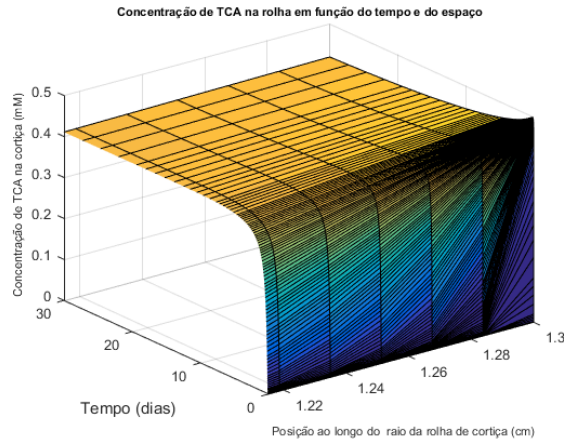


(b)

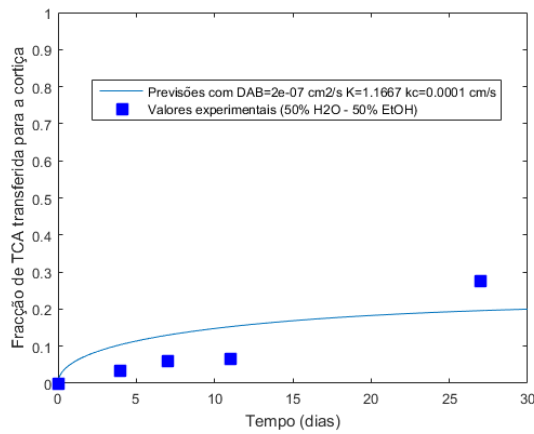


(c)

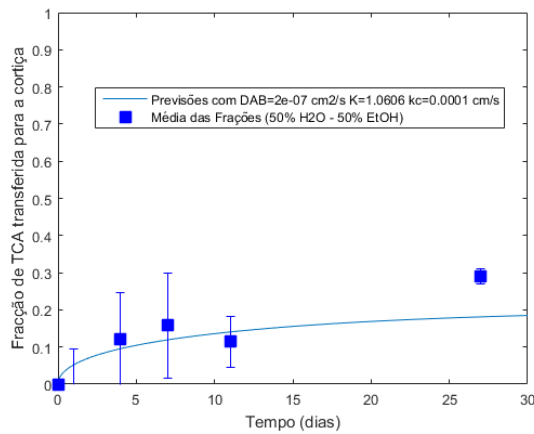
Figura 27: Resultados para as simulações do modelo desenvolvido e implementado em MATLAB e comparação com os valores experimentais (Exp. 2): (a) Previsão da concentração de TCA na rolha em função do tempo e do espaço (b) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 1); (c) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 2).



(a)



(b)



(c)

Figura 28: Resultados para as simulações do modelo desenvolvido e implementado em MATLAB e comparação com os valores experimentais (Exp. 3): (a) Previsão da concentração de TCA na rolha em função do tempo e do espaço (b) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 1); (c) Comparação entre a previsão e valores experimentais para a fração de TCA transferido para a rolha (caso 2).

Na Tabela 9 apresenta-se de forma resumida o conjunto de valores para os três parâmetros do modelo, obtidos com as diferentes condições experimentais consideradas.

Tabela 9: Valores dos três parâmetros do modelo estimados com as diferentes condições experimentais consideradas.

	Experiência	<i>K</i>	<i>k_c</i> (cm/s)	<i>D_{AB}</i> (cm²/s)
1	Caso 1	45	1×10^{-4}	2×10^{-7}
	Caso 2	41		
2	Caso 1	8		
	Caso 2	5		
3	Caso 1	1.17		
	Caso 2	1.06		

Os estudos realizados mostraram que apenas variando substancialmente os valores de *K* para as diferentes experiências realizadas, onde foi alterado o carácter hidrófilo do solvente, era possível obter um ajuste razoável entre as previsões e os valores experimentais. Assim, foram fixados os valores de *k_c* e *D_{AB}* em todas as experiências e otimizados os valores de *K*. A otimização foi feita por tentativa erro para minimização da função objetivo. Note-se que estudos de otimização mais precisos (só com *K* como parâmetro de ajuste ou incluindo as três variáveis) poderão ser realizados considerando também funções intrínsecas do MATLAB como LSQNONLIN (ex.). No entanto, no contexto da presente investigação, resulta de forma inequívoca (com esta análise simples) a forte dependência de *K* do carácter hidrófilo do solvente usado, considerando o caso 1 ou 2. Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que *K* diminui substancialmente quando o carácter hidrófilo do solvente diminui (ver também Tabela 8). Recorde-se que $K = C_R / C_S^*$ mede a partição do TCA entre o líquido e a cortiça e o aumento de *K* corresponde a uma maior preferência desta molécula pela cortiça. Ou seja, quanto mais hidrófila for a fase líquida (aumento da quantidade de água) maior a tendência para o TCA migrar (ou permanecer) na cortiça. Estes dados são também relevantes nas extração do TCA da cortiça e mostram que solventes apolares, como por exemplo o CO₂, deverão ser mais eficientes na remoção desta molécula do sólido.

Capítulo 5 – Extração do TCA da cortiça com CO₂ supercrítico, avaliação da deformação da cortiça e quantificação analítica do TCA

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos com a extração de 2,4,6-tricloanisol (TCA) da cortiça natural, usando um fluido supercrítico (SFE), sendo também discutidas as alterações introduzidas nas propriedades mecânicas da cortiça e na geometria das peças iniciais (deformações). Os vários tipos de cortiça (rolhas, cubos e granulado) foram sujeitas a extração com CO₂ supercrítico e, de seguida, foram analisados os extratos obtidos por HPLC gradiente com deteção UV. Destacam-se ainda neste contexto os testes realizados com rolhas de cortiça positivas, cujo teor inicial de TCA (ng/L) era conhecido, conforme determinado pela Corticeira Amorim & Irmãos. Em concreto, as rolhas positivas fornecidas pela Corticeira Amorim & Irmãos foram sujeitas a testes de extração com CO₂ supercrítico e também a ensaios de impregnação com CO₂ gasoso. Posteriormente, avaliou-se a taxa de extração de TCA destas rolhas através de medições com SPME-GC-ECD, efetuadas na Corticeira Amorim & Irmãos. Por fim, avaliou-se a deteção e quantificação de TCA e de compostos fenólicos presentes em extratos de cortiça através da técnica de voltametria cíclica.

5.1. Experiências de extração de TCA da cortiça com CO₂ supercrítico e de Tratamento de Rolhas com CO₂ gasoso

5.1.1. Extração com CO₂ supercrítico

Neste trabalho, a extração com fluido supercrítico foi realizada usando um reator de elevada pressão instalada pela Parolab. Este equipamento inclui um vaso de reação de aço de 970 mL, um sistema de bombeamento para fornecer dióxido de carbono (CO₂), uma válvula de controlo e purga, bem como um regulador de pressão (BPR) e um extrator (TRAP) para obter os extratos finais. Este equipamento é automaticamente controlado através de *software*, instalado também pela Parolab, que permite definir os seguintes *set-point*: temperatura da entrada de CO₂ no reator (COIL), temperatura do reator, temperatura do BPR e a temperatura da TRAP.

5.1.2. Experiências Realizadas

Nesta subsecção apresentam-se as experiências realizadas no âmbito da impregnação de rolhas com CO₂ gasoso e extração com CO₂ supercrítico (ver Tabelas 10, 11 e 12). Estas experiências foram realizadas num reator de elevada pressão, instalado pela Paralab, como descrito anteriormente. Todas as experiências foram realizadas com amostras fornecidas pela Corticeira Amorim & Irmãos.

Inicialmente realizaram-se experiências com CO₂ supercrítico, considerando rolhas, cubos e granulado de cortiça, e, numa fase posterior, efetuaram-se também ensaios de impregnação de CO₂ gasoso em rolhas de cortiça, como descrito na Tabela 10. Nas duas primeiras experiências foram colocadas 12 rolhas de cortiça no reator com as seguintes características: rolhas com 4,5 cm de comprimento, 2,6 cm de diâmetro (valores médios) e peso total de 48,6 g. Relativamente aos cubos de cortiça, foram colocados 2 cubos (4,7 × 6,3 cm) com um peso total de 54,20 g. No que diz respeito às experiências com granulado de cortiça, foram colocadas duas redes no extrator contendo este material com um peso total de 21,1 g.

As impregnações com CO₂ gasoso tiveram como primeiro objetivo o estudo das condições de temperatura e pressão que permitem a impregnação mais eficiente das rolhas com este gás, sem consequências mecânicas para as mesmas (alteração da geometria e formação de “*papinhos*”). A ideia final subjacente a este procedimento é a possibilidade de expulsar o ar contido na cortiça através da impregnação com CO₂ gasoso e exploração dos consequentes benefícios na extração de TCA. De facto, pensa-se que a formação de “*papinhos*” em condições agressivas de extração com vapor de água poderá resultar da baixa solubilidade do ar na água (ex. ~0,023 g ar/kg água a 1 atm e 25 °C) e consequente deformação do material devido à migração do gás ao longo da matriz de cortiça. A substituição de ar por CO₂ gasoso (muito solúvel em água: ~1,5 g CO₂/kg água a 1 atm e 25 °C) é encarada como uma forma de resolver esse problema.

Os testes de pré-tratamento com CO₂ gasoso incluíram numa primeira fase a impregnação das rolhas de cortiça com este gás e uma segunda fase, similar à primeira, realizada após a imersão das rolhas em água quente (por exemplo) durante um minuto (ex.) à pressão atmosférica. Esta estratégia foi adotada para tentar expulsar grande parte do gás (ar + CO₂) contido na rolha em consequência do primeiro ciclo (aumento da temperatura da rolha provoca a diminuição da solubilidade dos gases) e posterior colocação de novo CO₂ no interior da rolha (segundo ciclo). De facto, foi possível

observar no decurso destas experiências o borbulhar de gases no líquido quando as rolhas eram colocadas em água quente, confirmando-se a saída do ar/CO₂ contidos no material.

Tabela 10: Condições usadas nas experiências relativas à impregnação de materiais de cortiça com CO₂ gasoso e na extração com CO₂ supercrítico.

Experiência	Materiais	Impregnação com CO ₂	Extração com CO ₂
		gasoso	supercrítico
		Condições	Condições
1	12		40 °C – 160 bar – 1 h
2	Rolhas de Cortiça	Não submetidas	40 °C – 160 bar – 2 h co-solvente (5% EtOH)
3	2 Cubos de Cortiça	Não submetidas	40 °C – 160 bar – 25 min co-solvente (5% EtOH)
4	Granulado de Cortiça	Não submetidas	40 °C – 160 bar – 4 h co-solvente (5% EtOH)
5			40 °C – 160 bar – 4 h co-solvente (5% Acetona)
6		100 °C – 56 bar – 3 h (100 g CO ₂) - Rolhas mergulhadas em água quente (85 °C) durante 1 min - Repetição com CO ₂ gasoso	Não submetidas
7	4 Rolhas de Cortiça	90 °C – 30 bar – 3 h (50 g CO ₂) - Rolhas mergulhadas em água quente (85 °C) durante 1 min - Repetição com CO ₂ gasoso	Não submetidas
8		60 °C – 60 bar – 3 h (125 g CO ₂) - Rolhas mergulhadas em água quente (85 °C) durante 1 min - Repetição com CO ₂ gasoso	Não submetidas

Tabela 11: Condições experimentais usadas na impregnação com CO₂ gasoso e extração com CO₂ supercrítico do primeiro grupo das rolhas positivas.

Experiência	Código das rolhas	Pré Tratamento – Impregnação com CO ₂ gasoso	Extração com CO ₂ supercrítico
		Condições	Condições
9	O145	Não submetidas	40 °C – 160 bar – 3 h
	1200		
	O31		
	O7		
10	1152	Não submetidas	60 °C – 160 bar – 3 h
	O163		
	O32		
	O50		
11	1112	100 °C – 56 bar – 3 h (100 g CO ₂) - Rolhas mergulhadas em água quente (85 °C) durante 1 min - Repetição com CO ₂ gasoso	Não submetidas
	O92		
	1114		
	O135		
12	1194	90 °C – 30 bar – 3 h (50 g CO ₂) - Rolhas mergulhadas em água quente (85 °C) durante 1 min - Repetição com CO ₂ gasoso	Não submetidas
	1085		
	O86		
	O134		
13	1131	60 °C – 60 bar – 3 h (125 g CO ₂) - Rolhas mergulhadas em água quente (85 °C) durante 1 min - Repetição com CO ₂ gasoso	Não submetidas
	O93		
	1141		
	1106		

Tabela 12: Condições experimentais usadas na impregnação com CO₂ gasoso e extração com CO₂ supercrítico do segundo grupo das rolhas positivas.

Experiência	Código das rolhas	Pré Tratamento – Impregnação com CO ₂ gasoso	Extração com CO ₂ supercrítico
		Condições	
14	F230	90 °C – 26 bar – 3 h (50 g CO ₂) - Rolhas mergulhadas EtOH/H ₂ O (50/50) a 50 °C durante 5 min - Repetição com CO ₂ gasoso	Não submetidas
	F800		
	F958		
	735		
15	F 253	90 °C – 26 bar – 3 h (50 g CO ₂) - Rolhas mergulhadas em água quente (85 °C) durante 1 min - Repetição com CO ₂ gasoso	60 °C – 160 bar – 10 h
	F 695		
	F 859		
	F 881		
16	B 252	90 °C – 26 bar – 3 h (50 g CO ₂) - Rolhas mergulhadas em etanol durante 5min - Rolha mergulhadas em água quente (85 °C) durante 1 min - Repetição com CO ₂ gasoso	60 °C – 160 bar – 10 h
	F 533		
	2		
	F 794		
17	F 220	Não submetidas	80 °C – 80 bar – 10 h
	F 385		
	F 757		
	F 865		
18	B270	Não submetidas	60 °C – 160 bar – 10 h
	F866		
	F482		
	672		

Como foi atrás mencionado, as rolhas positivas correspondem a materiais com conhecimento inicial da concentração de TCA (ng/L) correspondente. As experiências realizadas tiveram como objetivo verificar a possibilidade de extrair o TCA aí contido e em simultâneo avaliar o efeito dessa extração sobre as propriedades das rolhas, nomeadamente a sua deformação geométrica e a formação de “*papinhos*”.

Nas Tabelas 11 e 12 apresenta-se um resumo das condições de operação utilizadas neste contexto (impregnação com CO₂ gasoso + extração com CO₂ supercrítico de rolhas positivas). A Tabela 11 refere-se ao primeiro grupo de rolhas positivas estudadas e respetivas condições de operação. As condições usadas com o segundo grupo de rolhas positivas (Tabela 12) foram selecionadas na tentativa de minimizar a deformação das rolhas, mediante os resultados alcançados com o primeiro grupo. Com o segundo grupo de rolhas positivas foram também considerados tempos de extração com CO₂ supercrítico superiores aos usados com o primeiro grupo.

Na Figura 29 é apresentado um esboço do diagrama de fases do CO₂, nomeadamente no que diz respeito à localização da fase gasosa e da fase de fluido supercrítico, e também as condições P-T referentes às diferentes experiências realizadas neste trabalho no que diz respeito à impregnação com CO₂ gasoso e à extração com CO₂ supercrítico de materiais de cortiça.

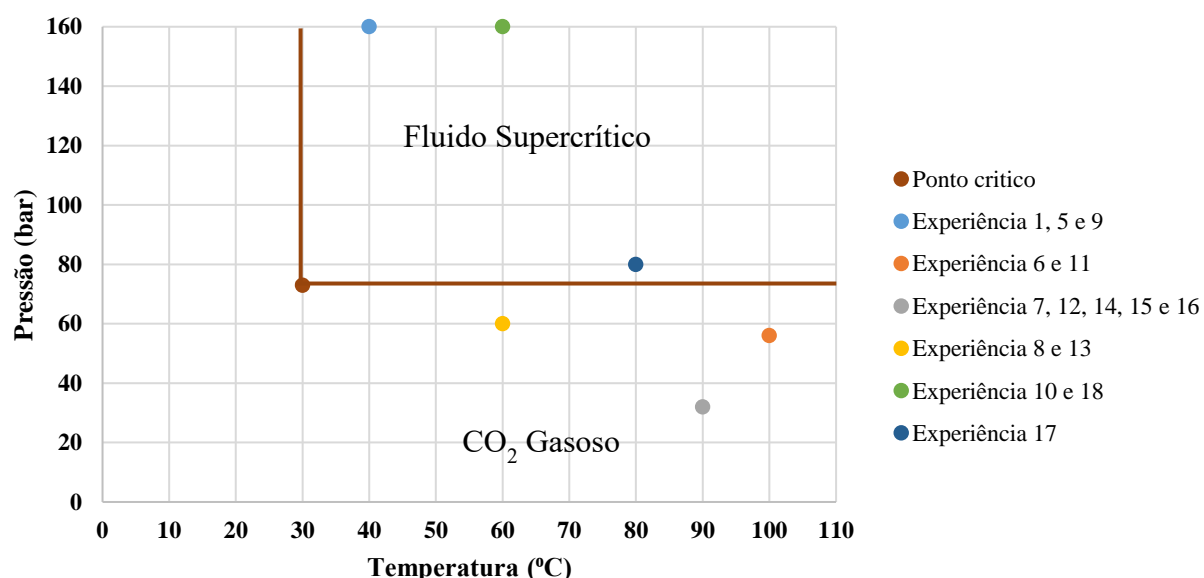


Figura 29: Esboço do diagrama de fases do CO₂ e condições P-T para as diferentes experiências realizadas neste trabalho relativas à impregnação com CO₂ gasoso e extração com CO₂ supercrítico de materiais de cortiça.

5.1.3. Resultados obtidos

Através do *software* de controlo do equipamento foram adquiridos os sinais obtidos durante a realização das experiências e produzidos gráficos para a evolução da temperatura, pressão, fluxo de CO₂ e massa total de CO₂ em função do tempo de operação. Na Figura 30 apresenta-se um exemplo correspondente à primeira fase de impregnação com CO₂ gasoso (experiência 14). Na Figura 31 mostram-se os perfis relativos a uma experiência de extração com CO₂ supercrítico (experiência 17). Os restantes gráficos obtidos com as experiências realizadas estão apresentados no Anexo 1.

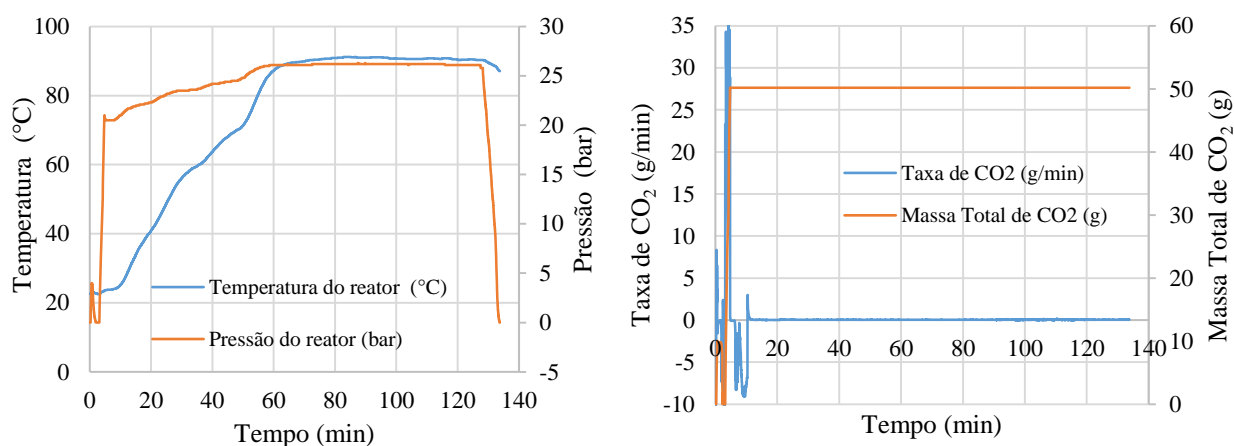


Figura 30: Dinâmica de temperatura, pressão, taxa de CO₂ e massa total de CO₂ correspondentes a uma experiência de impregnação com CO₂ gasoso (experiência 14 à qual correspondem os seguintes valores de *set-point*: T=90 °C e P = 26 bar com tempo total de operação de 3 h).

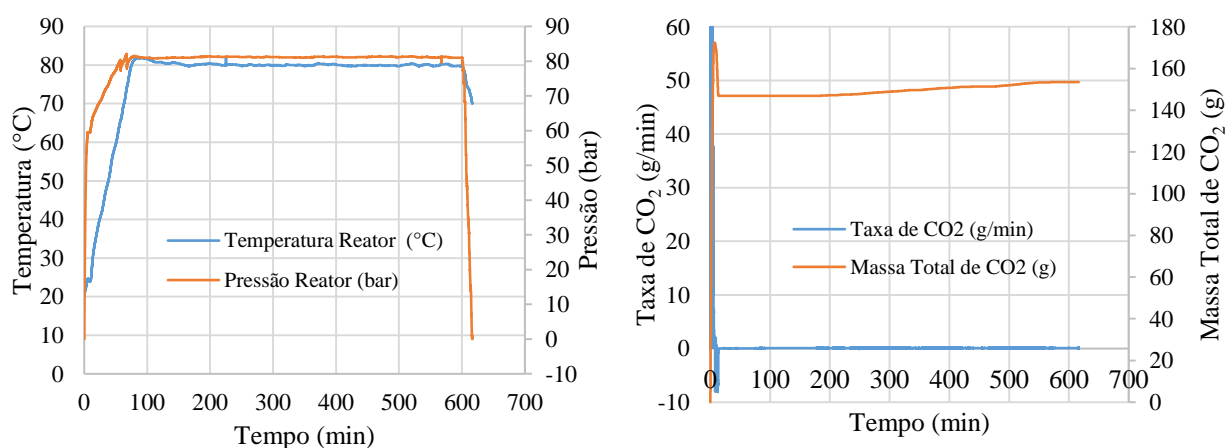


Figura 31: Dinâmica de temperatura, pressão, taxa de CO₂ e massa total de CO₂ correspondentes a uma experiência de extração com CO₂ supercrítico (experiência 17 à qual correspondem os seguintes valores de *set-point*: T=80 °C e P = 80 bar com tempo total de operação de 10 h).

Como podemos observar nas Figuras acima apresentadas (ver também Anexo 1), a temperatura e a pressão mantem-se próximas dos valores de *set-point* até ao momento em que é decidido realizar a despressurização. No processo de pressurização para alcançar condições supercríticas fez-se variar lentamente a massa de CO₂ introduzida de forma a facilitar a estabilização da temperatura e pressão nos valores de *set-point* definidos. Em todas as experiências relativas à impregnação com CO₂ gasoso foi usada a equação de Peng-Robinson (PR) para obter uma estimativa da massa de gás a introduzir, de modo a alcançar as condições pretendidas. Nestes casos foi mais simples obter a estabilização do extrator usando um fluxo aproximadamente constante de CO₂.

5.1.3.1. Análise por HPLC gradiente dos extratos obtidos com CO₂ supercrítico

Os extratos da cortiça (rolhas, cubos e granulado) obtidos através da extração supercrítica (experiências 1 a 5) foram analisados através de HPLC gradiente a diferentes comprimentos de onda, nomeadamente 280 e 320 nm. Para esse efeito, começou-se por centrifugar 2 mL do extrato durante 4 min. Preparou-se depois uma solução em ACN/H₂O (50/50) contendo 60 µL do extrato e 1,5 mL de solvente (ACN/H₂O (50/50)). Foi também preparada uma solução análoga contendo 1,5 mL de ACN/H₂O (90/10) como solvente e 120 µL de extrato. Pretendeu-se desta forma potenciar a solubilização de compostos presentes no extrato em função da hidrofobicidade do solvente e também variar a concentração do extrato. Procedeu-se posteriormente à injeção das soluções no sistema HPLC a funcionar em modo de gradiente.

Nas Figuras 32 e 33 são apresentados os cromatogramas correspondentes aos extratos obtidos por extração supercrítica das rolhas de cortiça.

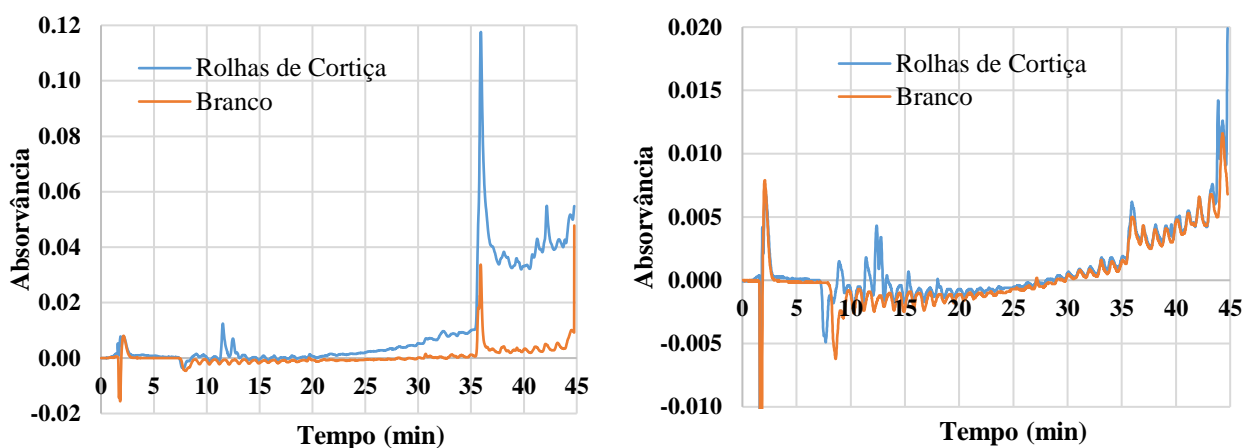


Figura 32: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente do extrato das rolhas de cortiça em dois comprimentos de onda (280 nm no gráfico da esquerda e 320 nm no gráfico da direita). Foi injetado um extrato recolhido no vaso após operação em CO₂ supercrítico. Procedeu-se previamente à dissolução de 60 µL do extrato em 1,5 mL de ACN/H₂O (50/50).

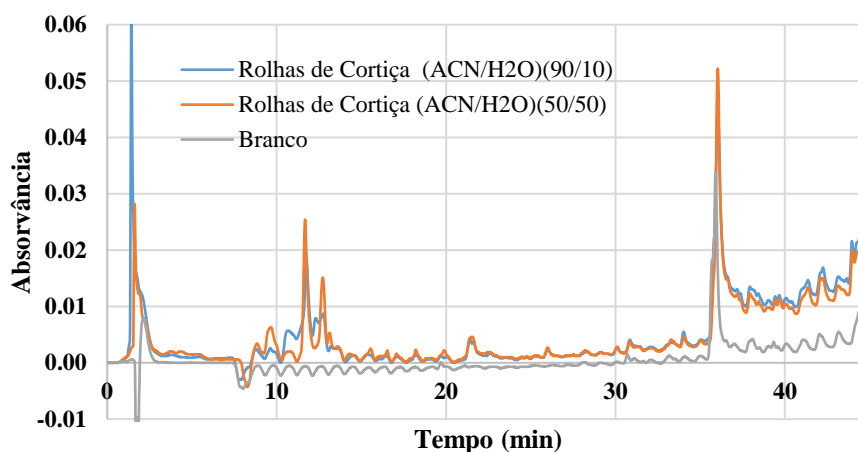


Figura 33: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente de extratos das rolhas de cortiça a 280 nm. Compara-se aqui o efeito da preparação da amostra para injeção, nomeadamente a concentração e solvente usado (60 µL de extrato em ACN/H₂O (50/50) ou 120 µL de extrato em ACN/H₂O (90/10)).

As Figuras acima mostram a possível presença de compostos fenólicos nos extratos obtidos, nomeadamente nas zonas de eluição próximas de 2,5 min e no intervalo de 7 a 15 min. A resposta é maior a 280 nm (o sinal observado a 320 nm é residual), o que é indicativo de compostos como ácido gálico e similares. Por outro lado, a resposta parece também variar em função do carácter hidrofóbico do solvente, o que é compatível com a diferente solubilidade em meio aquoso observada para diversos compostos fenólicos. Note-se que o pico observado a cerca de 36 min é interno do sistema de HPLC gradiente e deve-se possivelmente à variação da absorção UV da mistura usada no gradiente (H₂O/ACN). Deve também referir-se que, como esperado, não é possível

detetar TCA nos extratos obtidos com os materiais de cortiça. Como mostrado no Capítulo 4, o pico deste composto ocorre por volta de 39 min, não sendo observável nas análises discutidas neste capítulo. De facto, a existir TCA nos materiais de cortiça tratados, a sua concentração no extrato é demasiado baixa (na ordem de ng/L) para ser detetado por HPLC-UV. Por esta razão, as análises de quantificação de TCA são realizadas por métodos analíticos alternativos, nomeadamente SPME-GC-ECD, como à frente explorado neste capítulo.

No Anexo 2 deste trabalho é apresentada informação suplementar sobre a análise por HPLC-UV dos extratos aqui discutidos, bem como os correspondentes espectros de absorção UV-visível. Em geral, essas análises mostram que embora seja muito plausível a presença de compostos fenólicos nos extratos obtidos, nas condições de operação usadas, a concentração desses compostos é bastante baixa. No capítulo 6 será analisada a utilização de métodos de extração alternativos, nomeadamente extração soxhlet e assistida por ultrassons, como forma de potenciar a valorização de compostos fenólicos presentes em resíduos de cortiça.

5.2. Avaliação da deformação da cortiça em resultado do seu tratamento com CO₂ gasoso e extração com CO₂ supercrítico

Para as experiências detalhadas na secção 5.1.2., foi também feita a avaliação da deformação da cortiça em resultado da impregnação com CO₂ gasoso e da extração com CO₂ supercrítico ou da utilização de ciclos combinados dos dois processos.

Na Figura 34 mostram-se registos fotográficos correspondentes à impregnação de rolhas com CO₂ gasoso a uma temperatura de 100 °C, pressão de cerca de 56 bar durante 3 h. Na Figura 35 mostram-se imagens correspondentes a rolhas sujeitas a extração com CO₂ supercrítico (40 °C – 160 bar – 2 h) sem nenhum pré tratamento.

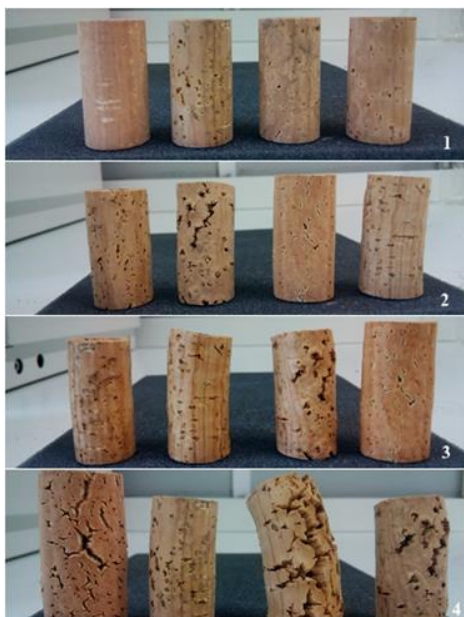


Figura 34: Impregnação de rolhas com CO₂ gasoso (experiência 11: 100 °C – 56 bar – 3 h). 1: Rolhas iniciais; 2: Rolhas após a primeira fase; 3: Rolhas após a imersão em água fervente; 4: Rolhas após a segunda fase.



Figura 35: Imagens de rolhas de cortiça após a extração com CO₂ supercrítico (experiência 2: 40 °C – 160 bar – 2 h).

Na Figura 36, apresenta-se uma análise semelhante para rolhas submetidas a um pré-tratamento com CO₂ gasoso e de seguida sujeitas a extração supercrítica.

De uma forma geral, os resultados obtidos mostram deformações apreciáveis das rolhas de cortiça (inviáveis no processo comercial) para as diferentes gamas de condições de operação usadas com CO₂ gasoso ou com CO₂ supercrítico. É relatado na literatura que passados 30 segundos as rolhas de cortiça poderão retomar a sua forma original (Lack *et al.*, 2005) mas tal não foi observado neste trabalho, mesmo após vários dias de repouso. Parece claro que as condições aqui consideradas são demasiado agressivas e provocam deformações permanentes nos materiais. Será necessário proceder a estudos de otimização P-T-tempo que minimizem estes efeitos.



Figura 36: Registro fotográfico das rolhas de cortiça usadas na experiência 15. As rolhas foram inicialmente submetidas a um pré-tratamento com CO₂ gasoso (esquerda) e depois à extração com CO₂ supercrítico (direita). Figura à esquerda: 1: Rolhas iniciais; 2: Rolhas após a primeira fase de pré-tratamento com CO₂ gasoso; 3: Rolhas após a imersão em água fervente; 4: Rolhas após a segunda fase de pré-tratamento com CO₂ gasoso (90 °C – 26 bar – 3 h). Figura à direita: 1: Antes da extração; 2: Depois da extração com CO₂ supercrítico (60 °C – 160 bar – 10 h).

5.3. Avaliação da taxa de extração de TCA através de medições com SPME-GC-ECD

As rolhas positivas, fornecidas pela Corticeira Amorim & Irmãos, após terem sido sujeitas a tratamento com CO₂ gasoso e/ou CO₂ supercrítico, foram reencaminhadas para o laboratório desta empresa para determinação da nova concentração de TCA (ng/L) nas correspondentes macerações hidro-alcoólicas. As análises foram realizadas através da técnica Microextração em Fase Sólida (SPME) com Cromatografia Gasosa e Detecção por Captura de Eletrões (GC-ECD).

Nas Figuras 37 a 40 apresenta-se a comparação da concentração inicial de TCA nas rolhas de cortiça com aquela medida após as diferentes extrações realizadas (experiências 9 a 18).

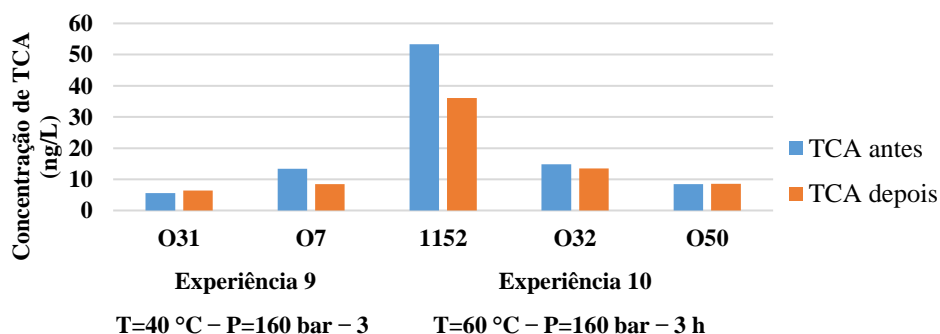


Figura 37: Comparação da concentração inicial de TCA nas rolhas com aquela medida após a extração com CO₂ supercrítico. São aqui apresentados dados relativos às experiências 9 e 10.

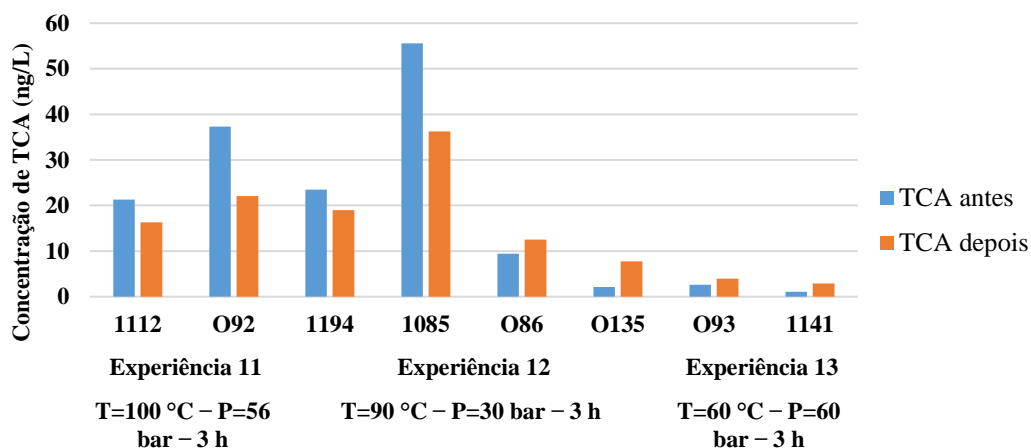


Figura 38: Comparação da concentração inicial de TCA nas rolhas com aquela medida após o tratamento com CO₂ gasoso e extração com CO₂ supercrítico. São aqui apresentados dados relativos às experiências 11, 12 e 13.

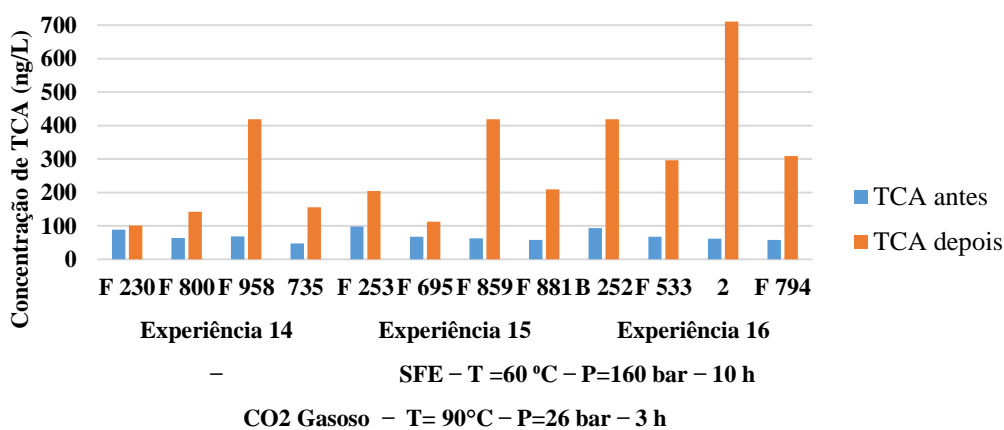


Figura 39: Comparação da concentração inicial de TCA nas rolhas com aquela medida após o tratamento com CO₂ gasoso e extração com CO₂ supercrítico. São aqui apresentados dados relativos às experiências 14, 15 e 16.

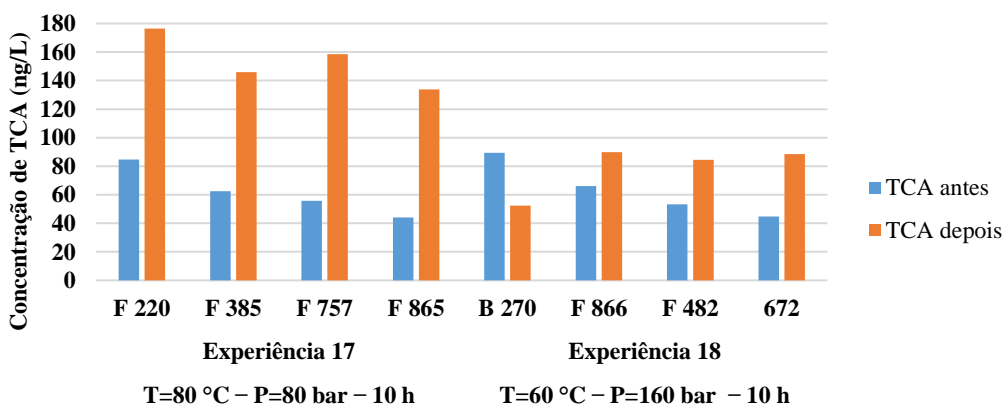


Figura 40: Comparação da concentração inicial de TCA nas rolhas com aquela medida após a extração com CO₂ supercrítico. São aqui apresentados dados relativos às experiências 17 e 18.

Com o primeiro grupo de rolhas de cortiça, conforme representado nas Figuras 37 e 38, nas extrações com CO₂ supercrítico e nos ciclos combinados CO₂ gasoso/CO₂ supercrítico foi observada a diminuição na concentração de TCA mas também o seu aumento (não substancial nestes casos). Estas experiências parecem mostrar (ver rolhas com códigos 1152 e 1085) que quanto maior é a concentração inicial de TCA, maior é a taxa de extração alcançada. Excluindo o efeito das deformações geométricas, estes resultados estão genericamente em linha com aqueles observados com outros métodos de extração de TCA (ex. usando vapor de água).

No entanto, resultados muito diferentes foram obtidos com o segundo grupo de rolhas, conforme representado nas Figuras 39 e 40. Nestes casos observa-se um aumento acentuado na concentração de TCA após a realização das operações de extração. Uma explicação para estes resultados poderá ser a migração do TCA existente no interior das rolhas para a zona superficial em consequência dos tratamentos agressivos realizados com CO₂ gasoso/supercrítico. Assim, em consequência dessa migração, aquando da segunda maceração para medição do TCA é detetada uma elevada quantidade deste composto. Esta explicação é plausível, tendo em consideração as deformações provocadas nas rolhas e a elevada solubilidade do TCA em CO₂ (solvente apolar que facilita a solubilidade do TCA, conforme discutido no capítulo 4). Assim, os resultados aqui obtidos são importantes para o desenho de sistemas de extração de TCA pois mostram que não há interesse em atingir zonas profundas da rolha, devendo ficar a operação restrita à zona superficial das mesmas (ex. até à profundidade de 3 mm). Por outro lado, as diferenças observadas entre os dois grupos de rolhas positivas usadas poderão dever-se à diferença dos dois lotes de cortiça consideradas, nomeadamente no que concerne ao seu teor de TCA inicial (deverá ser muito mais elevado e distribuído em profundidade no segundo lote).

5.4. Avaliação da deteção e quantificação de TCA e polifenóis presentes em extratos de cortiça através de voltametria cíclica

Nesta secção apresentam-se resultados relativos à avaliação da possibilidade de detetar e quantificar TCA e compostos fenólicos presentes em extratos de cortiça através de voltametria cíclica.

Para analisar um componente aromático presente nas rolhas de cortiça, no caso o TCA, pretendia-se encontrar um método económico e simples que permitisse obter

resultados na gama de concentrações de ng/L. Como foi atrás discutido, métodos convencionais, como por exemplo HPLC gradiente com detecção UV, não permitem fazer medições de quantidades tão baixas. Por outro lado, as medições por SPME-GC-ECD são relativamente complexas e bastante dispendiosas. A possibilidade de fazer medições de concentrações de TCA numa gama tão baixa, através de voltametria cíclica, colocou-se em resultado de investigações recentemente realizadas nesta área (Peres *et al.*, 2013). Adicionalmente, a atividade eletroquímica dos polifenóis é bastante conhecida (recorde-se a sua atividade antioxidante), sendo claro que estes compostos apresentam resposta em voltametria cíclica (Abdel-Hamid *et al.* 2011; Brett *et al.* 2003).

Nas análises realizadas por voltametria cíclica esteve envolvida a utilização do potencióstato XPOT da ZAHNER (Figura 41). O sistema *Power-Potentiostats Inspector V 8.1* (PP-Inspector da ZAHNER) foi usado como *software* para a aquisição dos voltamogramas. Este *software* está desenvolvido para o equipamento utilizado, sendo indicado para testes de voltametria cíclica. Neste sistema define-se fundamentalmente a velocidade de varrimento do potencial, os limites de potencial, a corrente de entrada e de saída, bem como número de ciclos a realizar. Por fim, podem ser produzidos quatro tipos de diagramas (corrente *vs* tempo, potencial *vs* tempo, potencial *vs* corrente e corrente *vs* potencial). Os resultados aqui apresentados estão no formato corrente *vs* potencial.

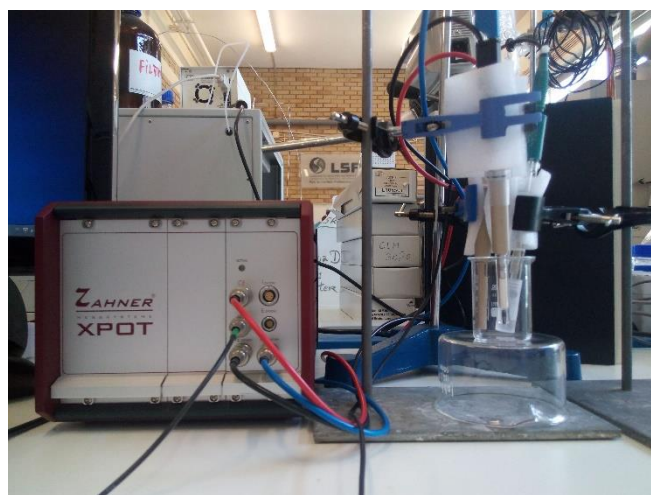


Figura 41: Sistema de análise eletroquímica usado neste trabalho para estudos de voltametria cíclica. O sistema inclui a célula eletroquímica (elétrodos, eletrólito e sistema de purga) e o potencióstato XPOT da ZAHNER.

5.4.1. Análise por voltametria cíclica do sistema redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$

Para averiguar se os sistemas/instrumentação usados estavam a operar de forma fiável, foi inicialmente realizado o estudo por voltametria cíclica de um sistema redox clássico, em concreto o par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Este sistema clássico permitiu, por um lado, perceber melhor a técnica em si, nomeadamente os conceitos teóricos e a instrumentação incluída no equipamento. Por outro lado, permitiu também analisar as variações mais comuns que ocorrem nos voltamogramas, a configuração dos elétrodos, a taxa de varrimento de potencial e também o efeito da agitação durante o varrimento.

Para formar experimentalmente o par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (ião ferroso/ião férrico) usou-se cloreto de ferro (II) tetra-hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de ferro (III) (FeCl_3). Neste contexto, foram consideradas soluções 0,05 M em FeCl_3 e 0,05 M em $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, preparadas em água DI contendo HCl com concentração 0,5 M. As soluções foram purgadas com gás inerte (N_2) durante 5 minutos antes da sua utilização.

As análises foram realizadas utilizando dois elétrodos de carbono vítreo como elétrodo de referência (ER) e contra elétrodo (CE). No que diz respeito ao elétrodo de trabalho (ET), foi utilizado um elétrodo de platina com uma área de $3,142 \text{ mm}^2$ da *Metrohm*. As velocidades de varrimento de potencial seleccionadas foram de 25, 50 e 100 mV/s, considerando um ciclo entre -0,6 V e os 0,6 V. Os voltamogramas obtidos nestas condições são apresentados na Figura 42.

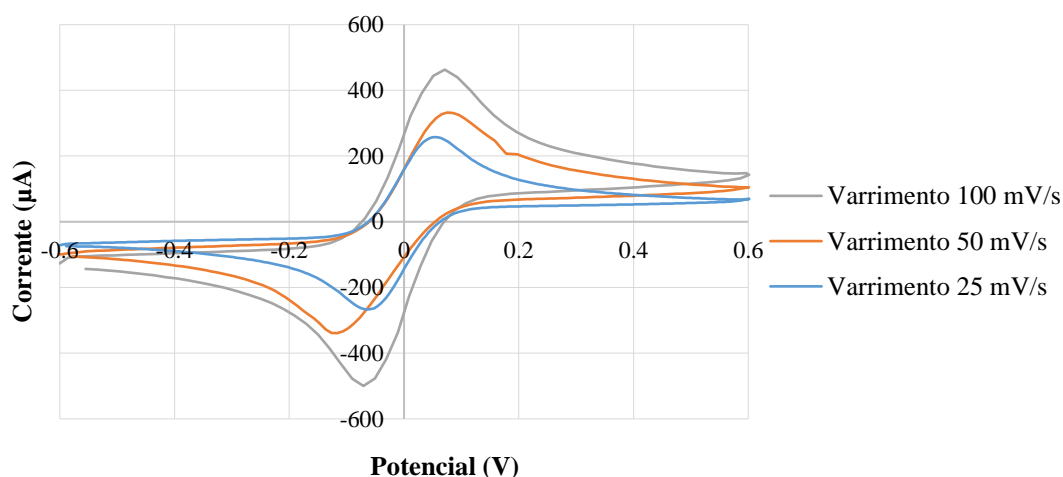


Figura 42: Resultados referentes à voltametria cíclica do sistema redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ com velocidades de varrimento de 25, 50 e 100 mV/s. Foi utilizado em elétrodo de platina da *Metrohm* com uma área de $3,142 \text{ mm}^2$ como elétrodo de trabalho. As análises foram realizadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em solução aquosa contendo $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,05 M), FeCl_3 (0,05 M) e HCl (0,5 M).

Na Figura 42 podem observar-se nos voltamogramas obtidos os picos de oxidação e redução correspondentes ao sistema redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^3$. Com o aumento da velocidade de varrimento as correntes dos picos anódicos e catódicos vão aumentando, e ocorre também uma ligeira movimentação dos picos. Estes factos estão relacionados com a velocidade de difusão das espécies químicas na chegada/saída da superfície do eléctrodo onde ocorrem as reações de oxidação/redução. Observa-se que o pico de oxidação ocorre a um potencial de cerca de 257 mV a uma velocidade de 25 mV/s e quando a velocidade de varrimento aumenta para 100 mV, o potencial correspondente também aumenta para cerca de 463 mV. Um comportamento similar é observado para os picos de redução. Em termos gerais, a simetria razoável observada nestes voltamogramas e os sinais de corrente obtidos comprovam a adequação do sistema experimental para a análise por voltametria cíclica.

5.4.2. Experiências relativas à avaliação da detecção de TCA por voltametria cíclica

Nas experiências relativas à avaliação da detecção de TCA por voltametria cíclica foi testada a utilização de um eléctrodo de prata (Ag) como ET, platina como CE e Ag/AgCl como ER. Este eléctrodo de referência é constituído por um filamento de prata recoberto com AgCl sólido que está submerso numa solução externa saturada de cloreto de potássio (KCl a 3 M). O acetonitrilo (ACN) foi utilizado como solvente por ser um solvente orgânico aprótico. Note-se que o TCA apresenta solubilidade extremamente baixa em muitos solventes aquosos, sendo portanto necessário considerar a sua substituição por solventes orgânicos, como o ACN, em misturas com água. Foram também testados, em alternativa, como eletrólitos de suporte, os sais TBAB e o TBAP. É comum a utilização deste tipo de eletrólitos em estudos de voltametria cíclica com alguns solventes orgânicos dado a sua solubilidade nestes sistemas. A seleção da configuração de eléctrodos, solvente e eletrólitos aqui considerada decorre de estudos prévios reportados na bibliografia sobre a quantificação de TCA por voltametria cíclica (Peres *et al.*, 2013).

Os estudos aqui realizados incluíram a preparação de várias soluções padrão de TCA com diferentes concentrações, em diferentes misturas de ACN/H₂O, nomeadamente com razões volumétricas de 3:2 e 5:2 (v:v), considerando uma concentração de 0,1 M de TBAB ou TBAP (eletrólito de suporte) nesse meio.

A Figura 43 mostra os voltamogramas correspondentes à análise de soluções com diferentes concentrações de TCA e 0,1 M em TBAB numa mistura de ACN/H₂O (5:2). A

velocidade de varrimento de potencial selecionada foi de 100 mV/s tendo sido realizados dois ciclos entre os limites de potencial de -1 V a 0,6 V.

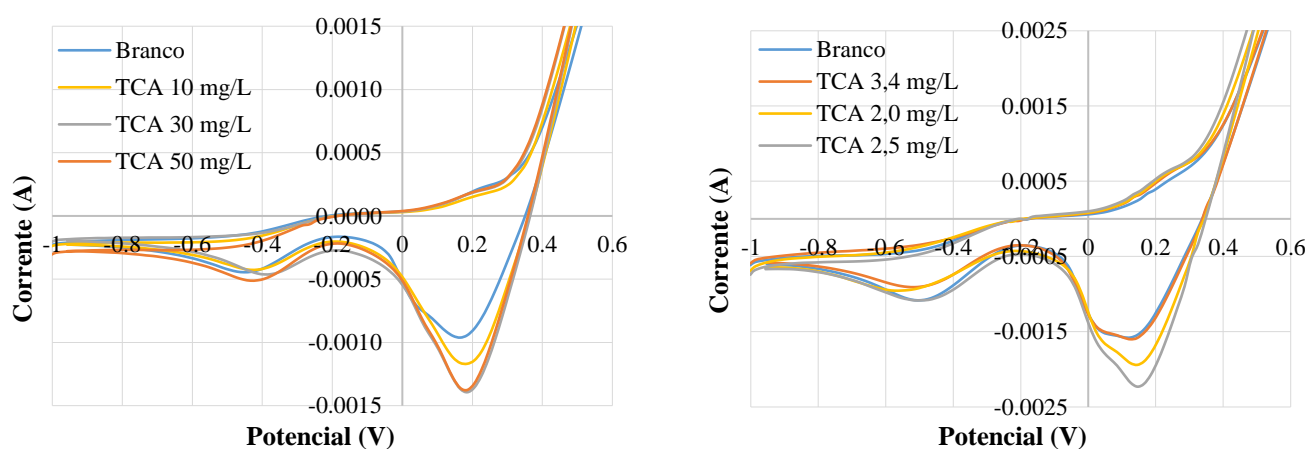


Figura 43: Voltamogramas obtidos na análise de soluções com diferentes concentrações TCA considerando a velocidade de varrimento de potencial de 100 mV/s. Foi utilizado um eletrodo de prata da *Alfa Aesar* com uma área superficial útil de 19,625 mm² (ET) e como eletrólito TBAB (0,1 M) numa mistura de ACN/H₂O (5:2). As análises foram realizadas a 25 °C.

Na Figura 43 pode observar-se de forma mais evidente a ocorrência de picos de redução, não sendo totalmente claro a existência de mecanismos de oxidação. Por outro lado, o perfil do voltamograma correspondente ao branco (ausência de TCA) é muito similar aos observados com TCA, embora possa ser concebida a ocorrência de mecanismos eletroquímicos suplementares na presença de TCA dada a variação da intensidade dos picos registados a cerca de -0,4 e 0,2 V (ver Figura 43). As correntes observadas nestes testes são também extremamente baixas.

Os testes realizados considerando como eletrólito de suporte o sal TBAP apresentam perfis muito similares (ver informação suplementar apresentada no Anexo 3). Adicionalmente, foram ainda realizados testes análogos com diferentes eletrodos de trabalho, nomeadamente aço, cobre e carbono vítreo. Em qualquer dos casos não foi possível encontrar de forma inequívoca picos de oxidação/redução do TCA nem estabelecer uma relação entre a área de potenciais picos e a concentração de TCA, mesmo considerando concentrações elevadas deste composto (na ordem das mg/L). Assim, os resultados aqui obtidos mostram que são necessários aperfeiçoamentos suplementares na configuração de eletrodos utilizados, na sua limpeza e na combinação solvente/eletrólito de forma a tornar possível a identificação e quantificação (nomeadamente na escala ng/L) do TCA através de voltametria cíclica.

5.4.3. Detecção e quantificação de polifenóis por voltametria cíclica

A detecção e quantificação de compostos fenólicos por voltametria cíclica é um assunto relativamente bem consolidado na comunidade científica dado que é clara a atividade destes compostos em processos de oxidação/redução (Abdel-Hamid *et al.*, 2011, 2015; Brett *et al.*, 2003). No presente trabalho foi também testada esta possibilidade considerando polifenóis padrão como o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico e a quercetina. O objetivo final é a extensão desta técnica na detecção e quantificação de compostos fenólicos presentes em extratos de cortiça.

Os testes realizados envolveram a variação das condições de análise (elétrodos/soluções aquosas/eletrolitos) porque apesar da atividade eletroquímica dos polifenóis ser clara, a sua observação depende dos parâmetros considerados. Com ácido cafeico foi utilizado eletrodo de platina como contra eletrodo, Ag/AgCl como eletrodo de referência e carbono vítreo como eletrodo de trabalho. As análises foram efetuadas numa mistura HCl (0,1M)/H₂O/MeOH (88/12) com concentração 0,1 mM de ácido cafeico. A velocidade de varrimento de potencial foi de 10 e 50 mV/s, com pH=2,47, considerando três ciclos de análise, entre os limites de potencial de 0 a 1 V. O ajuste do valor de pH realizou-se através de um medidor de pH adicionando gota a gota HCl (0,1 M) para pH ácido e NaOH para pH básico. Os voltamogramas obtidos nestas condições são apresentados na Figura 44.

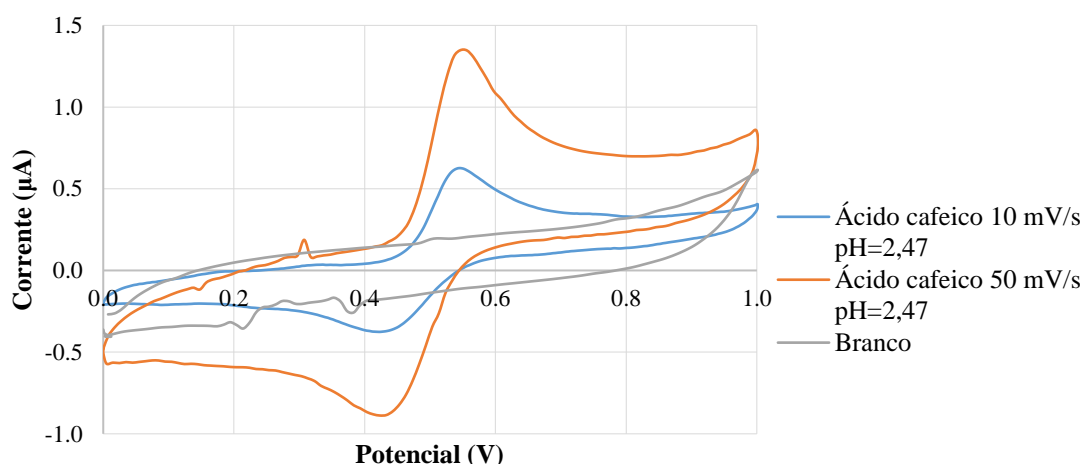


Figura 44: Resultados obtidos na análise por voltametria cíclica de ácido cafeico com duas velocidades de varrimento (10 e 50 mV/s). Condições de análise: concentração de ácido cafeico 0,1 mM, pH=2,47 numa mistura HCl (0,1M)/H₂O/MeOH (88/12) a 25°C. Foi usado como eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo da *Metrohm* com uma área de 3,142 mm².

Na Figura 44 são claramente observáveis os picos de oxidação e de redução correspondentes ao ácido cafeico, comprovando a possibilidade de detetar e quantificar este composto por voltametria cíclica nas condições de análise seleccionadas. No anexo 4 deste trabalho são apresentados testes suplementares a diferentes valores de pH e velocidade de varrimento do potencial.

Na Figura 45 apresentam-se resultados análogos para testes envolvendo quercetina. Neste caso, as análises foram realizadas em solução aquosa com quercetina em concentração 0,1 mM e $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,2 M). Os eléctrodos utilizados foram os mesmos considerados nos testes com ácido cafeico. A velocidade de varrimento de potencial foi de 50 mV/s considerando três ciclos na gama de potencial de 0 a 0,6 V. Como representado na Figura 45 fez-se variar o valor de pH (1,6; 3,7; 6,7 e 8,0) adicionando gota a gota HCl (0,1 M) para pH ácido e NaOH para pH básico.

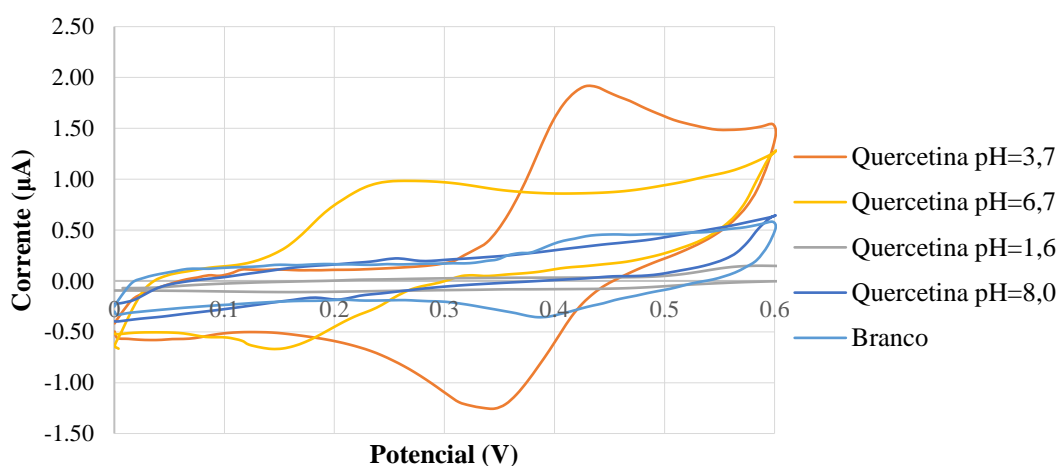


Figura 45: Resultados obtidos na análise por voltametria cíclica de quercetina com velocidade de varrimento de 50 mV/s. Condições de análise: concentração de quercetina 0,1 mM numa mistura $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,2 M) a 25 °C. Foi usado como eléctrodo de trabalho um eléctrodo de carbono vítreo da *Metrohm* com uma área de 3,142 mm².

A Figura 45 mostra de uma forma clara que, de entre as condições seleccionadas, a análise por voltametria cíclica da quercetina é potenciada a pH ácido (ex. pH=3,7). Resultados análogos com ácido gálico e ácido ferúlico são apresentados no Anexo 5 deste trabalho. Todas estas observações mostram a viabilidade de detetar e quantificar polifenóis presentes em extratos de cortiça. No entanto, é necessário projetar criteriosamente as condições analíticas a usar de forma a tornar este procedimento analítico praticável.

Capítulo 6 – Síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs) e sua avaliação na retenção de compostos bioativos

Neste capítulo apresenta-se detalhadamente o procedimento para a síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs) assim como resultados referentes à retenção e libertação de compostos fenólicos nos materiais sintetizados. Foram preparadas soluções contendo polifenóis (ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico e quercetina) e também foram considerados extratos de cortiça na avaliação de MIPs.

A cortiça é considerada uma possível fonte de polifenóis. Assim, neste trabalho foi aproveitado um resíduo de cortiça (granulado de cortiça resultante da produção das rolhas). Os extratos de cortiça foram obtidos por extração soxhlet e por ultrassons. Posteriormente, através da técnica de cromatografia com espectroscopia de massa (LC-MS) foram identificados a maior parte dos compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos.

6.1. Síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs) com polifenóis como molécula modelo

Os MIPs foram sintetizados através de polimerização iniciada em solução, em que a molécula modelo foi misturada com o monómero funcional e o solvente até obter uma solução límpida. Deve notar-se que, devido à solubilidade limitada dos polifenóis em solventes puros comuns, uma quantidade apropriada de MeOH foi usada para compor o solvente final. A solução foi colocada num banho ultrassons, durante 30 min, para promover a interação entre a molécula modelo e o monómero funcional (MM-M). Seguidamente, o reticulante e o iniciador foram adicionados à solução anterior e a solução final foi purgada com um fluxo de árgon seco durante 30 min. Posteriormente, a polimerização foi iniciada, utilizando agitação magnética a baixa velocidade (aprox. 100 rpm), num banho de óleo termostático pré-ajustado a 60 °C. O tempo de polimerização foi de 24 h.

As equações seguintes são apresentadas para descrever alguns dos parâmetros de composição dos componentes usados na síntese dos MIPs descritos na Tabela 13.

✓ Y_M - Massa do monómero funcional + reticulante na solução (%).

$$Y_M(\%) = \frac{m_M + m_{CL}}{m_M + m_{CL} + m_S} \times 100 \quad (6.1)$$

- ✓ Y_I - Fração molar do iniciador comparativamente ao monómero funcional + reticulante (%).

$$Y_I(\%) = \frac{n_I}{n_M + n_{CL}} \times 100 \quad (6.2)$$

- ✓ Y_{CL} - Fração molar de reticulante na mistura monómero funcional + reticulante (%).

$$Y_{CL}(\%) = \frac{n_{CL}}{n_M + n_{CL}} \times 100 \quad (6.3)$$

- ✓ $Y_{M/MT}$ - Relação molar entre o monómero funcional e a molécula modelo.

$$Y_{M/MM} = \frac{n_M}{n_{MM}} \quad (6.4)$$

Note-se que os materiais MIP_6 e MIP_7 foram produzidos no âmbito de anteriores trabalhos deste grupo de investigação.

Tabela 13: Condições de polimerização utilizadas na preparação de diferente MIPs.

MIP	Técnica de Polimerização	Molécula Modelo	Monómero Funcional	Reticulante	Solvente	Y_M	Y_I	Y_{CL}	$Y_{M/MM}$
MIP_1	Polimerização em massa (solução concentrada)	Ácido Gálico	AA	EGDMA	ACN/MeOH (5%)	49,76	0,36	91,14	3,88
MIP_2	Polimerização em massa (solução concentrada)	Ácido Gálico	4VP	EGDMA	ACN/MeOH (5%)	51,64	0,36	90,93	3,98
MIP_3	Polimerização em massa (solução concentrada)	Ácido Gálico	DMAEMA	EGDMA	ACN/MeOH (5%)	50,81	0,36	90,89	4,01
MIP_4	Polimerização em massa (solução concentrada)	Ácido Gálico	DMA	EGDMA	ACN/MeOH (5%)	50,12	0,36	90,83	4,04

Tabela 13: (Continuação).

MIP	Técnica de Polimerização	Molécula Modelo	Monómero Funcional	Reticulante	Solvente	Y _M	Y _I	Y _{CL}	Y _{M/MM}
MIP_5	Precipitação	Ácido Gálico	DMAEMA	EGDMA	ACN/MeOH (10%)	10,97	0,47	9,92	4,06
MIP_6	Suspensão	Polidatina	4VP	EGDMA	MeOH/H ₂ O (80%)	62,4	1,8	55,7	6,0
MIP_7	Precipitação	Quercetina	4VP	EGDMA	ACN/DMF (9%)	6,45	5,22	49,14	5,01

6.1.1. Purificação dos MIPs

Depois da síntese é necessário proceder à remoção da molécula modelo, pois só assim é possível a caracterização de um MIP. O método usado com esse propósito foi o método soxhlet, Figura 46.

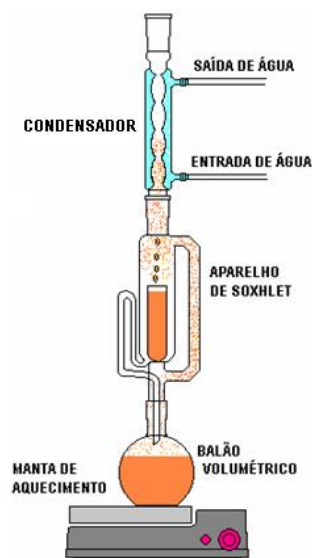


Figura 46: Método soxhlet considerado na purificação de MIPs e esquematização do aparelho (instalação experimental utilizada). Esquema adaptado de (Extração de lipídios em alimentos, 2010).

O método soxhlet consiste na utilização de quatro componentes conectados entre si, nomeadamente um condensador, um sistema de escoamento designado como aparelho de soxhlet, um balão volumétrico e uma manta de aquecimento. O material (MIP) foi colocado no aparelho de soxhlet dentro de um cartucho. No balão volumétrico foi colocado uma mistura de solventes (MeOH/Ác. Acético). O condensador é conectado a dois tubos, um ligado a uma torneira de água e o outro a um cano de drenagem, a fim de garantir a passagem permanente de água. O processo de limpeza foi iniciado assim que o solvente atingiu o ponto de ebulição. Quando isto acontece, o vapor desloca-se para o condensador, onde arrefere e cai no aparelho em forma de gota. Quando o aparelho de soxhlet está cheio, o solvente volta para o balão volumétrico e inicia-se um novo ciclo. Uma vez que o processo é lento, pode levar vários dias até que a molécula modelo seja completamente removida. Para verificar se o material estava limpo, ao longo do tempo, retiram-se amostras do solvente e analisam-se no espectrofotômetro UV-vis.

6.2. Testes de avaliação da retenção de polifenóis em MIPs e em adsorventes comerciais

Nesta secção apresenta-se inicialmente alguns conceitos teóricos sobre a extração em fase sólida (SPE), dado que foi uma das técnicas utilizadas neste trabalho para caracterizar o desempenho dos materiais com polifenóis. De seguida, referem-se os testes realizados durante o estudo e o respetivo procedimento experimental. Primeiramente, foram realizados testes de adsorção por SPE considerando polifenóis como possíveis moléculas adsorvidas. Foram também considerados os extratos de cortiça na avaliação dos MIPs sintetizados. A resposta de cada uma das soluções em termos de absorvância foi lida através do equipamento UV-vis a um comprimento de onda $\lambda=280$ nm.

6.2.1. Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica analítica que utiliza uma fase sólida e uma fase líquida para isolar um componente de interesse. A técnica SPE geralmente é utilizada para purificar uma amostra antes de se utilizar um método cromatográfico, ou também para qualificar a quantidade de soluto na amostra. Esta técnica compreende quatro etapas (Figura 47): o condicionamento, etapa necessária para tornar a solução líquida e as partículas adsorventes compatíveis, a adsorção dos componentes da amostra em estudo, onde se verifica a retenção do analito e possivelmente de alguns interferentes,

a lavagem da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito e, por fim, a eluição dos componentes retidos no adsorvente (Caldas *et al.*, 2011).

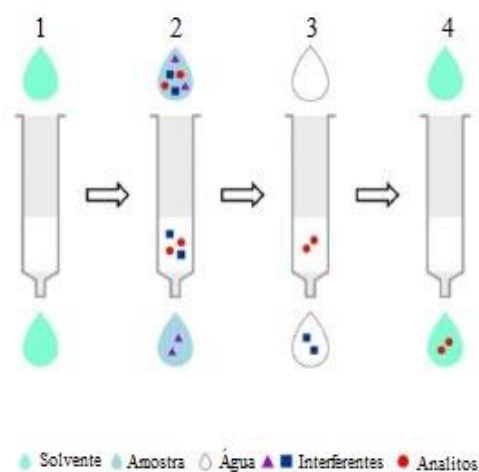


Figura 47: Representação esquemática das quatro fases da extração em fase sólida (Caldas *et al.* 2011).

A extração em fase sólida é um método de preparação de amostras muito utilizado porque é bastante simples, rápido, de fácil execução e económico.

6.2.2. Experiências realizadas

A avaliação dos MIPs na retenção de compostos bioativos através de SPE, Figura 48, realizou-se da seguinte forma. Inicialmente colocou-se uma massa conhecida de material seco (aprox. 50 mg) em cartuchos de extração. Posteriormente, os materiais foram limpos com uma mistura de metanol/ácido acético (9/1), seguidamente com metanol e, por fim, foram condicionados durante 24 h com o solvente selecionado (usou-se EtOH/H₂O (80/20)) para a avaliação da adsorção de polifenóis.

Depois dos materiais estarem condicionados, preparou-se uma solução contendo um polifenol (ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico ou quercetina) com uma concentração de 0,04 mM.



Figura 48: Sistema de extração em fase sólida (SPE) usado neste trabalho.

Posteriormente, os cartuchos foram carregados com a solução (5 mL) contendo um composto fenólico específico. De seguida, a solução foi recolhida, gota a gota, num frasco colocado por baixo de cada ponta de recolha. Este processo é facilitado pelo facto do equipamento se encontrar ligado a uma bomba de vácuo, o que permite extrair a solução aquosa a uma velocidade controlada. De seguida, foi medida a absorvância de cada uma das soluções recolhidas por UV-vis para conhecer a nova concentração e, assim, calcular a fração do polifenol que ficou retido na rede de polímero. Após a adsorção, o passo de lavagem foi realizado utilizando ACN como solvente. Por último, foi realizado o passo de eluição, utilizando metanol/ácido acético (9/1), de modo a verificar se o material foi capaz de libertar o polifenol que tinha sido retido. Em todas as etapas utilizou-se 5 mL do respetivo solvente. As frações correspondentes à adsorção, lavagem e eluição foram lidas usando espectrometria UV-vis em modo fechado, Figura 49, e/ou análise HPLC gradiente também com deteção de UV.



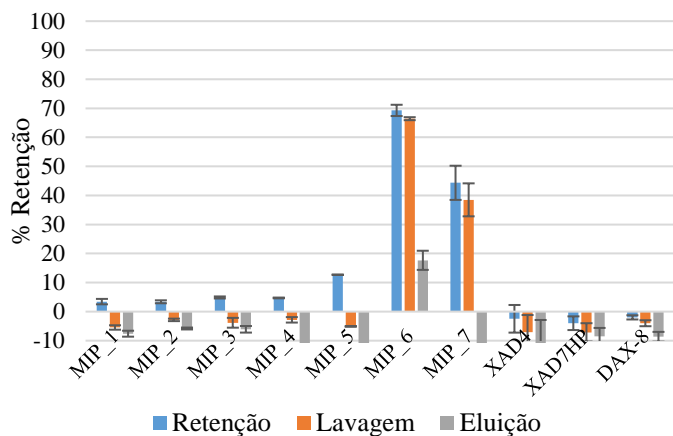
Figura 49: Equipamento de espectrometria UV-vis utilizado neste trabalho.

6.2.3. Resultados e Discussão

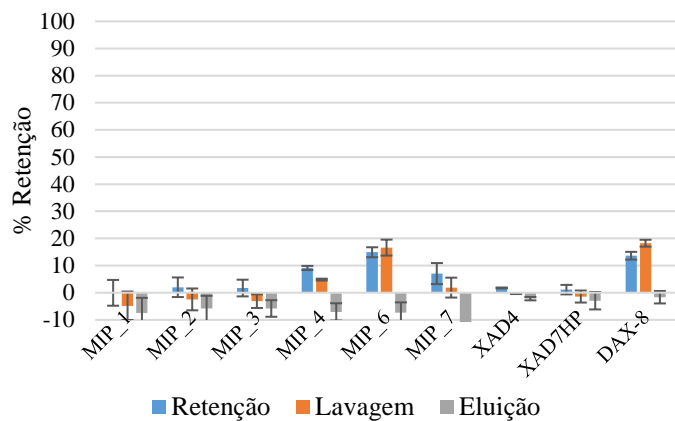
Com o objetivo de avaliar o desempenho das diferentes partículas molecularmente impressas no reconhecimento molecular de polifenóis, estudou-se a adsorção dos padrões de quercetina, ácido gálico, ácido ferúlico e do ácido cafeico, por SPE, considerando as quatro diferentes etapas anteriormente descritas: condicionamento, adsorção, lavagem e eluição. Na etapa de condicionamento, o solvente utilizado foi EtOH/H₂O 80/20. Este solvente foi selecionado para minimizar as interações hidrofóbicas e, em consequência, destacar o eventual efeito de impressão molecular, uma vez que nestas condições a seletividade dos materiais é potencialmente maior. A etapa de lavagem foi realizada com ACN e a etapa de eluição foi executada com MeOH/Ácido Acético 9/1.

Também para avaliar a seletividade dos MIPs, realizou-se a adsorção de alguns compostos fenólicos presentes na cortiça considerando diretamente extratos deste material natural. Assim, foi possível observar o efeito de impressão molecular na retenção de compostos fenólicos e a eventual obtenção de moléculas de interesse comercial através da utilização dos materiais sintetizados (MIPs). De seguida, são apresentados os resultados obtidos neste contexto.

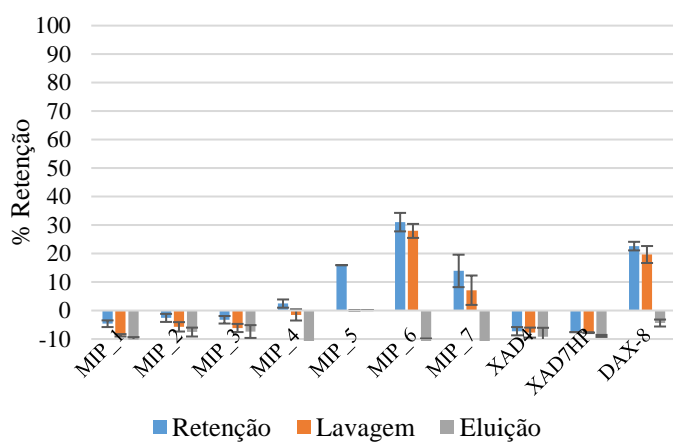
Na Figura 50 são apresentados os resultados obtidos nestas condições com a realização de pelo menos duas réplicas. Estas observações parecem indicar um efeito de impressão molecular moderado para a maior parte dos materiais, fazendo-se no entanto destacar o desempenho de dois dos MIPs considerados.



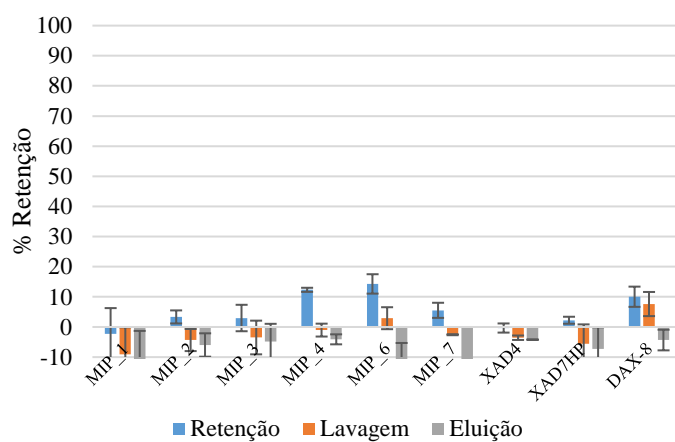
(a)



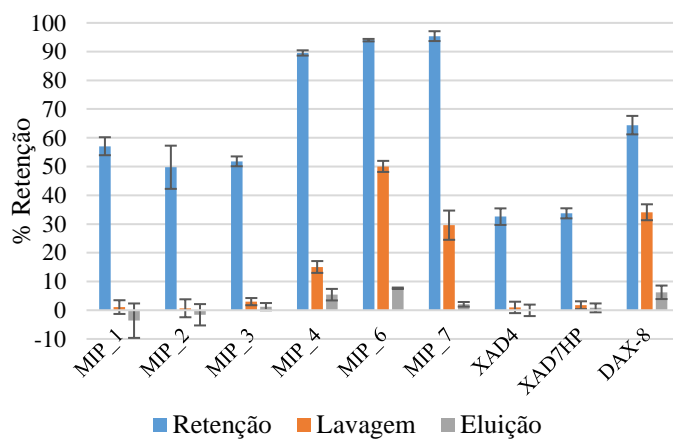
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 50: Comparação da adsorção em SPE de diferentes compostos fenólicos com diferentes materiais molecularmente impressos (MIPs) e adsorventes comerciais: (a) quercetina (b) ácido cafeico (c) ácido gálico (d) e (e) ácido ferúlico. Em todas as experiências, na etapa de adsorção utilizou-se EtOH/H₂O (80/20) como solvente, na etapa de lavagem ACN e na etapa de eluição com MeOH/Ác. Acético (9/1). Os resultados apresentados em (e) correspondem à utilização de H₂O/MeOH (85/15) na etapa de adsorção. As medições foram realizadas pelo menos em duplicado (n=2).

A partir dos dados apresentados pode concluir-se que a retenção dos compostos fenólicos depende dos materiais utilizados, do solvente considerado e também da estrutura da própria molécula alvo. Neste contexto, destaca-se o bom desempenho dos materiais MIP_6 e MIP_7, mesmo comparativamente com os adsorventes comerciais.

Um resultado com interesse geral está apresentado nas Figura 50 (d) e 50 (e). Com o MIP_6 e MIP_7 a retenção de ácido ferúlico é superior a 90 % comparativamente com a Figura 50 (d). Nestes casos o solvente utilizado difere na quantidade de H₂O incorporada na mistura. Logo, o aumento da retenção de ácido ferúlico deve-se em grande parte ao efeito das interações hidrofóbicas. Note-se que o efeito das interações hidrofóbicas é considerado na prática em muitos processos industriais com adsorventes comerciais para aumentar a capacidade de retenção alcançada. Com base em todos estes resultados, os MIPs 6 e 7 foram selecionados para grande parte dos restantes testes dado que apresentam um bom desempenho mesmo quando a incidência das interações hidrofóbicas é baixa.

Uma análise mais detalhada do processo de adsorção foi procurada através da realização da análise por HPLC gradiente das soluções envolvidas nos testes SPE, conforme apresentado na próxima subsecção. De facto, com esta técnica é possível eliminar algumas incertezas analíticas associadas à medição da absorção UV global das misturas, como discutido de seguida.

Neste contexto, foram também realizados testes em SPE com uma mistura de ácido gálico, polidatina, resveratrol, catequina e quercetina com uma concentração de 0,08 mM de cada composto na mistura e considerando diferentes MIPs (MIP_1, MIP_2, MIP_3 e MIP_4), como se pode observar na Figura 51. O procedimento experimental foi similar ao referido na subsecção 6.2.2., diferenciando-se apenas no primeiro passo com a utilização de uma mistura de ACN/H₂O (70/30) nestas experiências.

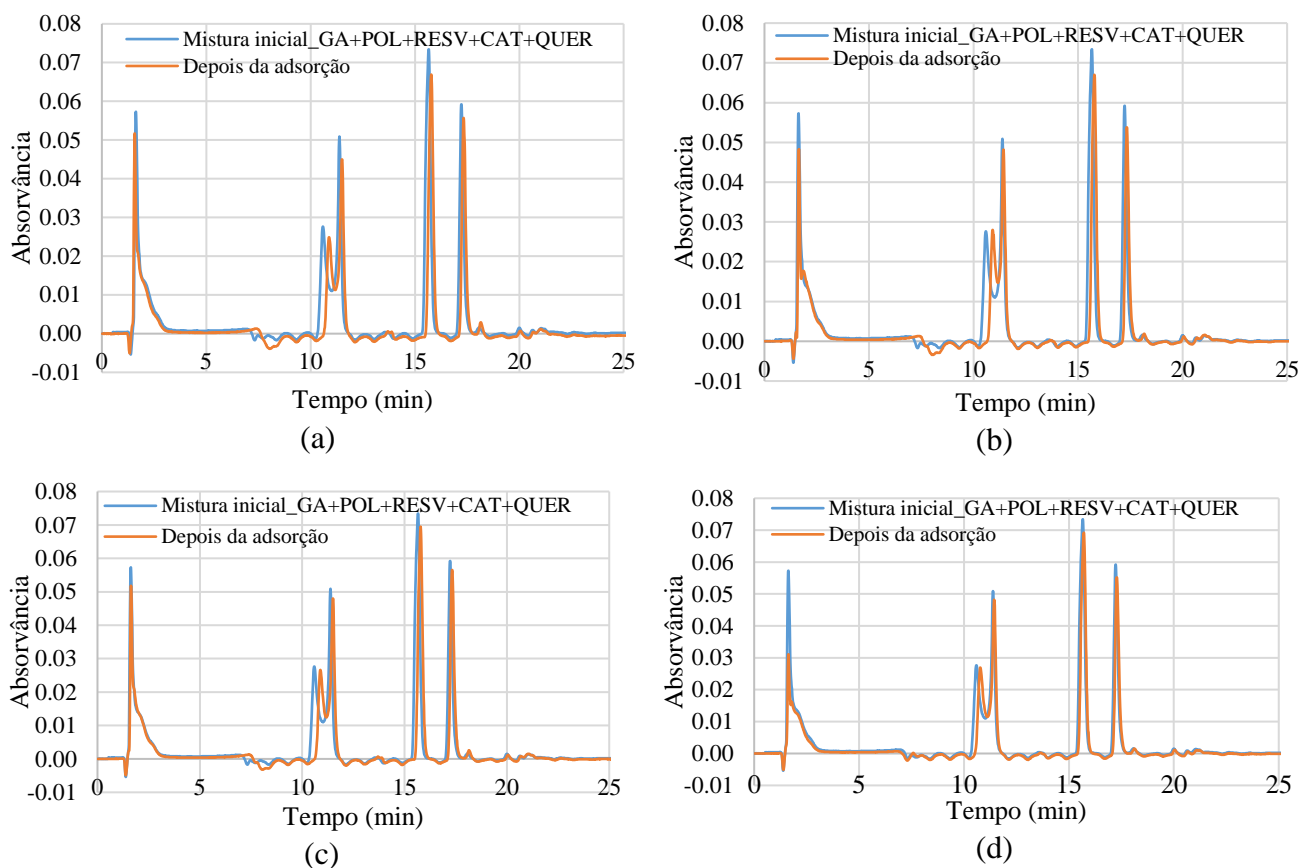


Figura 51: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente da segunda etapa SPE para a adsorção de uma mistura de ga+pol+resv+cat+quer em diferentes MIPs: (a) MIP_1 (b) MIP_2 (c) MIP_3 e (d) MIP_4. Utilizou-se uma mistura de ACN/H₂O (70/30) no primeiro passo. Todas as análises foram feitas com sistema de HPLC gradiente e detecção UV a $\lambda=280$ nm.

Comparando a retenção da mistura de compostos fenólicos nos quatro materiais, como apresentado na Figura 51, pode verificar-se que os resultados são muito semelhantes, destacando-se no entanto a superior retenção alcançada para o ácido gálico quando é utilizado o MIP_4 (Figura 51 (d)).

6.3. Extratos de cortiça obtidos por ultrassons e soxhlet

Para a extração de compostos bioativos da cortiça, consideraram-se adicionalmente as técnicas soxhlet e de extração por ultrassons. Posteriormente, foi realizada a identificação dos compostos extraídos através da análise LC-MS, como à frente discutido.

6.3.1. Extração por Soxhlet

A extração por soxhlet, Figura 52, foi realizada para obter extratos comparativos relativamente aos extratos de cortiça obtidos pela extração com fluido supercrítico (SFE) e com soluções hidro-alcoólicas. Inicialmente, pesou-se 15 g da amostra (granulado de cortiça) diretamente para um cartucho e, de seguida, colocou-se 150 mL do solvente EtOH/H₂O (80/20) num balão volumétrico. O procedimento experimental foi igual ao descrito na subsecção 6.1.1. com um tempo de extração de 4 horas (aproximadamente 2 ciclos).



Figura 52: Extração de granulado de cortiça através da técnica soxhlet. 1- Equipamento já com o cartucho colocado; 2- Extrato obtido onde se pode observar a formação de um precipitado.

A Figura 53 mostra a análise por HPLC gradiente com detetor UV do extrato de granulado de cortiça obtido pela extração de soxhlet. Este extrato foi injetado sem realizar qualquer pré-separação da parte solúvel. No cromatograma obtido são evidentes dois picos principais (a cerca de 1,35 e 11,28 min de tempo de retenção), indicando o sucesso na extração de compostos fenólicos presentes no granulado de cortiça. Posteriormente, este extrato foi utilizado para a identificação dos respetivos compostos fenólicos através de LC-MS (resultados apresentados na secção 6.5).

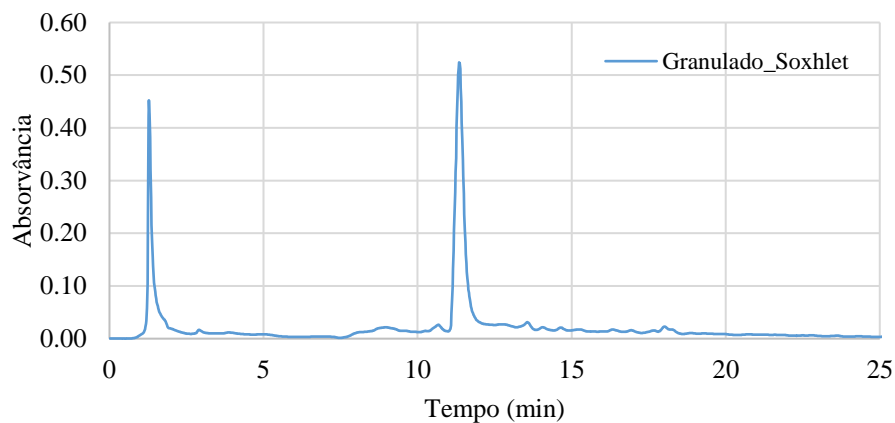


Figura 53: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente do extrato de granulado de cortiça ($\lambda=280$ nm). Foi injetada a parte solúvel do extrato obtido diretamente pela extração de soxhlet. Utilizou-se EtOH/H₂O (80/20) como solvente na extração.

6.3.2. Extração por ultrassons

A extração por ultrassons foi realizada a partir de granulado de cortiça. Inicialmente pesou-se 5 g de amostra e de seguida adicionou-se 50 mL do solvente EtOH/H₂O preparado a partir de uma solução com 80 % de etanol num volume total de 75 mL. Esta mistura foi submetida durante 1 minuto a ultrassons e, de seguida, foi feita a sua filtração obtendo assim um extrato de granulado de cortiça, como se pode observar na Figura 54. Posteriormente, foi realizada a sua análise por HPLC gradiente com detetor UV, considerando um comprimento de onda de $\lambda=280$ nm.



Figura 54: Extração com ultrassons do granulado de cortiça. 1- Amostra e solvente preparado; 2- Solução submetida a filtração; 3-Extrato final.

Na Figura 55 mostra-se o cromatograma correspondente à análise feita por HPLC gradiente do extrato final obtido pela técnica de extração por ultrassons. Tal como observado na extração por soxhlet, aqui também é evidente a formação de picos dominantes. Nota-se que, comparativamente ao extrato obtido por soxhlet, os dois primeiros picos observados correspondem provavelmente aos mesmos compostos fenólicos.

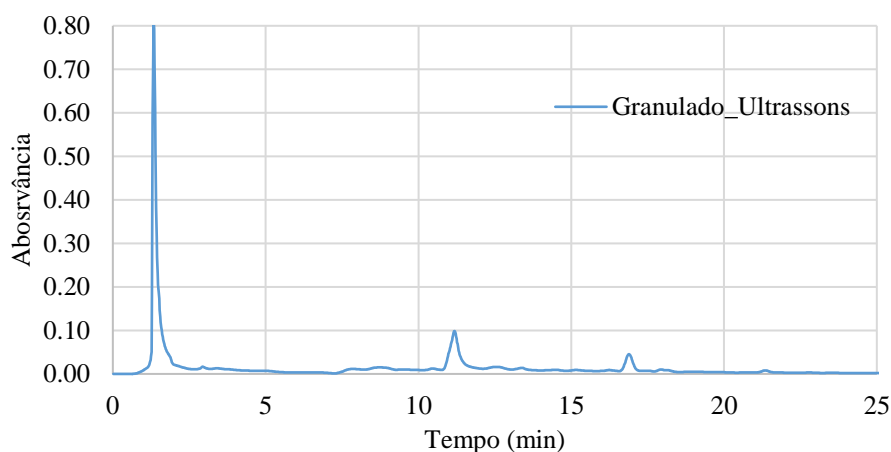


Figura 55: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente do extrato de granulado de cortiça ($\lambda=280$ nm). O extrato foi obtido através da extração por ultrassons em EtOH/H₂O (80/20) cuja parte solúvel foi diretamente injetada.

6.3.3. Adsorção em SPE

Com base no procedimento descrito na subsecção 6.2.2., tentou-se avaliar o desempenho dos diferentes materiais sintetizados na retenção de compostos fenólicos presentes no extrato de cortiça obtido por ultrassons.

Na Figura 56 apresenta-se a adsorção em SPE do extrato de granulado de cortiça obtido por ultrassons usando EtOH/H₂O (80/20) como solvente. Observa-se uma boa retenção nos materiais sintetizados (MIPs) e nos adsorventes comerciais. Adicionalmente, as etapas de lavagem e eluição mostram uma interação forte entre algumas moléculas presentes no extrato e nos diferentes tipos de adsorventes.

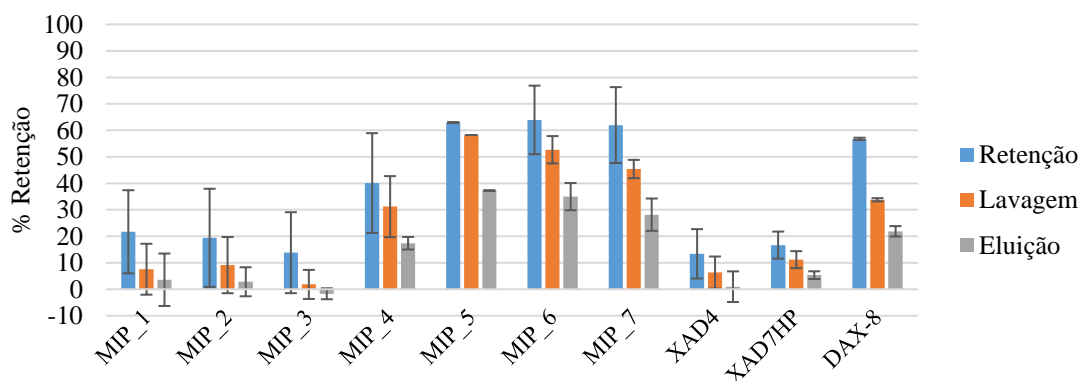
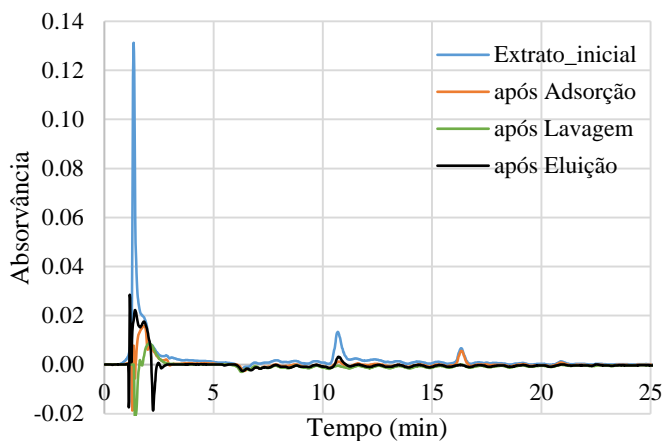


Figura 56: Adsorção em SPE do extrato de cortiça obtido por ultrassons, comparando os materiais sintetizados (MIPs) e os adsorventes comerciais. O fator de diluição da solução mãe em EtOH/H₂O (80/20) foi F=10. A medição foi realizada pelo menos em duplicado (n=2).

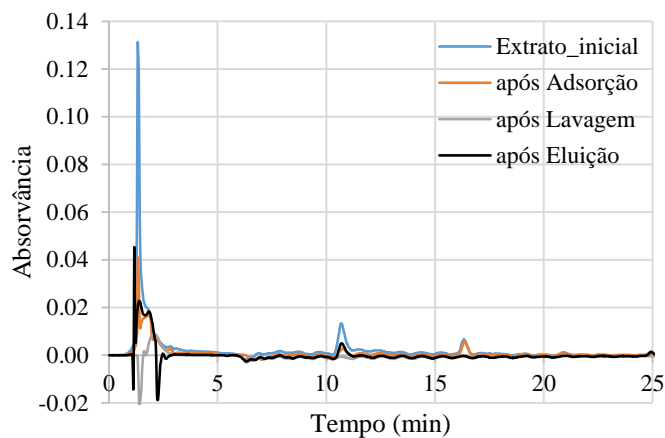
Posteriormente, conforme também discutido na seção 6.2.3., escolheram-se os MIPs que apresentam potencialmente um melhor desempenho como adsorventes (MIP_6 e MIP_7) para realização de testes adicionais. Note-se que também se efetuaram testes em SPE diferenciando-se os extratos a considerar, nomeadamente o extrato das rolhas de cortiça obtido no contexto do estudo da difusão do TCA e os extratos de granulado de cortiça obtidos por ultrassons e por soxhlet.

Nas Figuras 57 a 58 são apresentados cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente, com detecção UV, dos processos de retenção/lavagem/eluição em SPE para os extratos de cortiça atrás descritos. Foram considerados os materiais MIP_6 e MIP_7 e utilizou-se EtOH/H₂O (80/20) como solvente no passo de retenção.

Nos cromatogramas apresentados na Figura 57, a adsorção por SPE do extrato de granulado de cortiça obtido por ultrassons apresenta uma retenção superior a 50 % nos dois materiais. Apenas na etapa de eluição com MeOH/Ácido Acético (9/1) foi possível remover parte do extrato que tinha sido retido nos materiais.



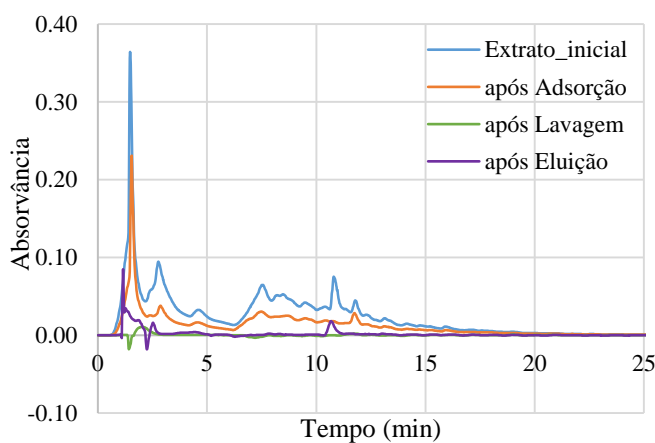
(a)



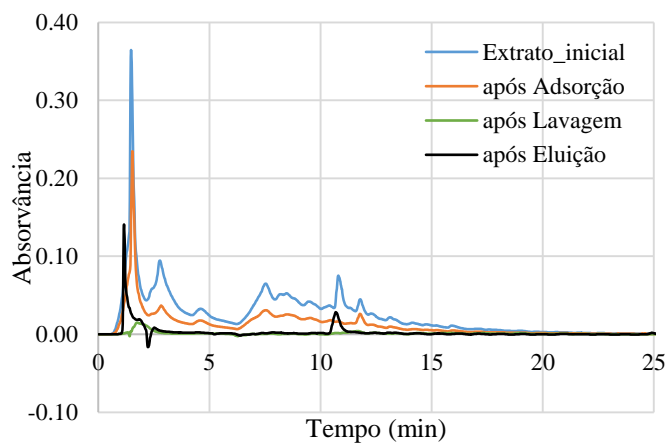
(b)

Figura 57: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente da adsorção/lavagem/eluição em SPE do extrato de granulado de cortiça obtido por ultrassons. Foram usados dois materiais diferentes: (a) MIP_6 (b) MIP_7. Utilizou-se EtOH/H₂O (80/20) no passo de retenção.

Relativamente ao extrato de rolha de cortiça, como se mostra na Figuras 58, os dois materiais também se comportam de forma semelhante, sendo capazes de reter uma parte substancial dos compostos fenólicos presentes no extrato. Apenas no passo de eluição se observa uma maior recuperação no MIP_7 relativamente ao MIP_6.



(a)



(b)

Figura 58: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente da adsorção/lavagem/eluição em SPE do extrato de rolha de cortiça. Foram usados dois materiais diferentes: (a) MIP_6 (b) MIP_7. Utilizou-se EtOH/H₂O (80/20) no passo de retenção.

No que diz respeito ao extrato de granulado de cortiça obtido por soxhlet, o pico observado a cerca de 10,78 min no extrato inicial é mais evidente comparativamente com os dois extratos anteriores (ultrassons e rolha de cortiça). No passo de adsorção foi retida

uma grande quantidade desse composto no material e só foi possível remover o correspondente composto fenólico no passo de eluição usando MeOH/Ácido Acético (9/1) como solvente (ver Figura 59).

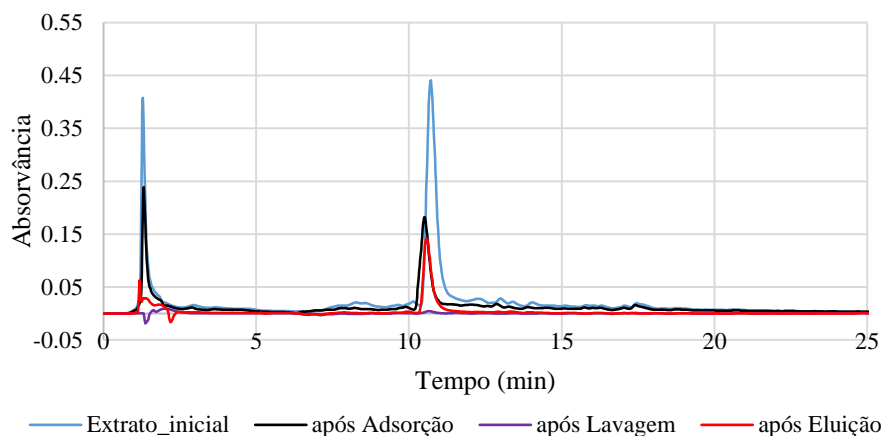


Figura 59: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente da adsorção/lavagem/eluição em SPE do extrato de granulado de cortiça obtido por soxhlet. Foi usado o material MIP_7 e EtOH/H₂O (80/20) no passo de retenção.

Com este mesmo extrato (granulado de cortiça obtido por soxhlet) também foram realizados testes de inclusão de polifenóis padrão no extrato (testes de “spiking”), nomeadamente com quercetina (C=3,3 mM), rutina (C=1,6 mM) e ácido ferúlico (C=5,7 mM), considerando o material MIP_7 como adsorvente. Posteriormente, a análise HPLC gradiente das amostras resultantes foi executada usando uma coluna Ascentis® C18 como, descrito na secção 4.3.2 do capítulo 4.

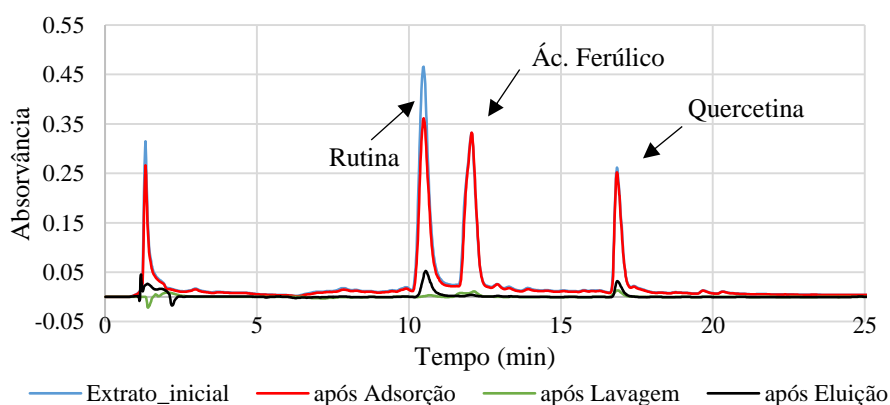


Figura 60: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente da adsorção em SPE do granulado de cortiça obtido por soxhlet após “spiking” com QUER+RUT+FER. Utilizou-se o MIP_7 como adsorvente e EtOH/H₂O (80/20) no passo de retenção.

A Figura 60 mostra uma maior retenção de rutina relativamente a ácido ferúlico e quercetina nas condições de operação utilizadas. Na etapa de eluição verifica-se a recuperação de compostos fenólicos fundamentalmente em tempos de eluição correspondentes à rutina e quercetina. Esta abordagem de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de cortiça através de testes de comparação com padrões (“spiking”) permite obter uma estimativa do tipo de funcionalidade desses compostos e o seu carácter hidrófilo/hidrofóbico. No entanto, a sua identificação mais precisa exige a aplicação de técnicas mais avançadas, nomeadamente LC-MS, como à frente discutido.

6.4. Utilização dos MIPs para a retenção em processos contínuos de polifenóis presentes em extratos de cortiça

6.4.1. Processos contínuos

A adsorção através de processos contínuos é extremamente importante para fins industriais e comerciais devido ao aumento da produtividade e por ser uma opção relativamente simples, nomeadamente no que diz respeito aos requisitos de operação. Além disso, trata-se de uma tecnologia de baixo custo, permitindo na maior parte dos casos a regeneração fácil dos adsorventes. Devido a esses benefícios, muitos processos contínuos são usados na prática para recuperar e concentrar compostos fenólicos. Geralmente evita-se o uso de solventes tóxicos e previne-se a degradação dos compostos em estudo (Gomes *et al.*, 2017). Neste contexto, foi desenvolvido neste trabalho um processo contínuo com reciclo a fim de avaliar o desempenho dos MIPs.

6.4.2. Procedimento Experimental

Com o objetivo de avaliar a adsorção e libertação de compostos fenólicos nos materiais sintetizados, foi executado um teste em coluna considerando o extrato de granulado de cortiça obtido por soxhlet. O material utilizado neste teste foi o MIP_7 (melhor adsorção por SPE) e a sua resposta em termos de absorvância foi lida por HPLC com deteção UV a 280 nm. Com este objetivo, na coluna, como ilustrado na Figura 61, o material foi empacotado usando uma massa seca de cerca de 150 mg. O enchimento da coluna foi feito com o auxílio de uma bomba de vácuo para obter uma boa compactação das partículas.



Figura 61: Coluna de enchimento usada em processos contínuos para adsorção e libertação de compostos fenólicos presentes em extratos de cortiça.

Este processo inicia-se com a abertura de uma das extremidades da coluna, Figura 62, para colocar o material no seu interior usando uma pasta de partículas do MIP_7. Em cada extremidade da coluna existe um sistema de múltiplos filtros que evitam eventuais perdas de massa (partículas) quando o sistema é acionado.



Figura 62: Coluna com a quantidade de MIP_7 já empacotado estando uma das extremidades ainda aberta.

6.4.3. Resultados e Discussão

6.4.3.1. Processo de Saturação

Após o empacotamento, o processo de saturação foi realizado com uma bomba (KNUER P 4.1S) a um caudal de 0,5 mL/min e um reservatório com a solução contendo o extrato em EtOH/H₂O 80/20. O processo de saturação decorreu durante 24 horas e foi realizado com reciclo, sendo o objetivo final a saturação do material contido no interior da coluna. Procedeu-se também à análise HPLC gradiente da solução inicial e daquela resultante do processo de saturação. Os resultados assim obtidos são apresentados na Figura 63 onde se pode verificar que uma quantidade apreciável dos compostos fenólicos iniciais foi retida no material contido na coluna.

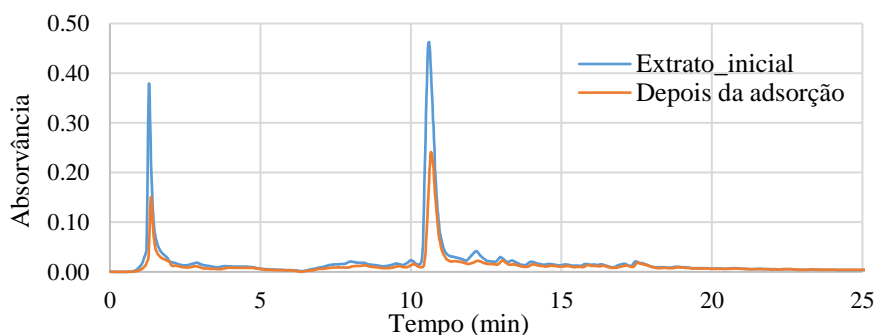


Figura 63: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente de um extrato de granulado de cortiça antes e depois do processo de adsorção em coluna a operar em contínuo com reciclo. A análise foi feita com deteção UV a 280 nm.

6.4.3.2. Processo de Libertação

Na tentativa de isolar compostos fenólicos presentes no extrato de cortiça, foi posteriormente realizado o processo de libertação considerado um gradiente de solventes e a recolha de amostras correspondentes a diferentes frações. Como solvente A usou-se H₂O(pH=3)/MeOH (90/10) e como solvente B usou-se MeOH/Ácido Acético (90/10). O processo de libertação foi feito com um tempo total de 50 min iniciando com uma maior percentagem de solvente A (mais hidrófilo) e terminando com 100 % de solvente B (menos hidrófilo). Na tabela seguinte são apresentadas as quantidades de solvente A e B utilizadas nas frações recolhidas ao longo do processo. Posteriormente foi realizada a análise HPLC gradiente de cada uma das frações recolhidas.

Tabela 14: Condições utilizadas no processo de libertação.

Fração	Tempo	Solvente A (mL)	Solvente B (mL)	% yA/yB
1	0-20 min	18,00	7,00	(72/28)
2	20-27 min	6,90	8,10	(46/54)
3	27-30 min	5,25	9,75	(35/65)
4	30-36 min	2,55	12,45	(24/76)
5	36-45 min	1,28	13,73	(0,085/91,5)
6	45-50 min	0,00	15,00	(0/100)

Na Figura 64 apresenta-se o cromatograma referente à análise por HPLC gradiente da fração 6. Mostra-se, a título exemplificativo, que foi assim possível obter uma fração contendo um composto fenólico isolado. Este extrato foi mais tarde utilizado para a identificação de respetivo composto fenólico através de LC-MS. As restantes frações obtidas neste contexto são apresentadas no Anexo 6.

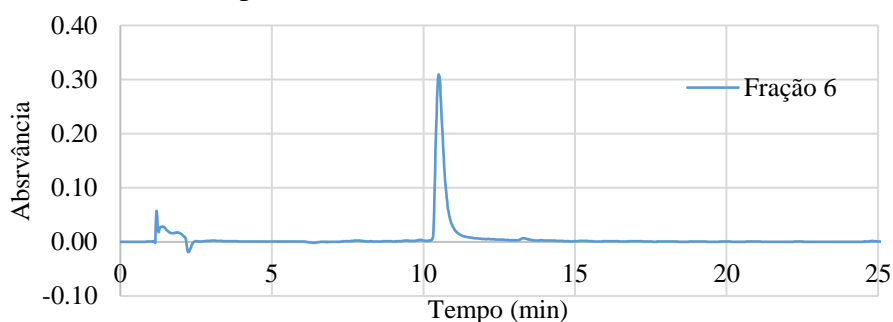


Figura 64: Cromatograma correspondente à análise por HPLC gradiente da fração número 6. Esta fração foi obtida através do processo de desorção do extrato de cortiça anteriormente retido no MIP_7. A análise foi feita com deteção UV a 280 nm.

6.5. Identificação através de LC-MS dos polifenóis obtidos por tratamento de extratos de cortiça com MIPs

Nesta subsecção apresenta-se a identificação através de LC-MS dos compostos fenólicos presentes no extratos de cortiça.

Estas análises foram realizadas no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) através de um espectrómetro de massa de alta resolução, incluindo uma fonte de ionização por electro-pulverização (ESI), conectado a um sistema de cromatografia líquida com detetor de díodos (LC/MS/DAD). Especificamente, foi utilizado um espectrômetro de massa híbrido LTQ-Orbitrap™-XL (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha) controlado pelo sistemas LTQ Tune Plus 2.5.5 e Xcalibur 2.1.0. A voltagem do capilar da fonte de ionização por electro-pulverização (ESI) foi ajustada em 3,0 kV. A temperatura do capilar foi fixada em 275 °C. A taxa de fluxo do gás de bainha e do gás auxiliar foram de 40 e 10 (unidades arbitrárias conforme fornecida pelas configurações do *software*), respetivamente. A voltagem do capilar foi de -50 V e a voltagem da lente do tubo foi de -87,95 V. Com cada amostra, 20 µL foram separados em um sistema de HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha) utilizando uma coluna Ascentis C18 (Supelco Analytical, EUA), contendo partículas de tamanho 5 µm e com dimensões de 4,6 mm ID x 250 mm L. Os comprimentos de onda UV selecionados foram 273, 280 e 306 nm. Utilizou-se também um *software* de tratamento de dados MS (Xcalibur QualBrowser, Thermo Fischer Scientific) para pesquisar os grupos ativos previstos pelo valor de m/z.

O extrato inicial de cortiça considerado para análise por LC-MS foi o correspondente ao granulado de cortiça obtido diretamente por extração soxhlet. Na Figura 65 apresenta-se o cromatograma iónico total (TIC), que representa a soma total de todos os picos espectrais de massa que pertencem ao mesmo varrimento, para esse extrato de cortiça. A identificação dos compostos fenólicos foi baseada nos tempos de retenção de cada composto, no comprimento de onda máximo de cada pico ($\lambda_{\text{máx}}$), no valor do ião molecular $[M-H]^-$ e nos fragmentos de MS^2 . Deste modo, foi possível identificar pelo menos cinco compostos fenólicos neste extrato, nomeadamente ácido quínico, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido elágico e o ácido cafeico (A. Fernandes *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2010).

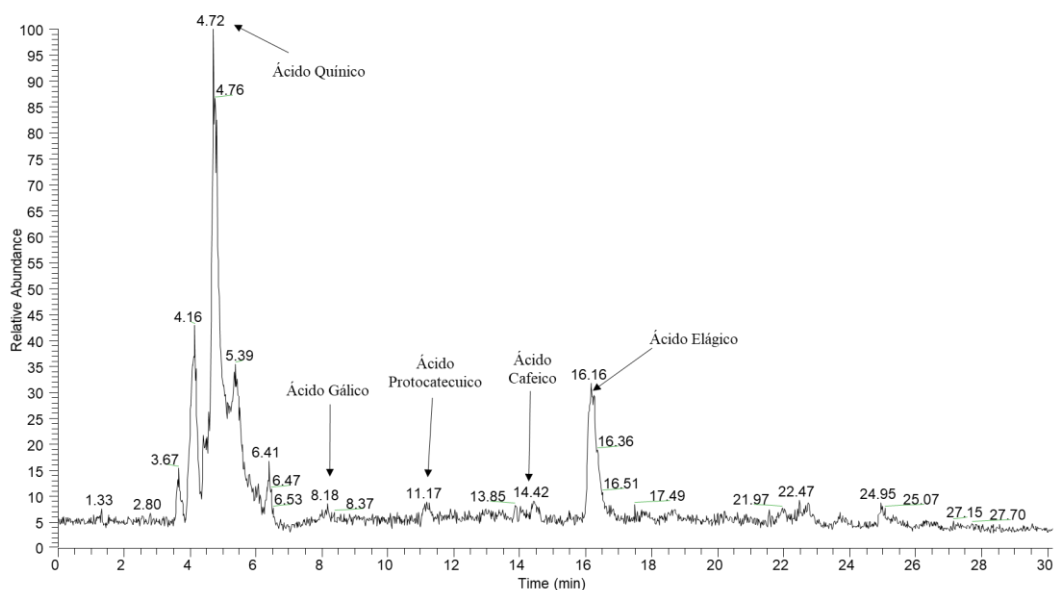


Figura 65: Cromatograma iônico total (LC-TIC) correspondente ao extrato de granulado de cortiça obtido por extração soxhlet e identificação dos compostos fenólicos presentes nesse extrato.

A Figura 66 mostra, a título exemplificativo, a metodologia usada para identificar o ácido elágico com auxílio do *software* Xcalibur. Em primeiro lugar, no cromatograma TIC (Figura 65) foi selecionado o tempo de retenção do pico em análise (RT=16,16 min), de seguida, através do PDA, foram identificados os máximos de absorção correspondentes, Figura 66b, para esse tempo de retenção ($\lambda_{\text{máx}}=252/368$) e, por fim, comparando o valor do ião molecular $[M-H]^-$ (Figura 66c) e os picos de fragmentação (MS^2) (Figura 66d) com valores reportados na bibliografia é possível concluir que o composto correspondente a esse pico é o ácido elágico.

As Figuras 66e e f são correspondentes à análise por LC-TIC e LC-PDA de uma amostra em branco (contendo apenas o solvente usado). Esta informação é apresentada para evidenciar os compostos fenólicos presentes nesse mesmo extrato através da análise de uma amostra em “branco”. Os cromatogramas correspondentes aos restantes compostos fenólicos identificados são apresentados em Anexo 7.

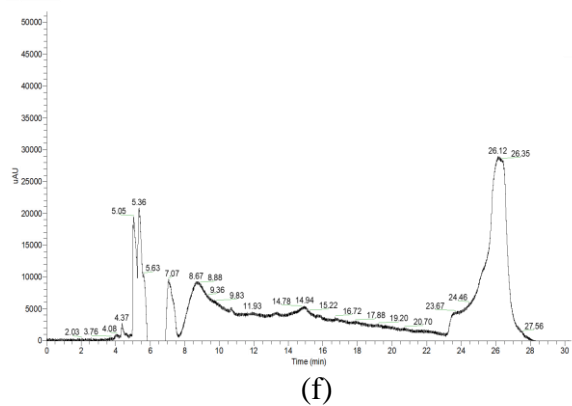
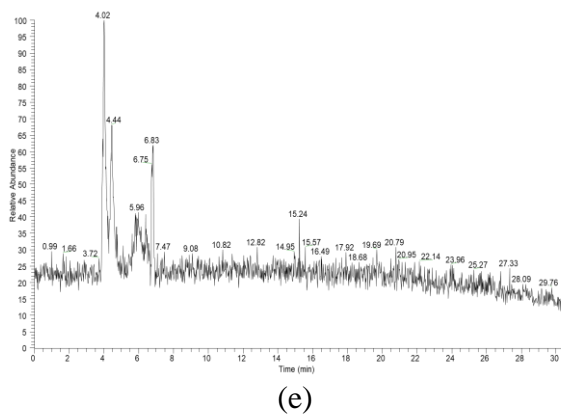
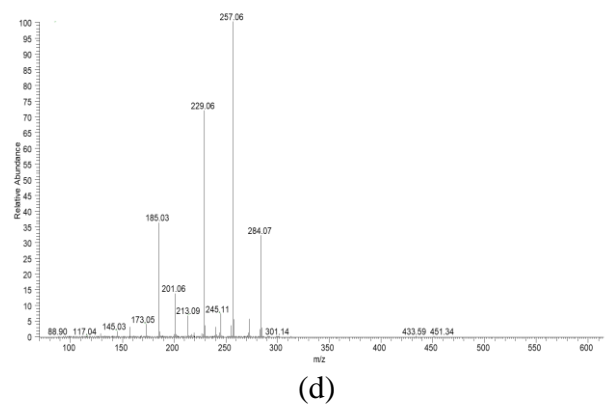
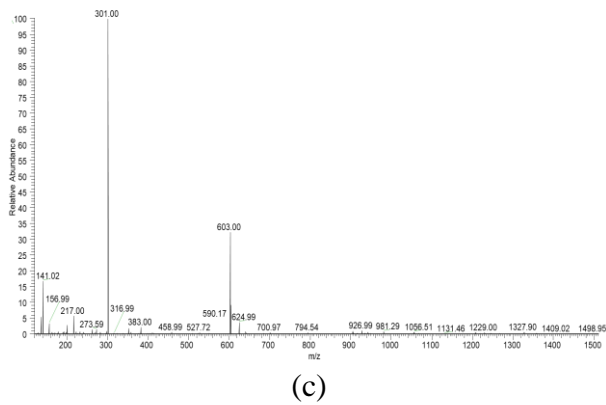
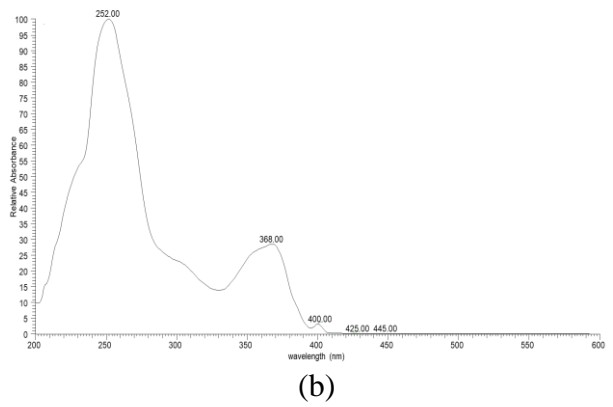
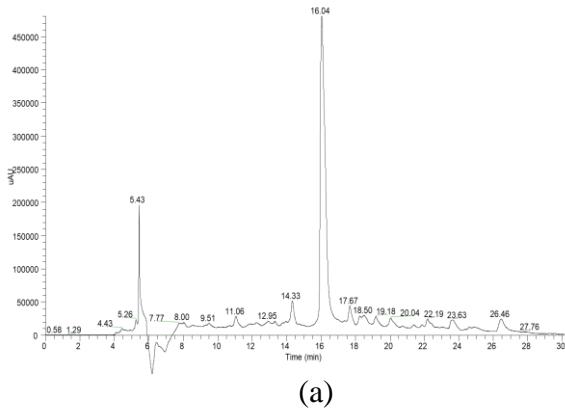


Figura 66: Cromatogramas correspondentes à análise por LC-MS do extrato de granulado de cortiça obtido por soxhlet. Apresenta-se aqui informação relativa à identificação do ácido elágico nesse extrato. (a) Varrimento total por LC-PDA do extrato, (b) Espectro UV correspondente ao tempo de retenção [15,32-16,98] min, (c) Valores dos iões moleculares $[M-H]^-$ experimentais para o pico com tempo de retenção 16,04 min (d) Picos de fragmentação MS^2 correspondentes a $m/z=301,00$, (e) Cromatograma iónico total por LC-TIC correspondente ao branco, (f) Varrimento total por LC-PDA correspondente ao branco.

De forma similar, também foi analisada por LC-MS a fração 6 obtida no processo de libertação dos componentes do extrato retidos no MIP_7. Esta análise permite confirmar (ver dados de LC-TIC e LC-PDA apresentados nas Figura 67 e 68) que o composto isolado através deste processo é o ácido elágico.

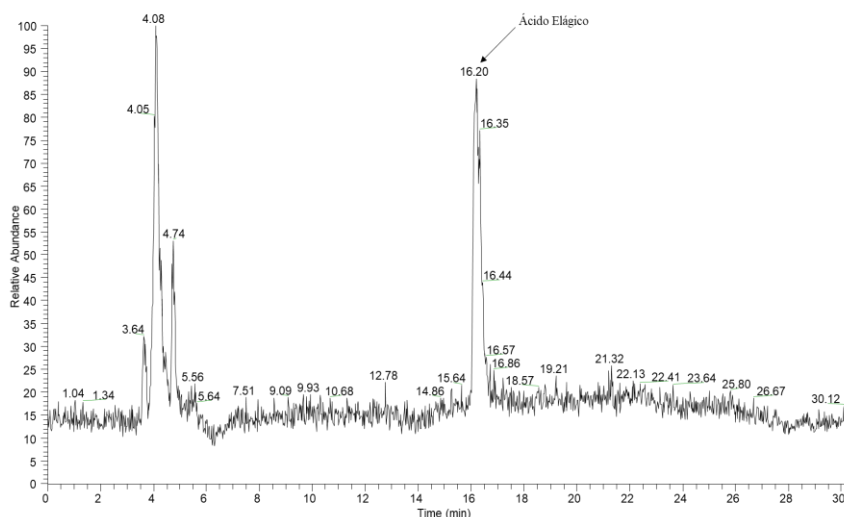


Figura 67: Cromatograma correspondente à análise por LC-TIC da fração 6, resultante do processo de recuperação dos compostos adsorvidos no MIP_7. Esta análise permite confirmar que o composto isolado é o ácido elágico.

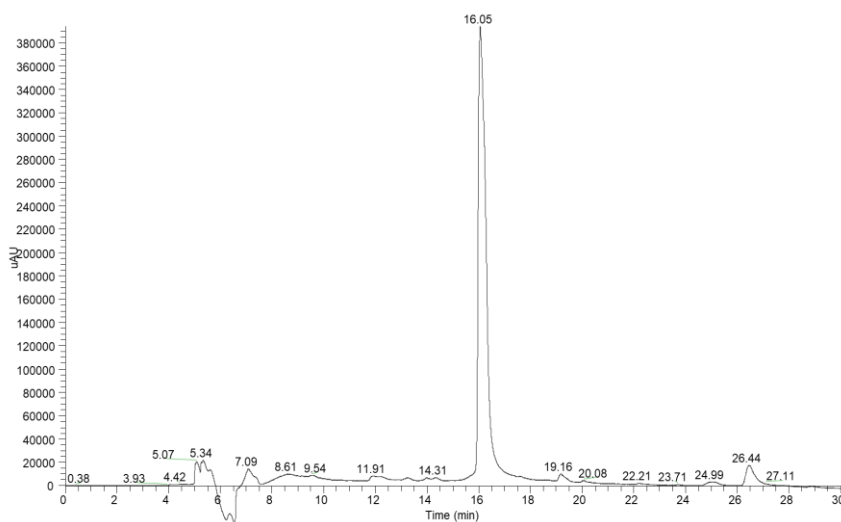


Figura 68: Cromatograma correspondente à análise por LC-PDA da fração 6, resultante do processo de recuperação dos compostos adsorvidos no MIP_7. Esta análise permite confirmar que o composto isolado é o ácido elágico.

Na Tabela 15 apresentam-se de forma mais detalhada os dados obtidos na identificação de compostos fenólicos por LC-MS, sendo também feita a comparação com informação semelhante reportada na literatura.

Tabela 15: Identificação por LC-MS de compostos fenólicos presentes no extrato de cortiça obtido diretamente com granulado de cortiça através da técnica de soxhlet.

RT (TIC) (min)	RT (PDA) (min)	Fórmula Molecular	λ_{\max} (nm)	[M-H] Experimental	[M-H] Teórico	Massa Molecular (g/mol)	Δ (ppm)	MS ² (m/z)	Composto Fenólico	Referências Bibliográficas
4,72	5,43	C ₇ H ₁₂ O ₆	227/242	191,0556	191,055	192,17	2,907	84,89 92,92 110,96 126,99 171 173	Ácido Quínico	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
8,18	8	C ₇ H ₆ O ₅	241/267	169,0135	169,0131	170,12	1,895	125	Ácido Gálico	
11,17	11,06	C ₇ H ₆ O ₄	240	153,0187	153,0182	154,12	3,169	109	Ácido Protocatecuico	(A. Fernandes <i>et al.</i> , 2011) (Santos <i>et al.</i> , 2010)
14,42	14,33	C ₉ H ₈ O ₄	241	179,0342	179,0339	180,16	1,758	135	Ácido Cafeico	
16,6	16,04	C ₁₄ H ₆ O ₈	251/367	301,9981	301,9979	302,197	0,653	185 201 229 257 273 284	Ácido Elágico	(Touati <i>et al.</i> , 2015) (A. Fernandes <i>et al.</i> , 2011)

Capítulo 7 – Conclusões

Este trabalho incidiu no estudo da extração de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) e de compostos bioativos da cortiça natural, usando CO₂ supercrítico, e também na avaliação da retenção destes compostos em polímeros molecularmente impressos (MIPs). Pretendeu-se desta forma contribuir para a criação de conhecimento com aplicação em indústrias da cortiça, nomeadamente na área do fabrico de rolhas onde a erradicação do TCA é um problema importante. A valorização de resíduos de cortiça através da extração e posterior concentração/separação de compostos bioativos, nomeadamente polifenóis, foi outra vertente explorada nesta contribuição.

Foram realizados estudos experimentais e de modelação matemática sobre a transferência e migração de TCA na cortiça, considerando como sistema modelo o contacto líquido/sólido (solução hidro-alcoólica/cortiça). A amostragem ao longo do tempo da fase líquida, contendo inicialmente TCA em concentração conhecida, permitiu obter a dinâmica de transferência e posterior difusão desta molécula na cortiça. Foram consideradas concentrações de TCA na gama de mg/L, o que permitiu fazer as medições necessárias por HPLC com deteção UV. Os resultados experimentais foram comparados com previsões do modelo teórico, desenvolvido e implementado em MATLAB usando o método das linhas (MOL). Mostrou-se que a migração do TCA para a cortiça depende de forma crítica da composição do solvente hidro-alcoólico, devido à influência das interações hidrofóbicas. Estes resultados são úteis no projeto de processos de extração de TCA da cortiça pois mostram que a incorporação de um componente apolar (ex. o CO₂ em solventes gasosos) deverá aumentar a eficiência de remoção desta molécula.

A extração de TCA da cortiça com CO₂ supercrítico foi testada considerando diferentes combinações entre pressão, temperatura, tempo de extração e presença de co-solvente. Adicionalmente, foi também estudado o efeito do tratamento de rolhas de cortiça com CO₂ gasoso para remoção do ar contido nas células da cortiça, tentando evitar desta forma a formação de “*papinhos*” durante os tratamentos com vapor de água. Os testes realizados incluíram a utilização de rolhas positivas (com quantidade conhecida de TCA), fornecidas pela corticeira Amorim & Irmãos. Neste contexto, a medição de TCA na gama de ng/L foi realizada por SPME-GC-ECD, também pela corticeira Amorim & Irmãos. Com as condições de operação usadas, foram observadas deformações geométricas importantes na cortiça e os resultados indicam também que, em consequência do tratamento com CO₂ gasoso/supercrítico, houve uma migração substancial do TCA

situado nas zonas interiores da rolha para a sua superfície. Estas observações são também importantes no desenho de processos eficientes de extração de TCA da cortiça pois mostram que o tratamento não deverá incidir em zonas com profundidade superior a cerca de 3 mm. Com a configuração experimental considerada, não foi possível realizar medições de TCA por voltametria cíclica, nomeadamente na gama de ng/L. Esta técnica mostrou-se, no entanto, potencialmente útil na deteção e quantificação de compostos fenólicos presentes em extratos de cortiça.

Mostrou-se que a utilização de polímeros molecularmente impressos (MIPs) apresenta vantagens importantes na valorização de polifenóis presentes em extratos de cortiça, nomeadamente em comparação com outros adsorventes comerciais (ex. resinas DAX8, XAD4 e XAD7HP). De facto, dois MIPs sintetizados com 4-vinilpiridina como monómero funcional evidenciaram um desempenho muito superior na retenção de polifenóis em comparação com os restantes materiais. Através de análises por cromatografia líquida com espectroscopia de massa e detetor de díodos (LC/MS/DAD), foram identificados os polifenóis presentes nos extratos de cortiça e demonstrou-se que a utilização dos MIPs permite, por exemplo, isolar o ácido elágico presente nessas misturas.

Referências bibliográficas

- A Cortiça. (2017). Consultado em <https://artelusa.pt/acortica/> a 15/11/2017.
- Abdel-Hamid, R., & Newair, E. F. (2011). Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 657(1–2), 107–112.
- Abdel-Hamid, R., & Newair, E. F. (2015). Voltammetric Determination of Ferulic Acid Using Polypyrrole-Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Electrode with Sample Application. *Nanomaterials*, 5(4), 1704–1715.
- Álvarez-Rodríguez, M. L., López-Ocaña, L., López-Coronado, J. M., Rodríguez, E., Martínez, M. J., Larriba, G., & R. Coque, J.-J. (2002). Cork Taint of Wines: Role of the Filamentous Fungi Isolated from Cork in the Formation of 2,4,6-Trichloroanisole by O Methylation of 2,4,6-Trichlorophenol. *American Society for Microbiology*, 68(12), 5860–5869.
- Alzaga, R., Ortiz, L., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.-P., & Bayona, J. M. (2003). Accurate Determination of 2,4,6-Trichloroanisole in Wines at Low Parts Per Trillion by Solid-Phase Microextraction Followed by GC-ECD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3509–3514.
- Amorim Cork. (2016). Consultado em <https://www.amorimcork.com/pt/natural-cork/cork-and-other-applications/> a 21/11/2017.
- Aroso, I. M., Duarte, A. R. C., Pires, R. R., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2015). Cork processing with supercritical carbon dioxide: Impregnation and sorption studies. *Journal of Supercritical Fluids*, 104, 251–258.
- Associação Portuguesa da Cortiça. (2015). Consultado em <http://www.apcor.pt/cortica/processo-de-transformacao/percurso-industrial/rolhas-naturais/> a 27/11/2017.

- Brett, A. M. O., & Ghica, M.-E. (2003). Electrochemical Oxidation of Quercetin. *Electroanalysis*, *15*(22), 1745–1750.
- Caldas, S. S., Gonçalves, F. F., Primel, E. G., Prestes, O. D., Martins, M. L., & Zanella, R. (2011). Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, *34*(9), 1604–1617.
- Campillo, N., Viñas, P., Cacho, J. I., Peñalver, R., & Hernández-Córdoba, M. (2010). Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 7323–7330.
- Candeias, M. S. G. S. (2007). *Caracterização de um Poliol viscoelástico e Pesquisa de Inibidores da formação do 2,4,6-Tricloroanisol*. Universidade Técnica de Lisboa.
- Carrilho, E., Tavares, M. C. H., & Lanças, F. M. (2001). Fluido Supercrítico em Química Analítica. I. Cromatografia com Fluido Supercrítico: Conceitos Termodinâmicos. *Química Nova*, *24*(4), 509–515.
- Castola, V., Marongiu, B., Bighelli, A., Floris, C., Lai, A., & Casanova, J. (2005). Extractives of cork (*Quercus suber* L.): Chemical composition of dichloromethane and supercritical CO₂ extracts. *Industrial Crops and Products*, *21*(1), 65–69.
- Cork Institute of America. (2008). Consultado em <http://www.corkinstitute.com/history.html> a 30/11/2017.
- Corticeira Amorim. (2015). Consultado em <https://www.amorim.com/a-cortica/localizacao-do-montado/> a 8/12/2017.
- Extração de lipídios em alimentos. (2010). Consultado em <https://www.ebah.com.br/content/ABAAABN34AL/extracao-lipidios-alimentos#> a 13/06/2018.
- Ezquerro, Ó., Garrido-López, Á., & Tena, M. T. (2006). Determination of 2,4,6-trichloroanisole and guaiacol in cork stoppers by pressurised fluid extraction and gas

- chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1102, 18–24.
- Farias-Campomanes, A. M., & A. Meireles, M. A. (2013). Pisco Bagasse as a Potential Source of Bioactive Compounds – A Review. *Recent Patents on Engineering*, 7(1), 41–50.
- Fernandes, A., Sousa, A., Mateus, N., Cabral, M., & de Freitas, V. (2011). Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC-DAD/ESI-MS. *Food Chemistry*, 125(4), 1398–1405.
- Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Chagas, J. A. M., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2011). Properties of new cork-polymer composites: Advantages and drawbacks as compared with commercially available fibreboard materials. *Composite Structures*, 93(12), 3120–3129.
- Filomena, E. (2014). *Controlo de Qualidade de Rolhas de Cortiça Microaglomeradas*. Faculdade de Ciências do Porto.
- Galicia-Luna, L. A., Ortega-Rodriguez, A., & Richon, D. (2000). New apparatus for the fast determination of high-pressure vapor-liquid equilibria of mixtures and of accurate critical pressures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 45(2), 265–271.
- Garcia, A. R., Lopes, F., Barros, R. B. De, & Ilharco, L. M. (2015). The Problem of 2,4,6-Trichloroanisole in Cork Planks Studied by Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy: Proof of Concept. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 128–135.
- Gil, L. M. C. C. (1993). A Química da Cortiça : ponto da situação. *Química*, 50, 20–24.
- Gomes, C., Sadoyan, G., Dias, R. C. S., & Costa, M. R. P. F. N. (2017). Development of Molecularly Imprinted Polymers to Target Polyphenols Present in Plant Extracts. *PROCESSES*, 5(72), 1–24.
- Gomes, P. B., Mata, V. G., & Rodrigues, A. E. (2007). Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 41, 50–60.

- Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., & Lorenzo, F. (2004). Simultaneous separation, clean-up and analysis of musty odorous compounds in wines by on-line coupling of a pervaporation unit to gas chromatography- tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 516(1–2), 165–170.
- Graça, J. (2011). *Cortiça: composição e estrutura das paredes celulares suberosas*.
- Graça, J. (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry*, 3(October), 1–11.
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495–2511.
- Juanola, R., Guerrero, L., Subirà, D., Salvadó, V., Insa, S., Garcia Regueiro, J. A., & Anticó, E. (2004). Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork stoppers. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 291–297.
- Juanola R., Subirà D., Salvadó V., Garcia Regueiro J.A., & Anticó E. (2005). Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine. *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 347–352.
- Junior, M. R. M., Leite, A. V., & Dragano, N. R. V. (2010). Supercritical Fluid Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds From Natural Sources – Review (Supercritical Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds). *The Open Chemical Engineering Journal*, 4, 51–60.
- Kadhirvel, P., Machado, C., Freitas, A., Oliveira, T., Dias, R. C. S., & Costa, M. R. (2015). Molecular imprinting in hydrogels using reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization and continuous flow micro-reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(9), 1552–1564.
- Lack, E., Seidlitz, H., Bakali, M., & Zobel, R. (2005). Cork treatment - A new industrial application of supercritical fluids.

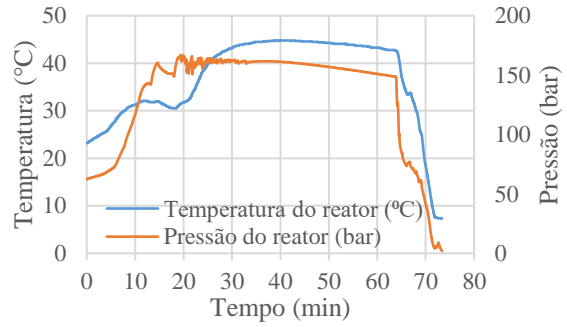
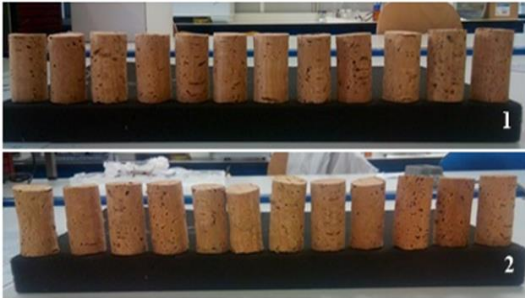
- Manrique, Y. (2016). *Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Bioactive Natural Products from Cork*. Faculty of Engineering, University of Porto.
- McHugh, M. A., & Krukonis, V. J. (2014). Supercritical Fluid Extraction. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (Second, pp. 1–515).
- Oliveira, D., Gomes, C., Dias, R. C. S., & Costa, M. R. P. F. N. (2016). Molecular imprinting of 5-fluorouracil in particles with surface RAFT grafted functional brushes. *Reactive and Functional Polymers*, *107*, 35–45.
- Pacheco, W. F., Semaan, F. S., Almeida, V. G. K., Ritta, A. G. S. L., & Aucélio, R. Q. (2013). Voltammetrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. *Revista Virtual de Quimica*, *5*(4), 516–537.
- Peres, A. M., Freitas, P., Dias, L. G., Sousa, M. E. B. C., Castro, L. M., & Veloso, A. C. A. (2013). Cyclic voltammetry: A tool to quantify 2,4,6-trichloroanisole in aqueous samples from cork planks boiling industrial process. *Talanta*, *117*, 438–444.
- Prak, S., Gunata, Z., Guiraud, J. P., & Schorr-Galindo, S. (2007). Fungal strains isolated from cork stoppers and the formation of 2,4,6-trichloroanisole involved in the cork taint of wine. *Food Microbiology*, *24*(3), 271–280.
- Rosa, M. E., & Fortes, M. A. (1989). Effects of water vapour heating on structure and properties of cork. *Wood Science and Technology*, *23*(1), 27–34.
- Rosa, M. E., Pereira, H., & Fortes, M. A. (1990). Effects of hot water treatment on the structure and properties of cork. *Wood Fiber Science*, *22*(2), 149–164.
- Santos, S. A. O., 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.
- Santos, S. A. O., Villaverde, J. J., Silva, C. M., Neto, C. P., & Silvestre, A. J. D. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* Labill bark. *The Journal of Supercritical Fluids*, *71*, 71–79.

- 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*, 50(6), 345–365.
- Silva Pereira, C., Danesh, P., Figueiredo Marques, J. J., & San Romão, M. V. (1999). O gosto a rolha em vinhos - estado actual dos conhecimentos. *Ciência Téc. Vitiv.*, 14(2), 79–99.
- Sousa, A. F., Pinto, P. C. R. O., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2006). Triterpenic and other lipophilic components from industrial cork byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6888–6893.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268–3295.
- Taylor, M. K., Young, T. M., Butzke, C. E., & Ebeler, S. E. (2000). Supercritical Fluid Extraction of 2,4,6-Trichloroanisole from Cork Stoppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2208–2211.
- Touati, R., Santos, S. A. O., Rocha, S. M., Belhamel, K., & Silvestre, A. J. D. (2015). The potential of cork from *Quercus suber* L. grown in Algeria as a source of bioactive lipophilic and phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 76, 936–945.
- Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry* (Third Edit). Jonh Wiley & Sons, Inc.

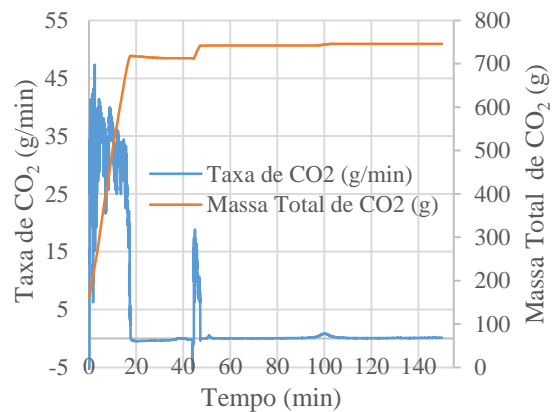
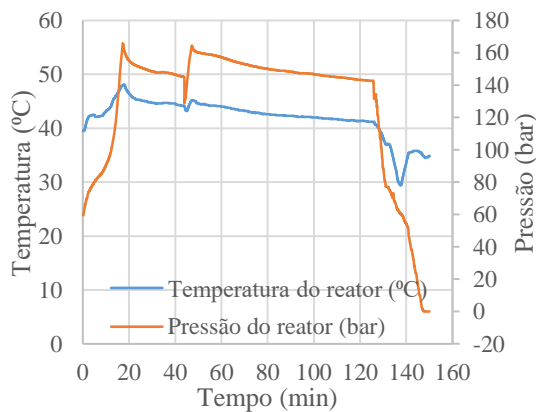
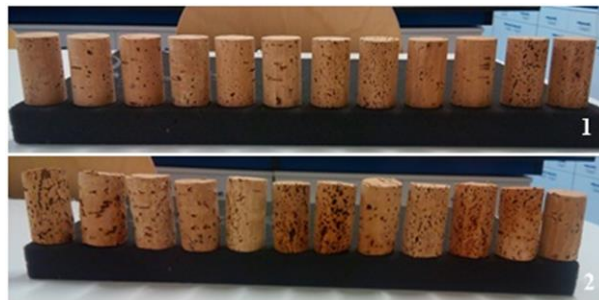
Anexos

Anexo 1: Imagens de peças de cortiça antes e depois do seu tratamento com CO₂ gasoso e/ou da extração com CO₂ supercrítico. São também apresentados os perfis de temperatura, pressão, taxa de CO₂ e massa total de CO₂ para as experiências correspondentes.

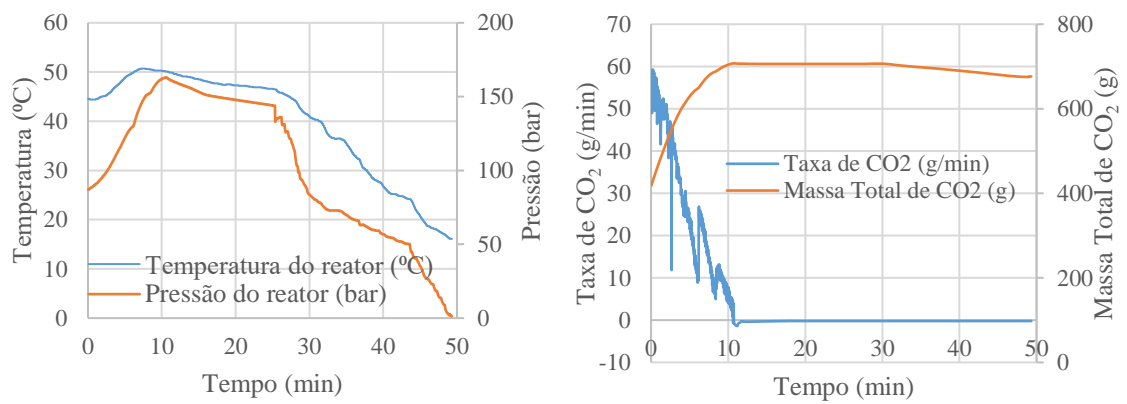
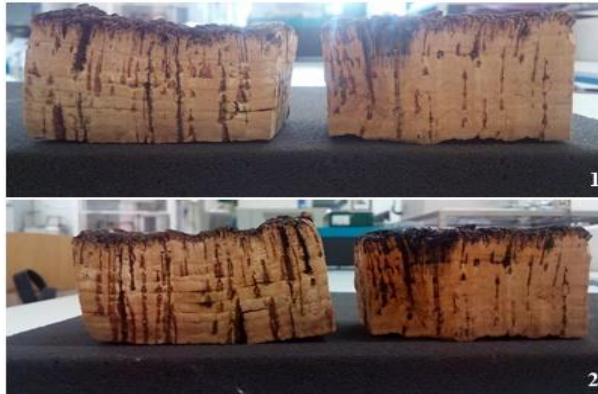
Experiência 1



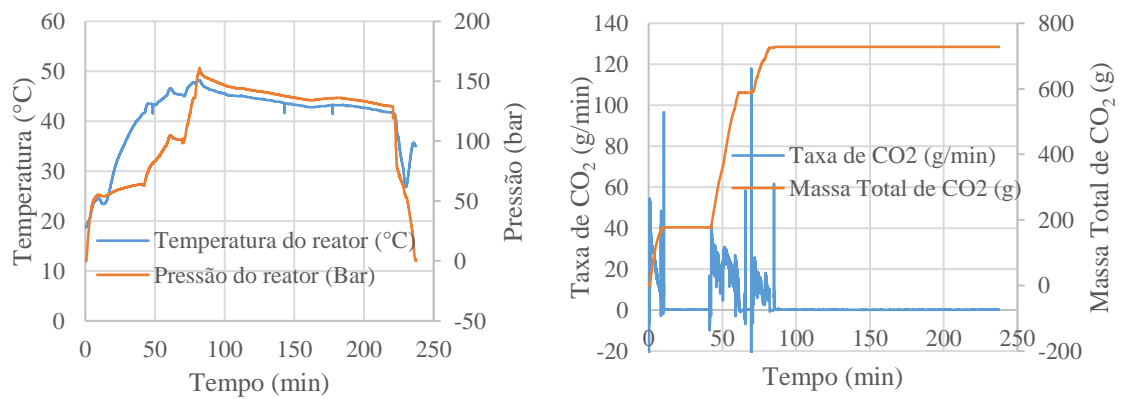
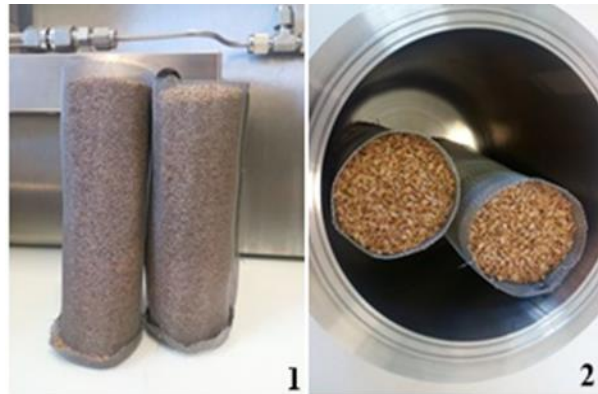
Experiência 2



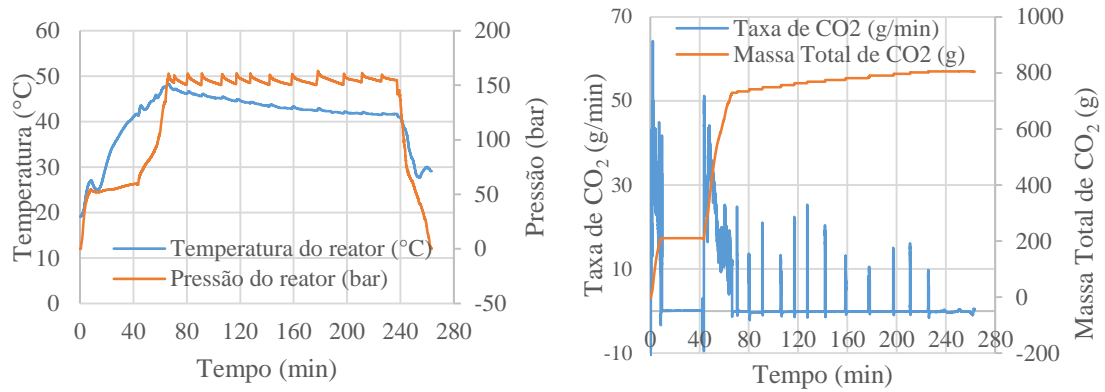
Experiência 3



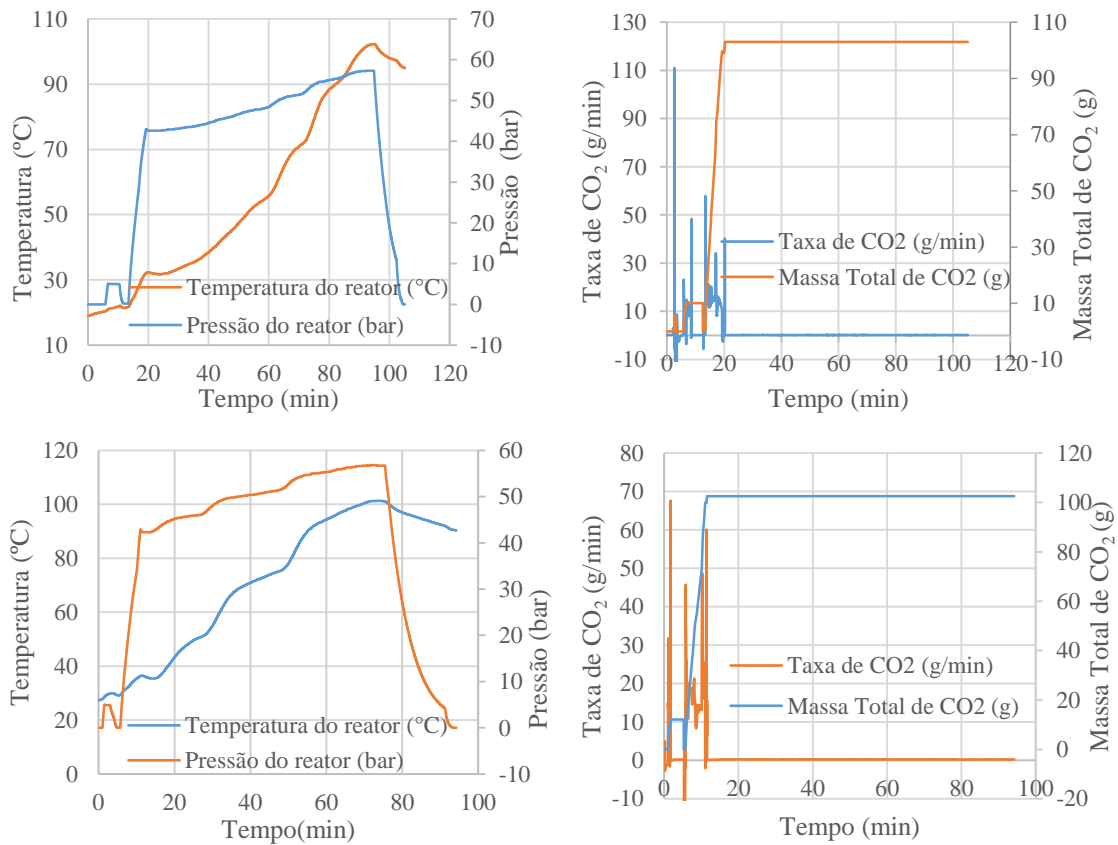
Experiência 4



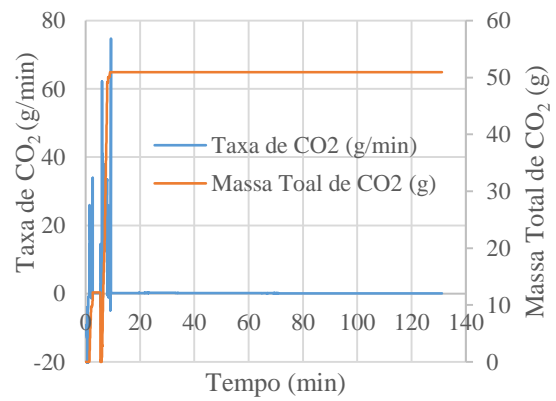
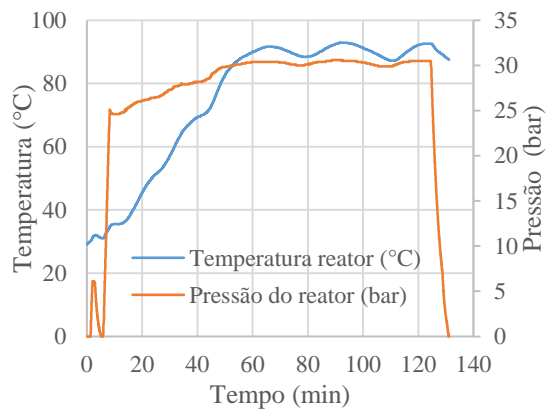
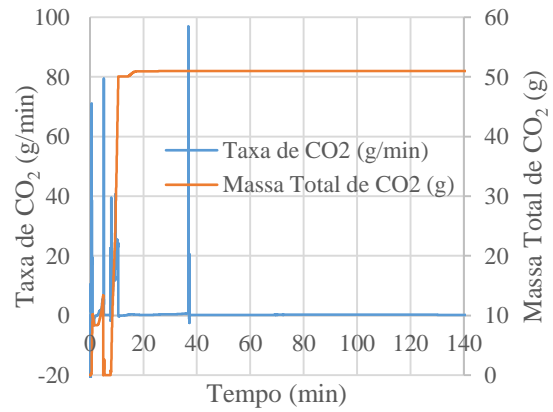
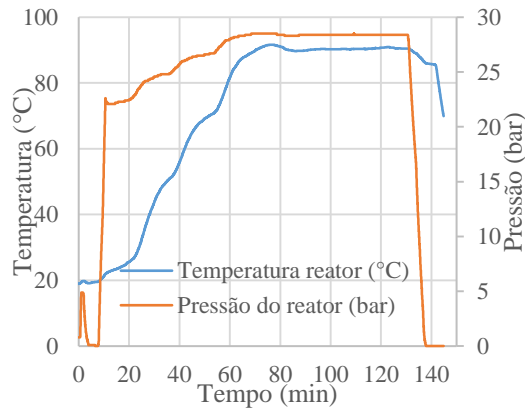
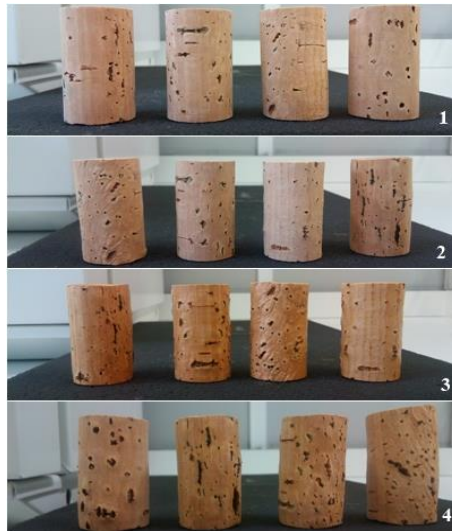
Experiência 5



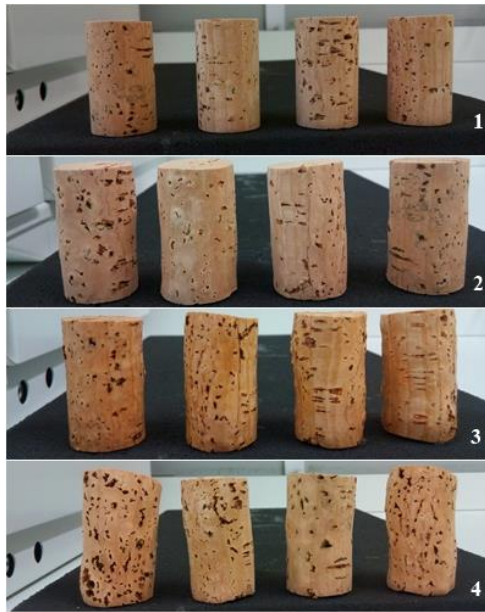
Experiência 6



Experiência 7

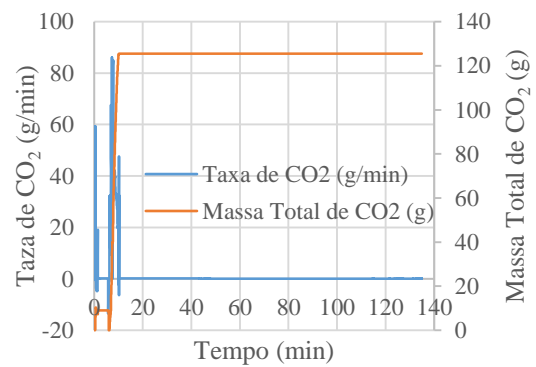
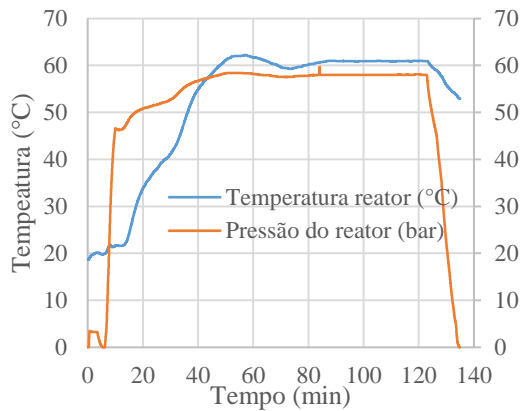


Experiência 8

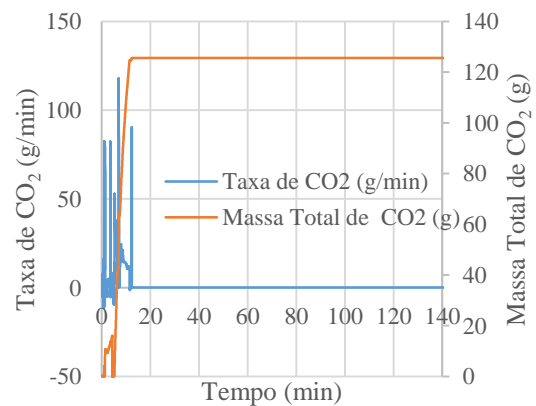
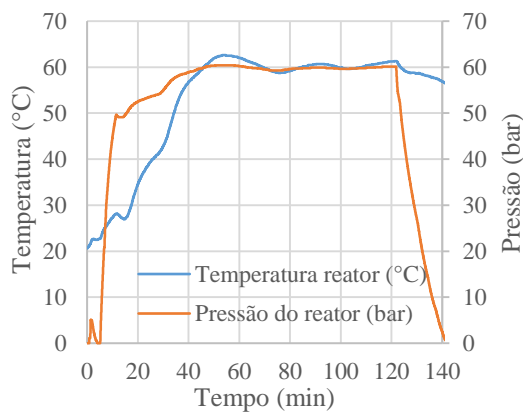


Impregnação de rolhas de cortiça com CO₂ gasoso: 1: Rolhas iniciais; 2: Rolhas após a primeira fase; 3: Rolhas após mergulho em água quente (85 °C) durante 1 min; 4: Rolhas após a segunda fase.

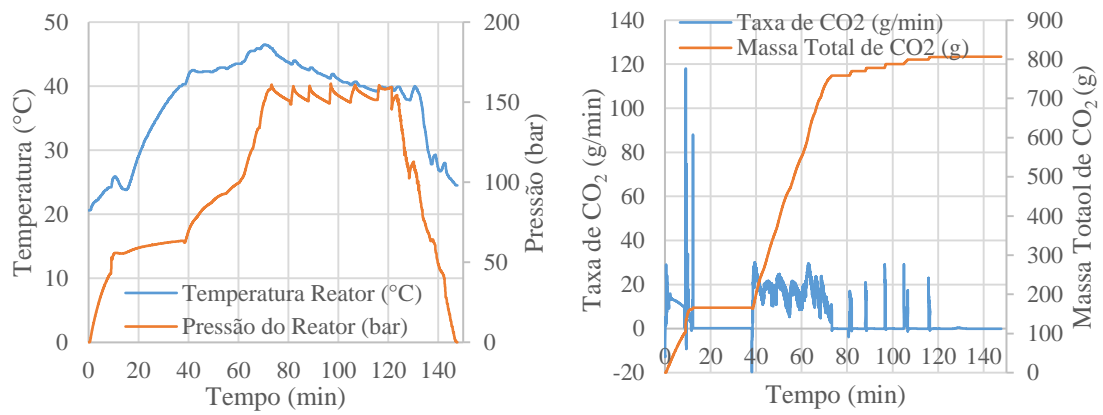
Primeira Fase



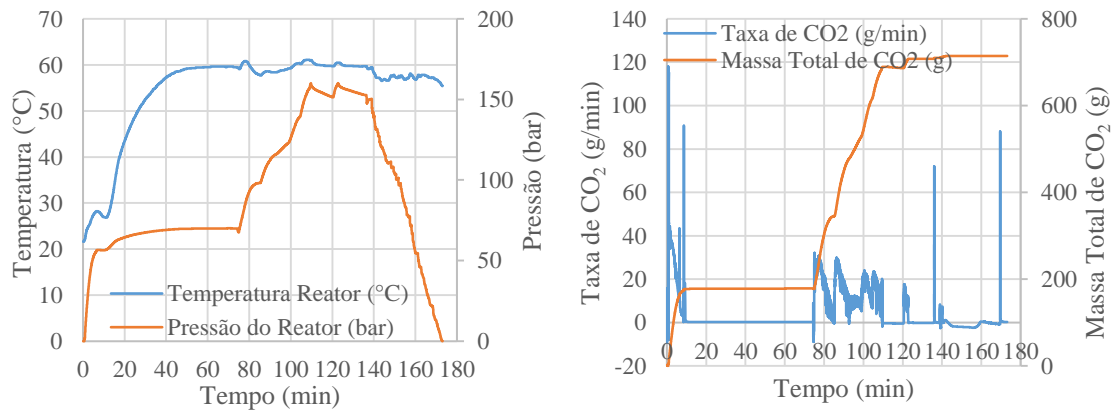
Segunda Fase



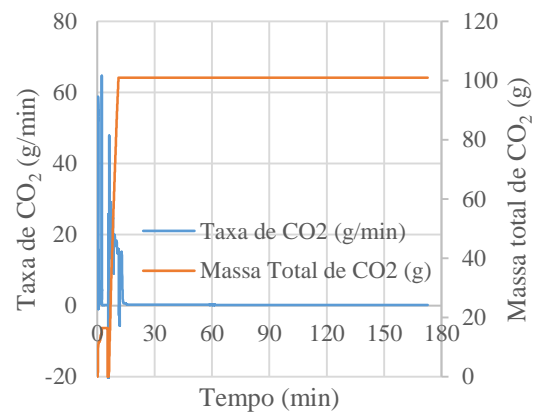
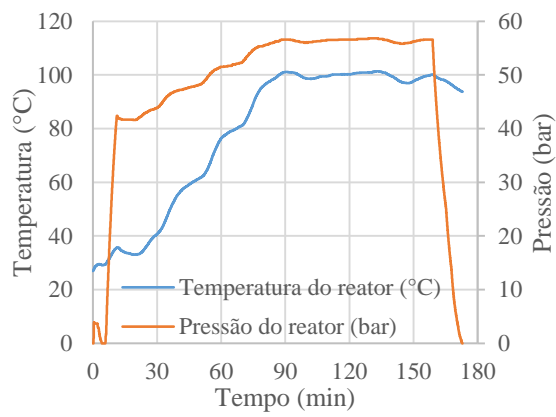
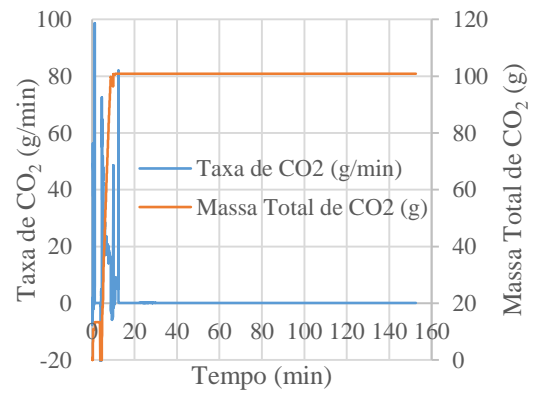
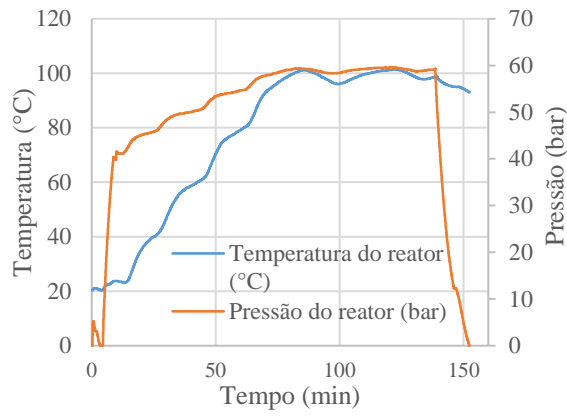
Experiência 9



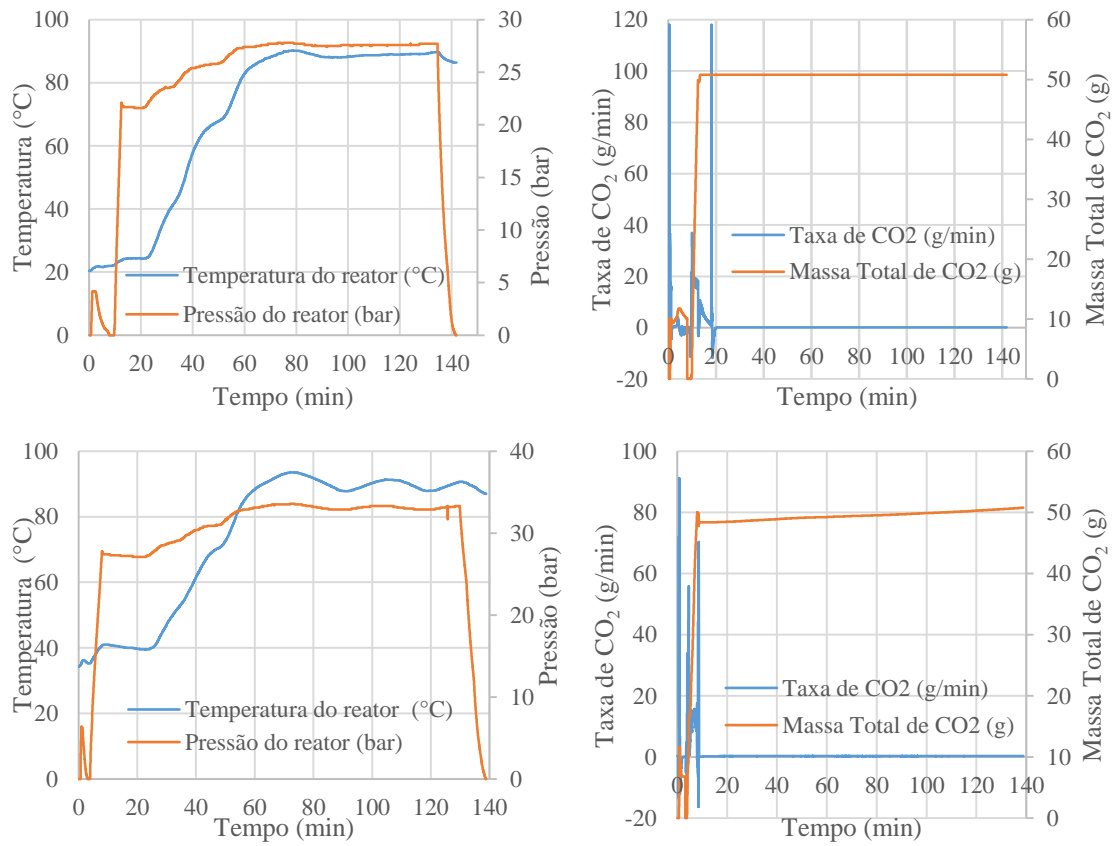
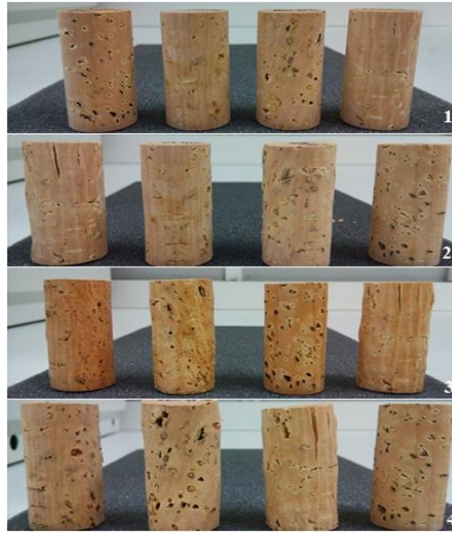
Experiência 10



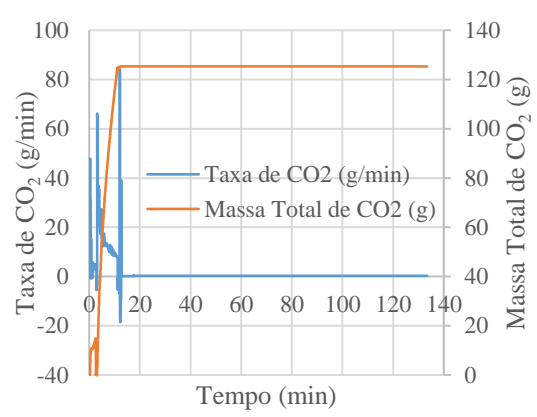
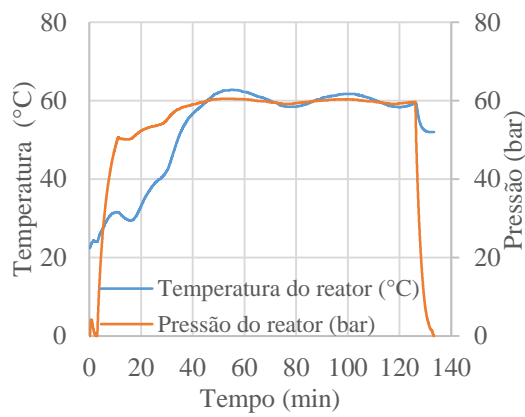
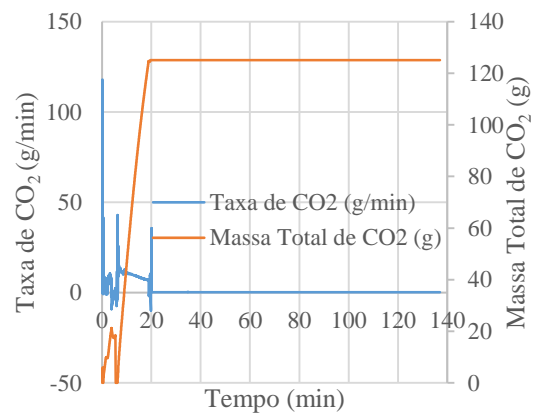
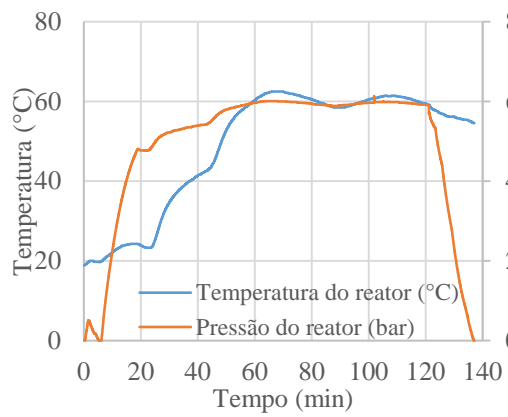
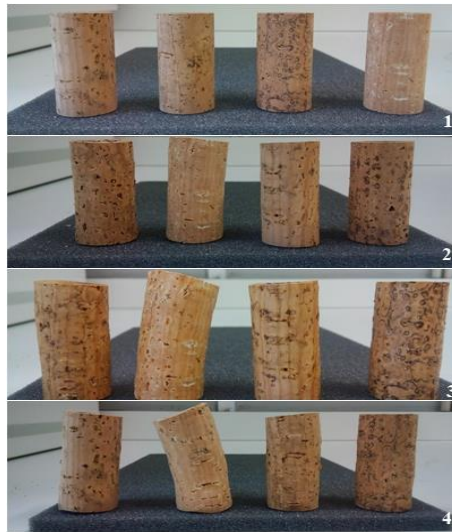
Experiência 11



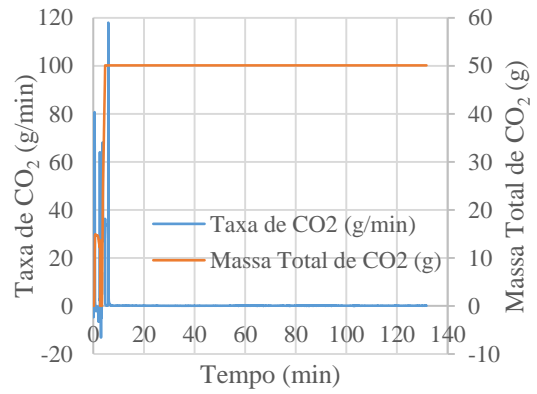
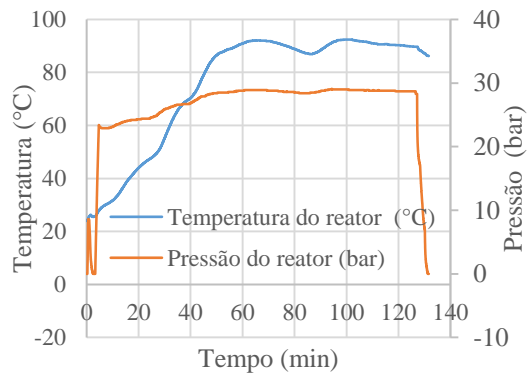
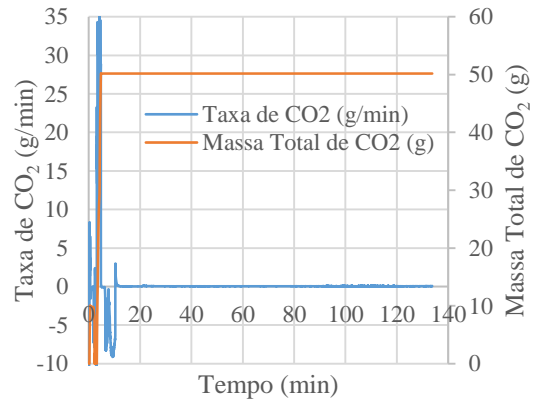
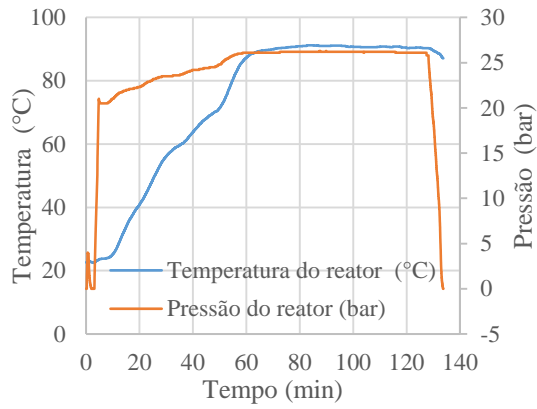
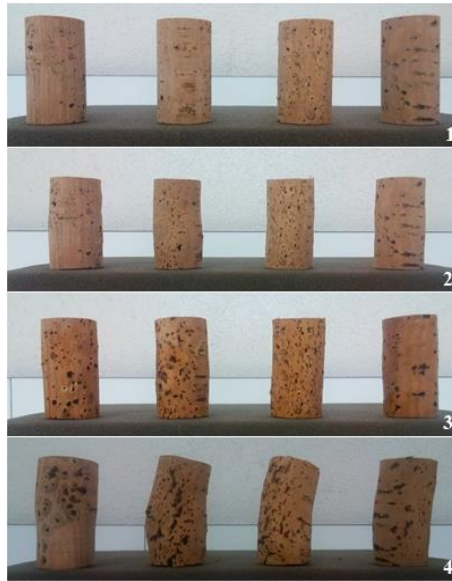
Experiência 12



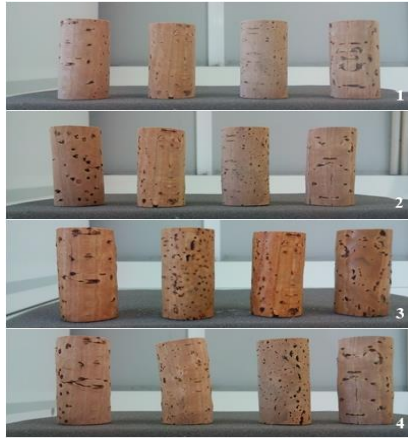
Experiência 13



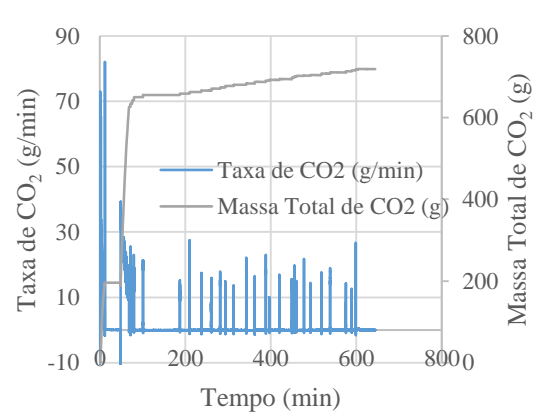
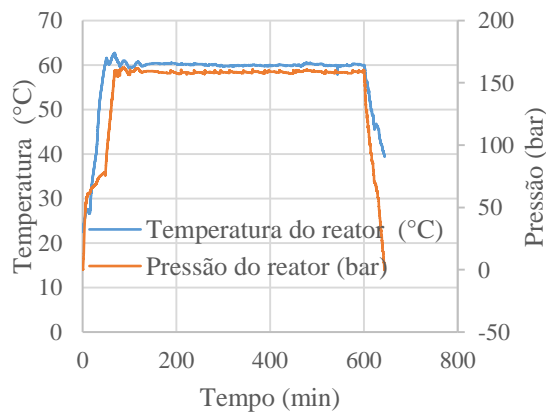
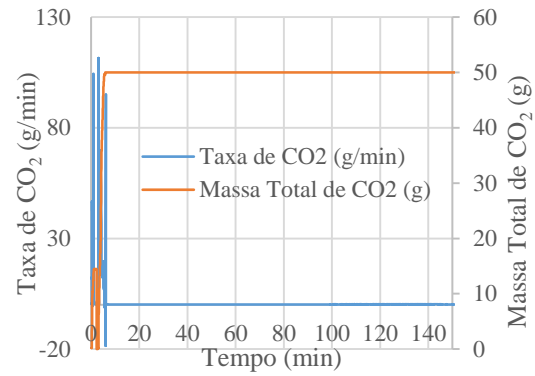
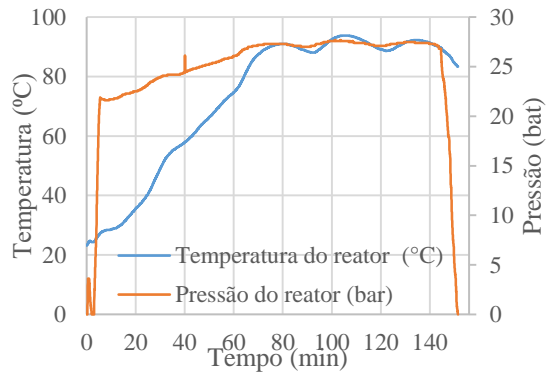
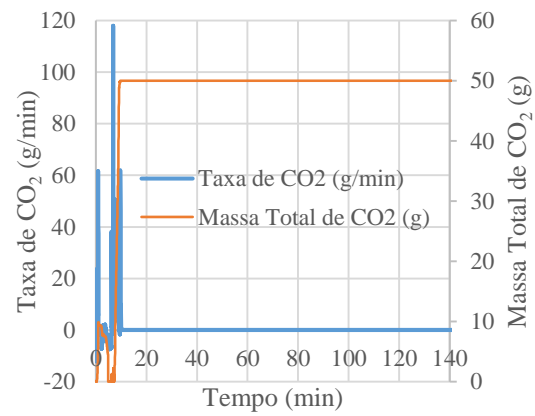
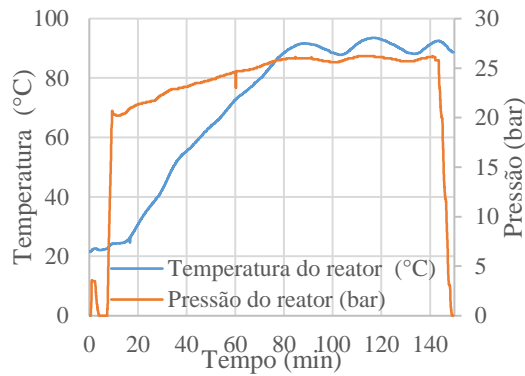
Experiência 14



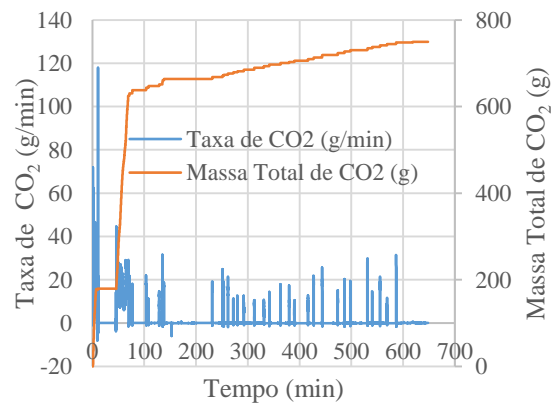
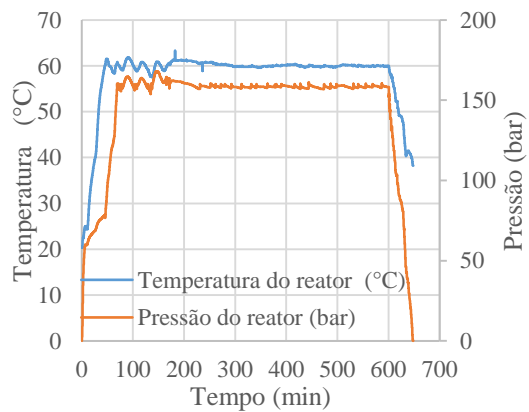
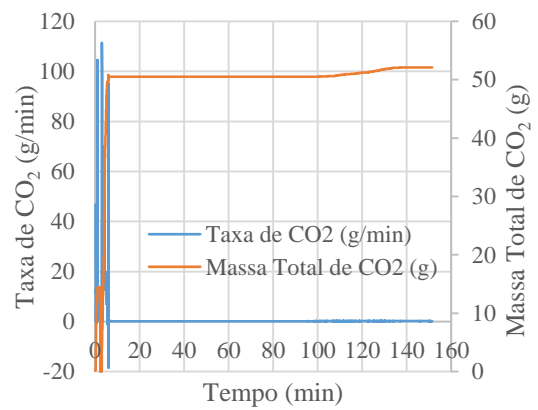
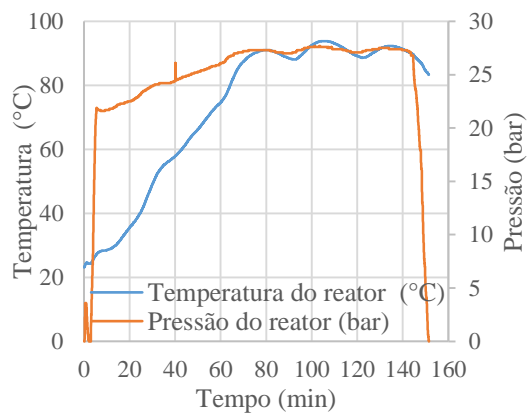
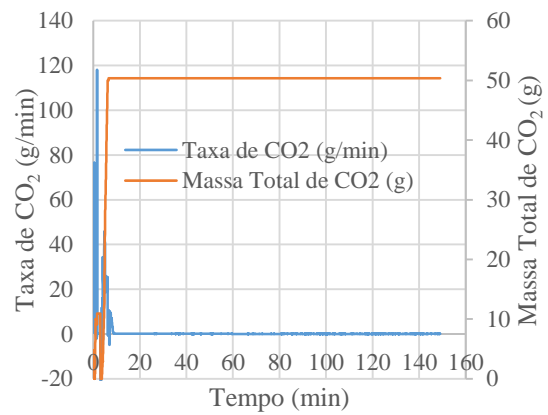
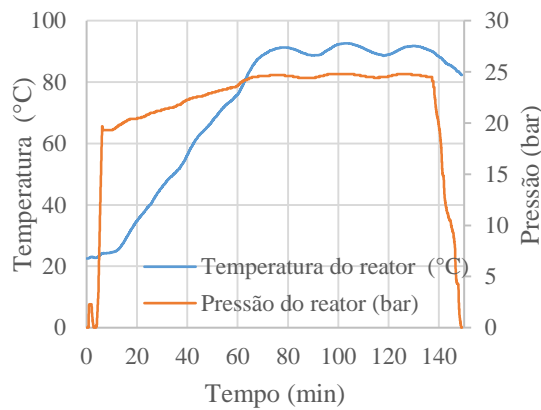
Experiência 15



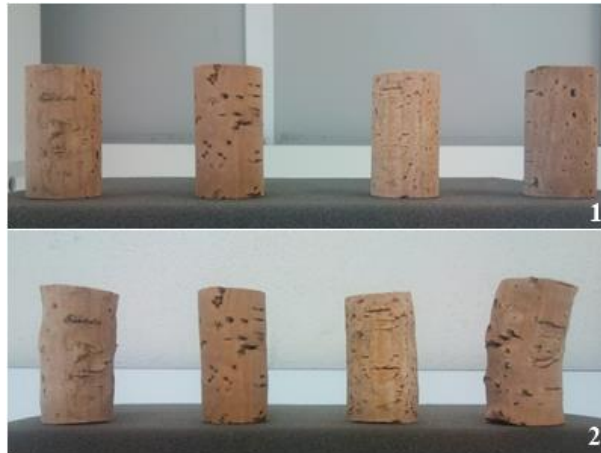
Impregnação de rolhas de cortiça com CO_2 gasoso: 1: Rolhas iniciais; 2: Rolhas após a primeira fase; 3: Rolhas após mergulho em água quente ($85\text{ }^\circ\text{C}$) durante 1 min; 4: Rolhas após a segunda fase. As rolhas foram posteriormente sujeitas a extração com CO_2 supercrítico (esquerda): 1: Antes; 2: Depois.



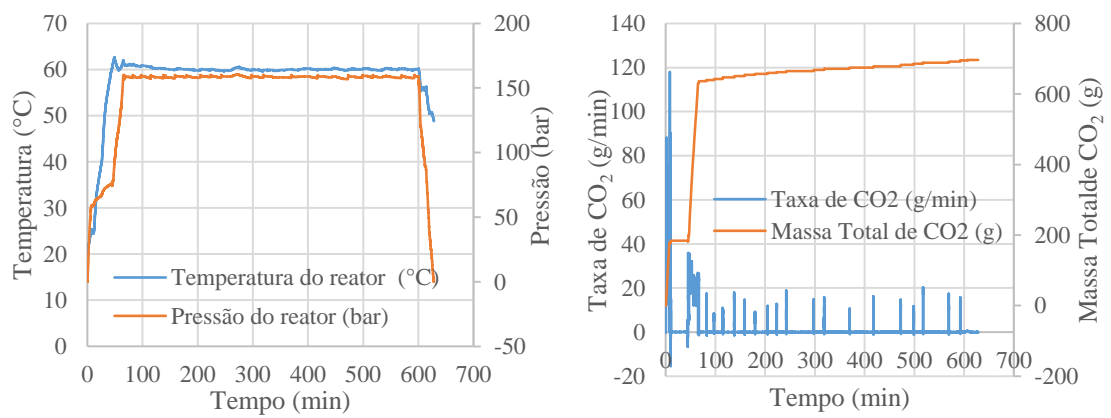
Experiência 16



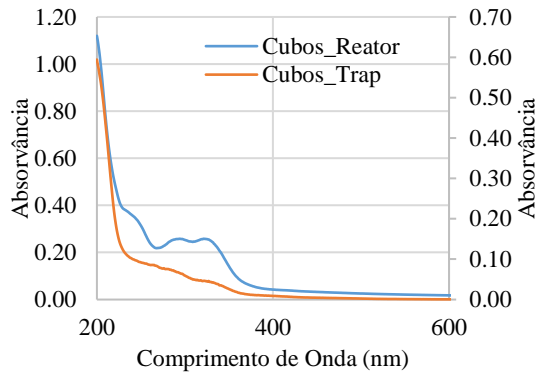
Experiência 17



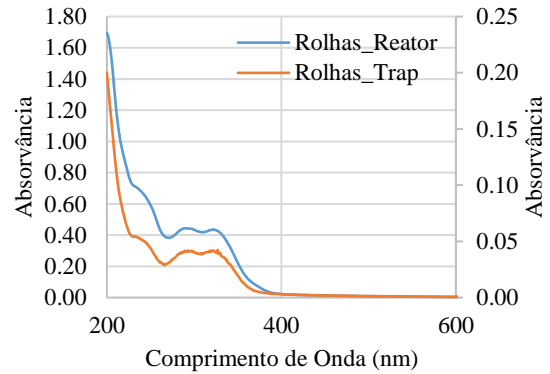
Experiência 18



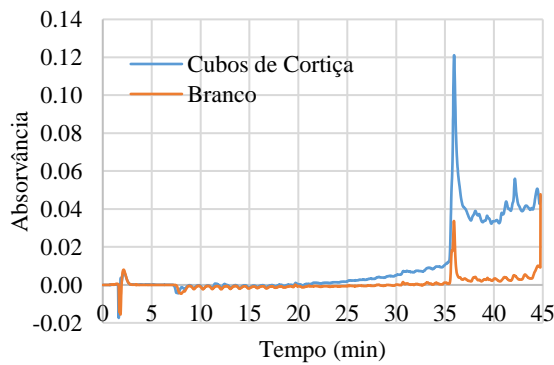
Anexo 2: Espectros de varrimento UV-Vis de extratos de cortiça obtidos a partir de cubos e rolhas ((a) e (b)). São também apresentados cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente de extratos de cortiça (cubos, granulado). (c) 280 nm (d) 320 nm ambos para 60 μ L de extrato em ACN/H₂O (50/50). (e) 60 μ L de extrato em ACN/H₂O (50/50) e 120 μ L de extrato em ACN/H₂O (90/10) (f) 120 μ L de extrato em ACN/H₂O (90/10) ambos a 280 nm.



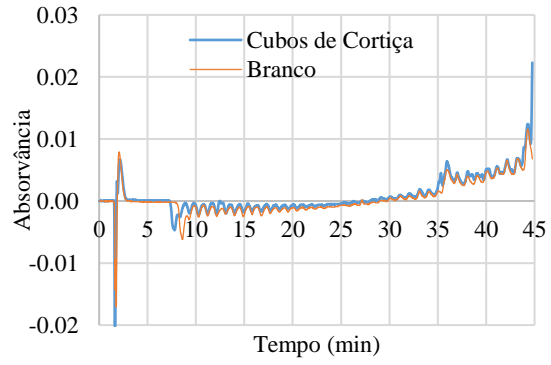
(a)



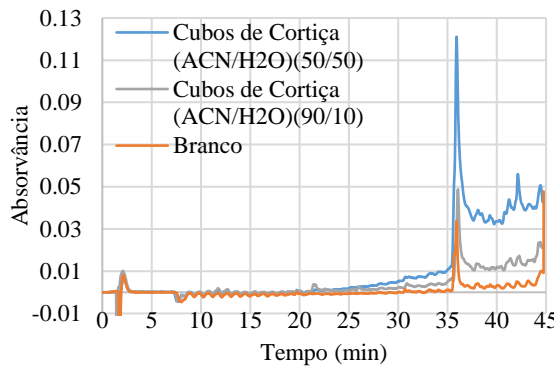
(b)



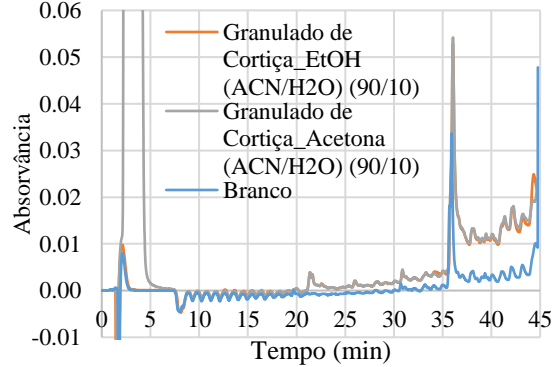
(c)



(d)

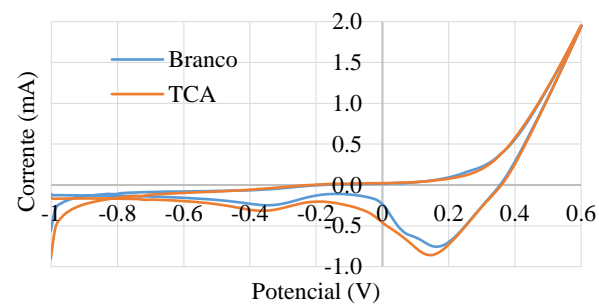


(e)

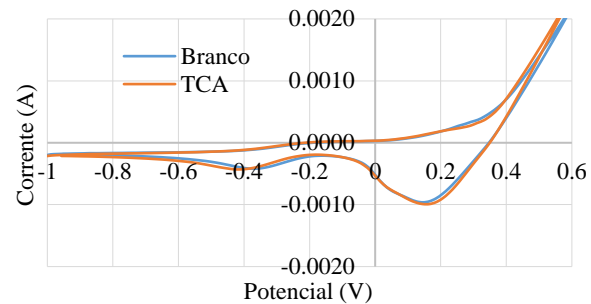


(f)

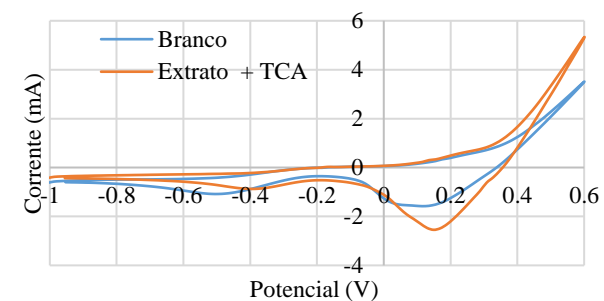
Anexo 3: Testes realizados por voltametria cíclica na detecção e quantificação de TCA com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s durante 2 ciclos.



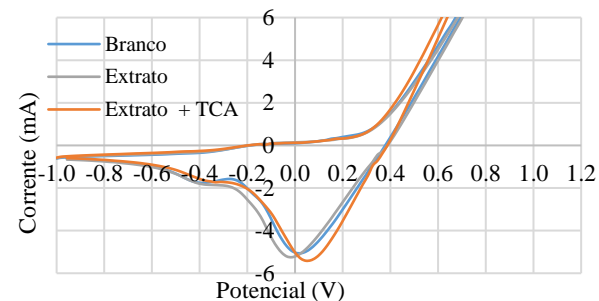
(a)



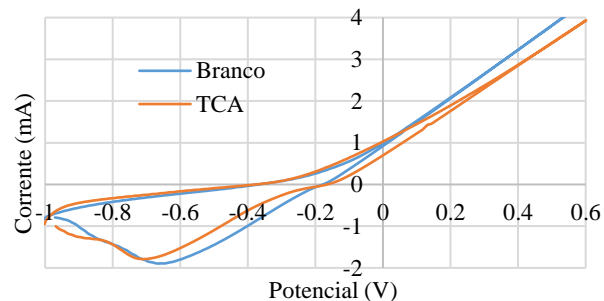
(b)



(c)



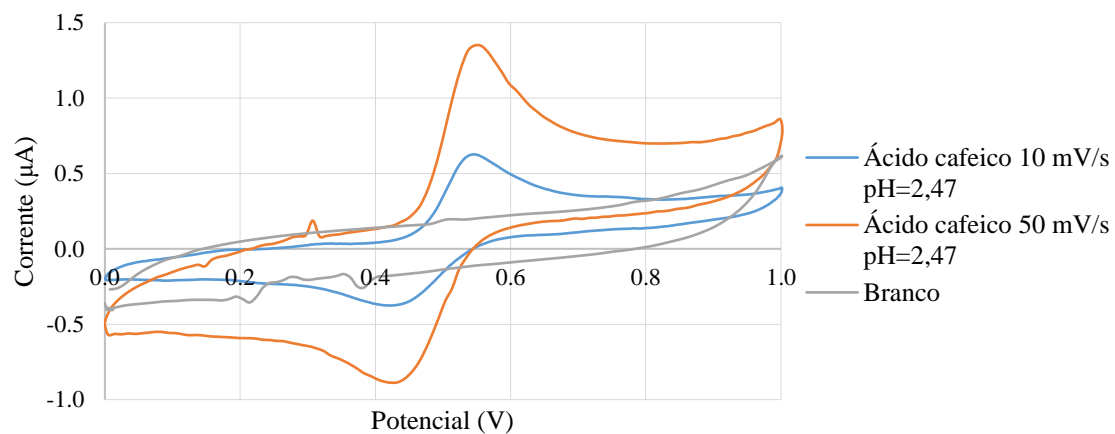
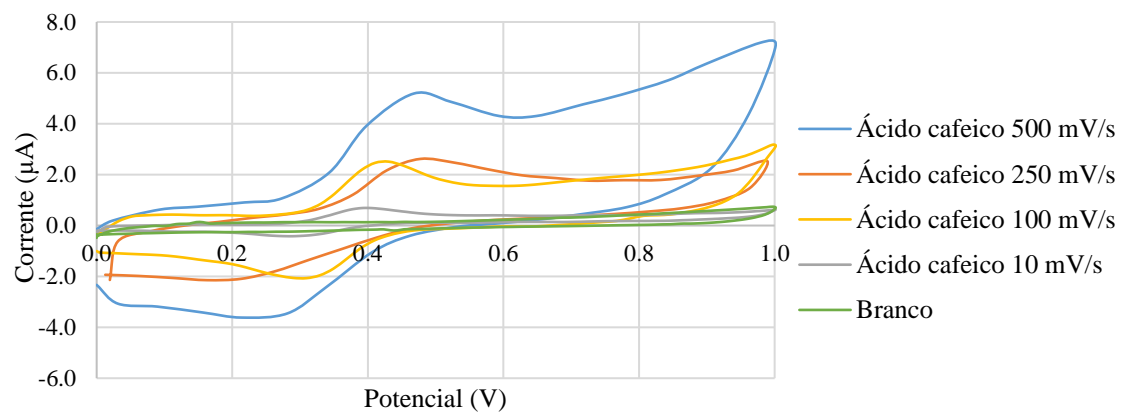
(d)



(e)

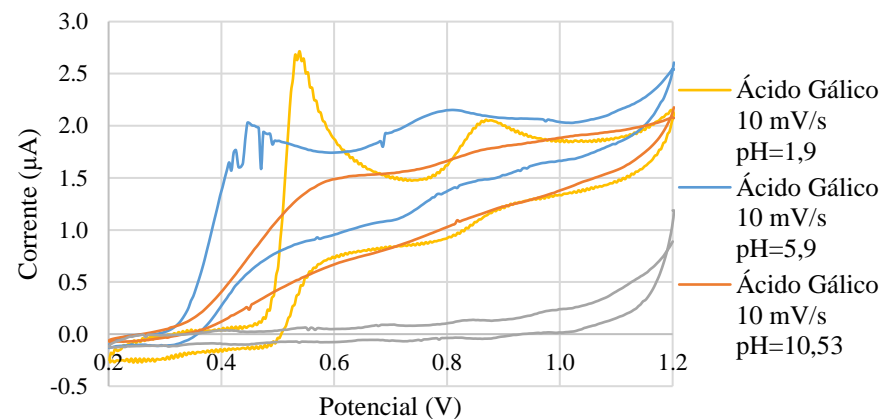
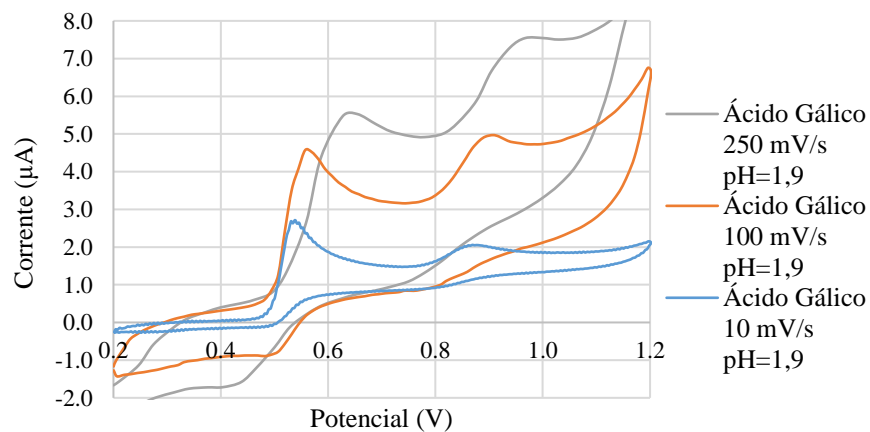
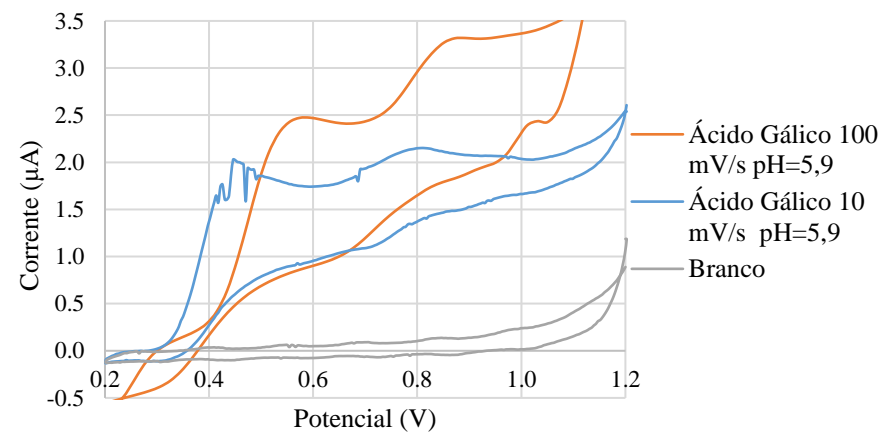
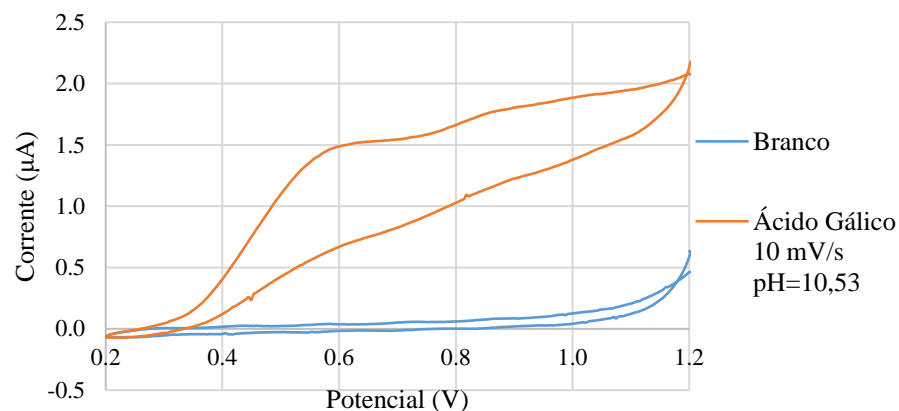
- (a) Voltamograma cíclico do padrão de TCA (10 mg/L) numa mistura de TBAP (0,1 M) em ACN/H₂O (3:2) entre -1 V a 0,6 V com elétrodo de Prata (ET).
- (b) Voltamograma cíclico do padrão de TCA (10 mg/L) em ACN/H₂O (5:2) numa mistura de TBAP (0,1 M) em ACN/H₂O (5:2) entre -1 V a 0,6 V com elétrodo de Prata (ET).
- (c) Voltamograma cíclico do padrão de TCA (0,5 mg/L) em ACN/H₂O (5:2) numa mistura de TBAB (0,1 M) em ACN/H₂O (5:2) entre -1 V a 0,6 V com elétrodo de Prata (ET).
- (d) Voltamograma cíclico do padrão de TCA (50 mg/L) com extrato das rochas de cortiça (0,5 mL) numa mistura de TBAB (0,1 M) em ACN/H₂O (5:2) entre -1 V a 1,2 V com elétrodo de Prata (ET).
- (e) Voltamograma cíclico do padrão de TCA (10 mg/L) numa mistura de TBAP (0,1 M) em ACN/H₂O (3:2) entre -1 V a 0,6 V com elétrodo de cobre (ET).

Anexo 4: Testes realizados por voltametria cíclica na detecção do polifenol ácido cafeico com uma concentração de 0,1 mM numa mistura HCl (0,1 M) /MeOH (88/12) a diferentes valores de pH e velocidades de varrimento. Este polifenol está em geral presente nos extratos de cortiça.

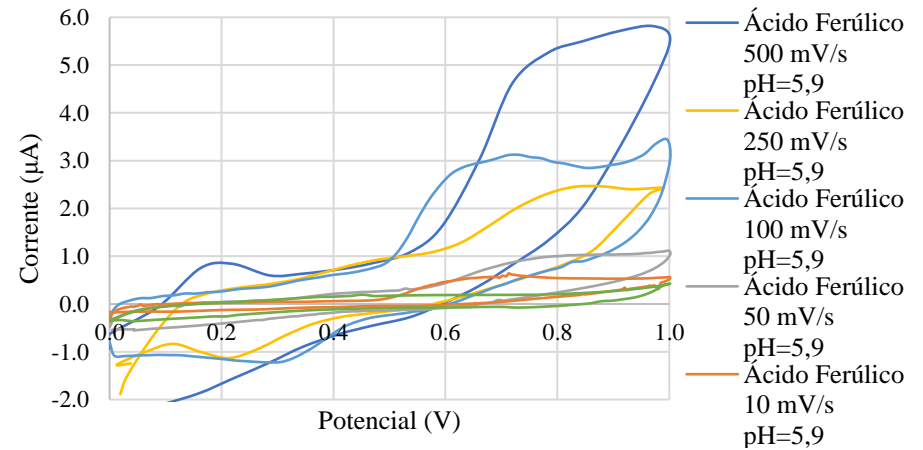
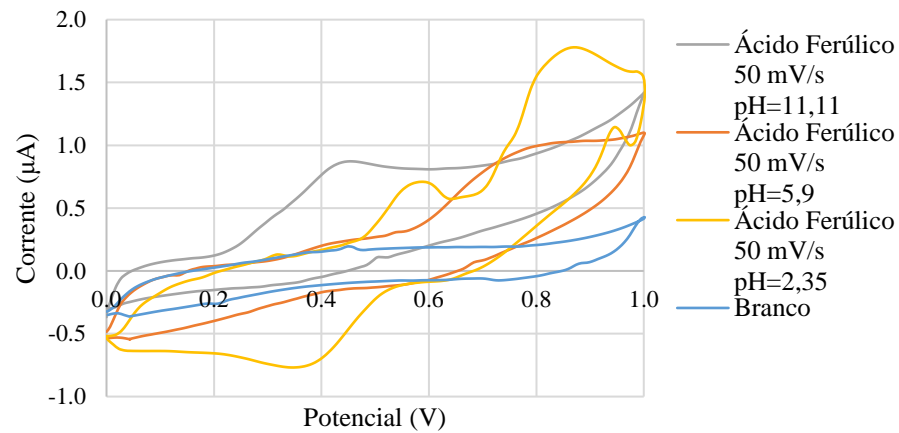
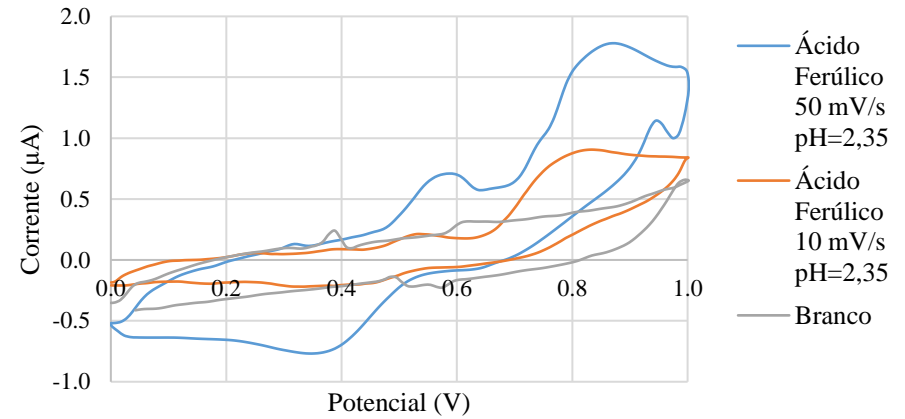
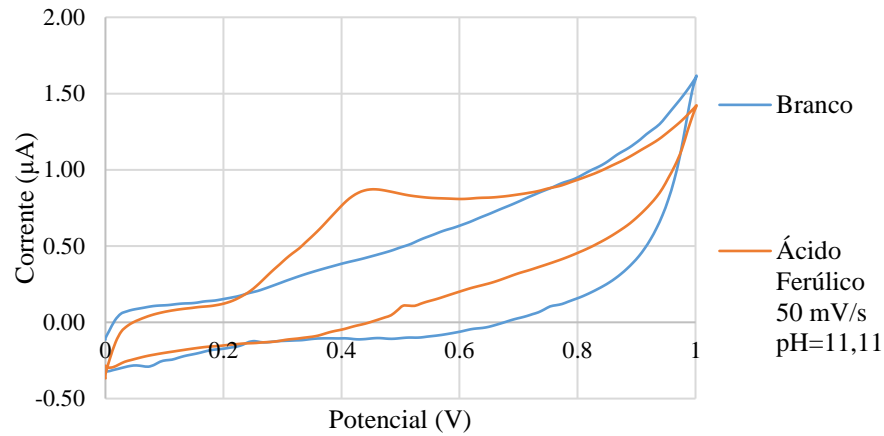


Anexo 5: Testes realizados por voltametria cíclica na detecção de polifenóis (Ácido Gálico e Ácido Ferúlico). Estes polifenóis estão em geral presentes nos extratos de cortiça.

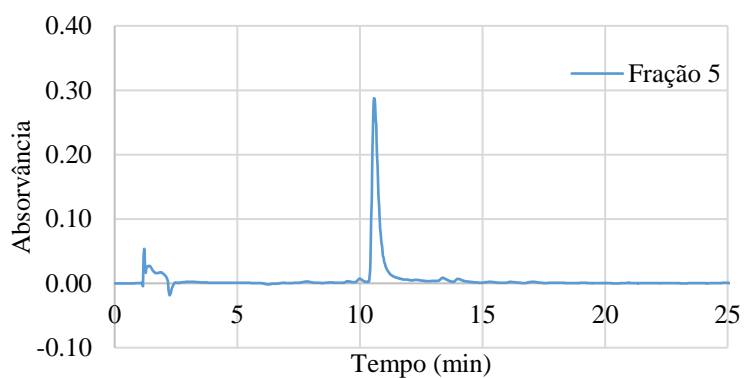
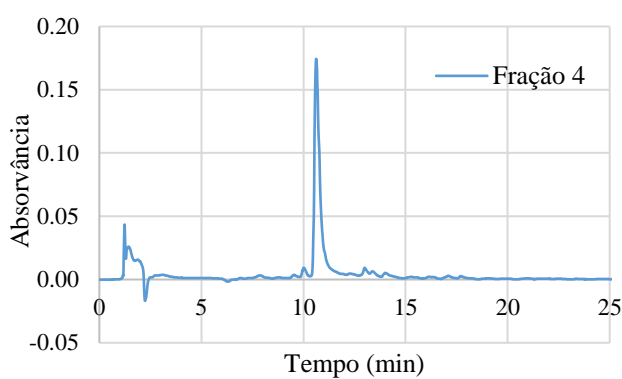
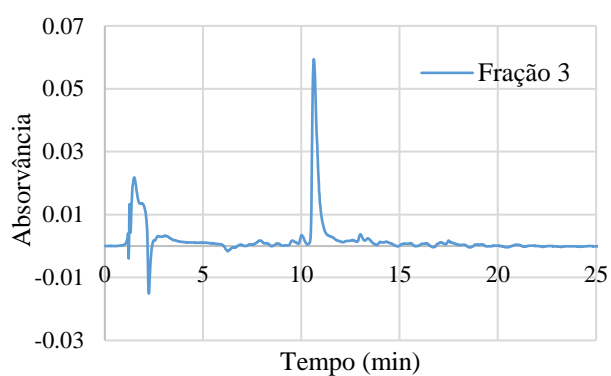
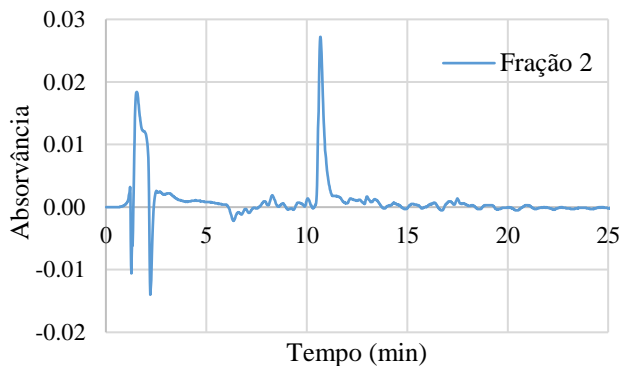
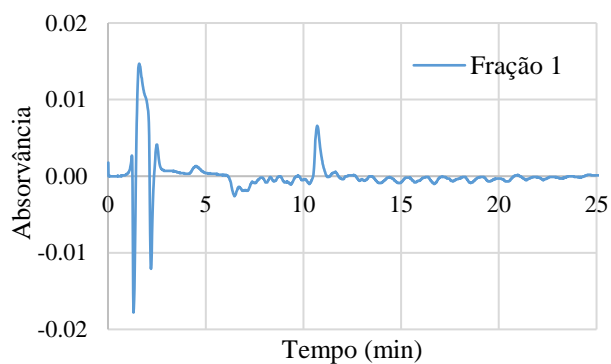
a) Ácido Gálico (0,475 mM) numa mistura de HCl (0,1 M)/MeOH (88/12) a diferentes valores de pH e velocidades de varrimento.



b) Ácido Ferúlico (0,1 mM) numa mistura de HCl (0,1 M)/MeOH (88/12) a diferentes valores de pH e velocidades de varrimento.

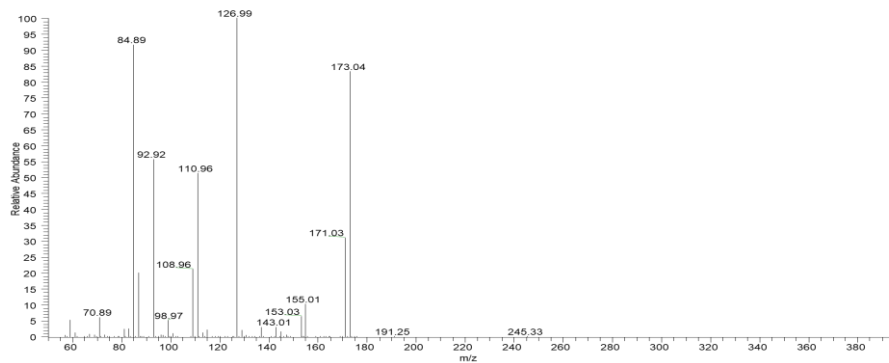
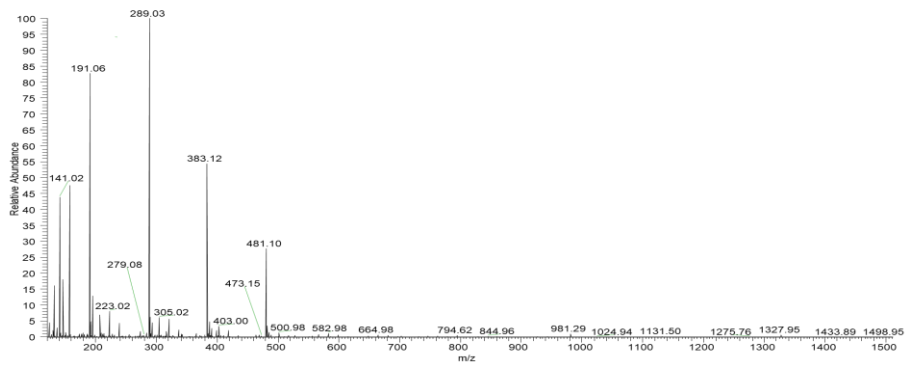
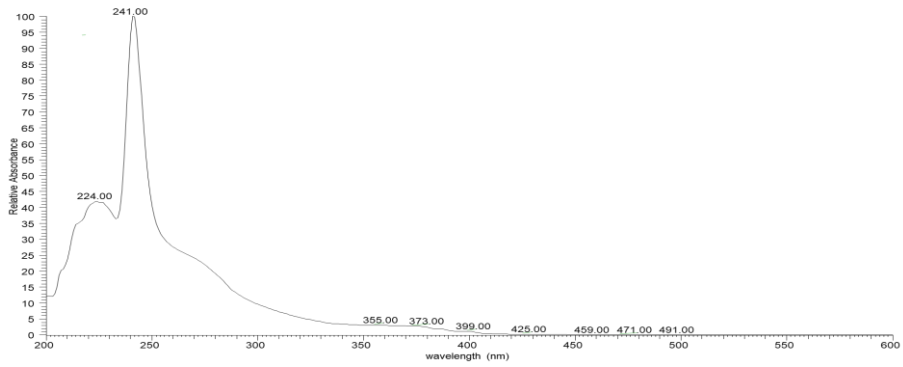
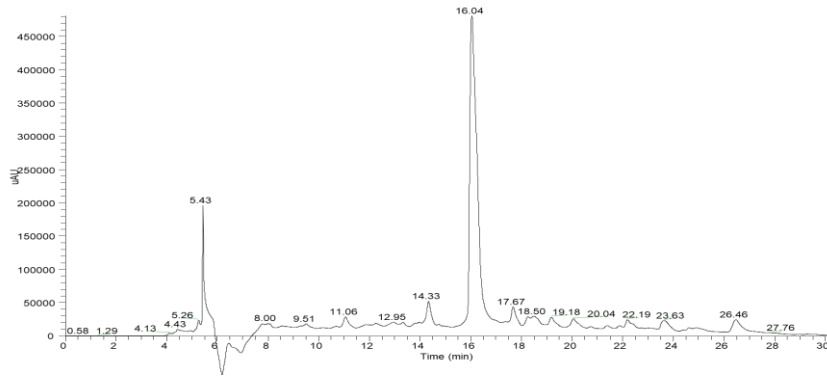


Anexo 6: Cromatogramas correspondentes à análise por HPLC gradiente das restantes frações. Estas frações foram obtidas através do processo de dessorção do extrato de cortiça anteriormente retido no MIP_7.

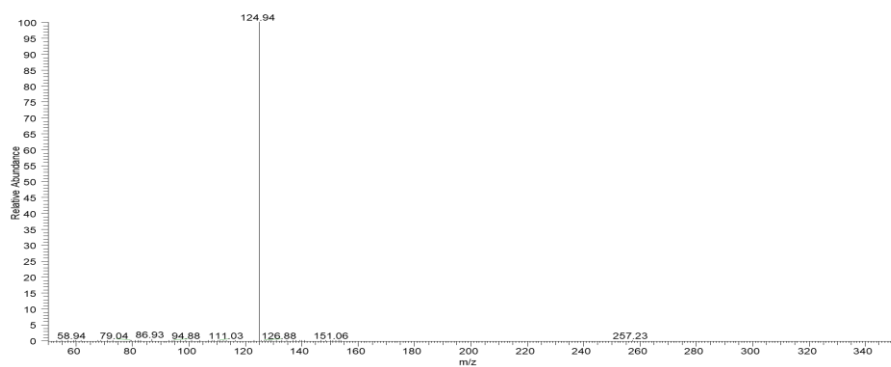
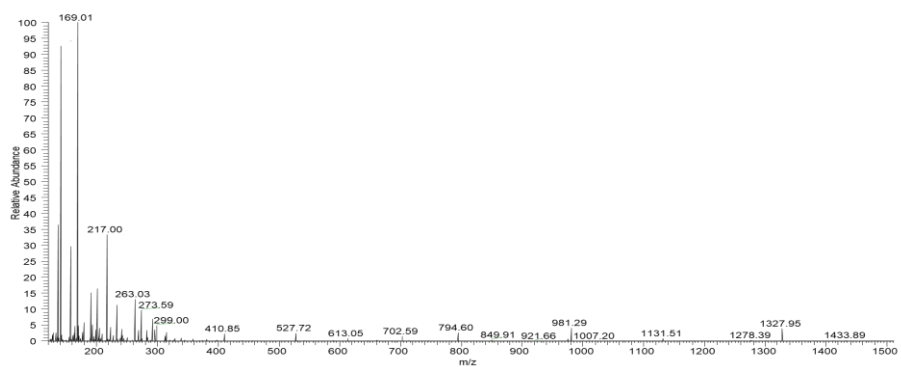
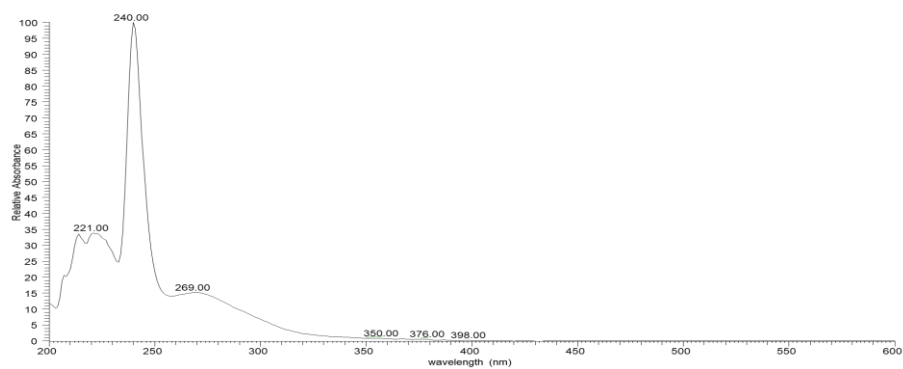
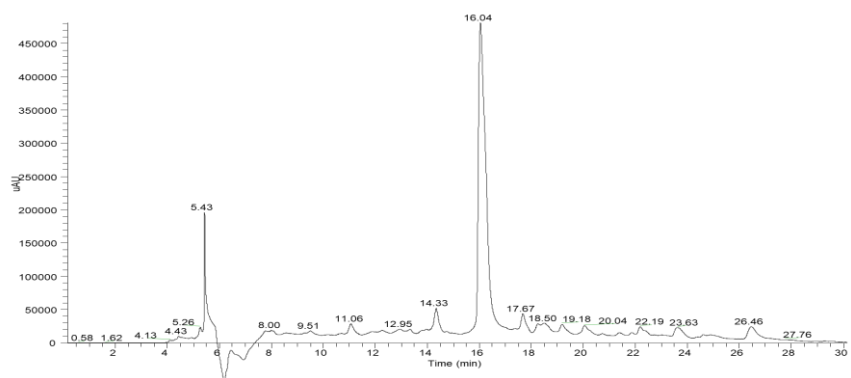


Anexo 7: Cromatogramas correspondentes à análise por LC-MS do extrato de granulado de cortiça obtido por soxhlet. São aqui apresentados dados adicionais para identificação de compostos fenólicos presentes nesse extrato de cortiça.

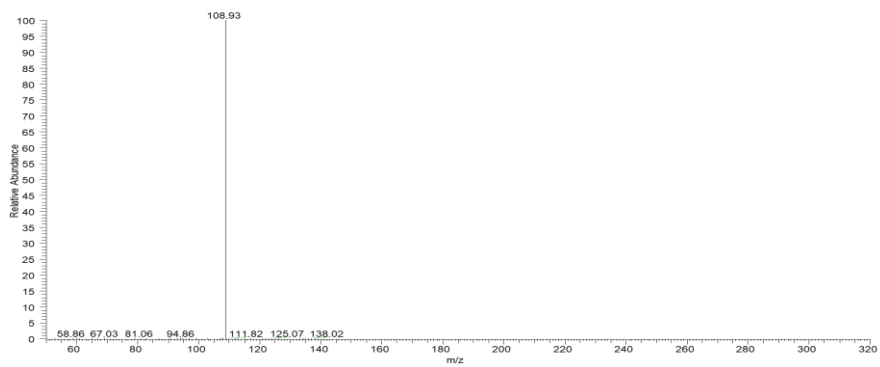
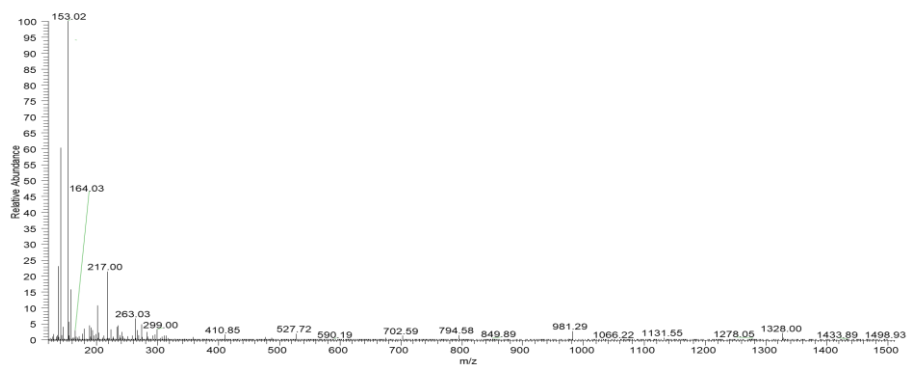
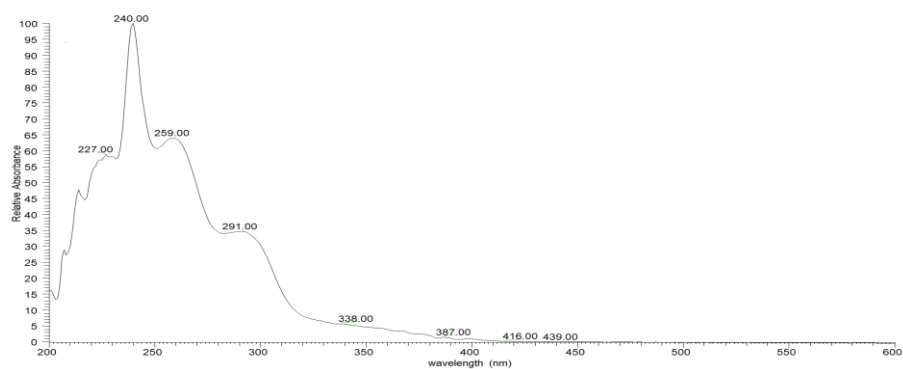
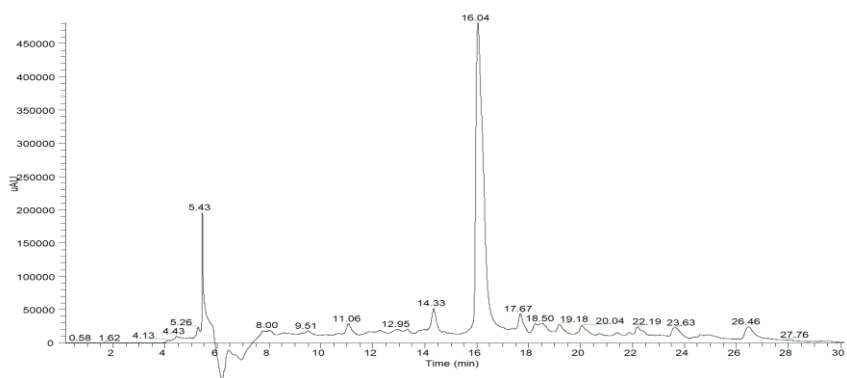
a) Ácido Quínico



b) Ácido Gálico



c) Ácido Protocatecuico



d) Ácido Cafeico

