



Purificação e Fracionamento de Polifenóis contidos em subprodutos de Amêndoa com adsorventes Molecularmente Impressos

Cláudia Filipa Duarte Martins

Dissertação Final apresentada na
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança

Para obtenção do grau de mestre em
Engenharia Química

Dezembro 2020

**Purificação e Fracionamento de Polifenóis contidos em
subprodutos de Amêndoa com adsorventes Molecularmente
Impressos**

Cláudia Filipa Duarte Martins

Dissertação Final apresentada na
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança

Para obtenção do grau de mestre em
Engenharia Química

Orientado por
Professor Doutor Rolando Carlos Pereira Simões Dias

Dezembro 2020

“No matter where,”

Agradecimentos

Depois de um longo caminho percorrido, chegou a hora de concluir mais uma etapa. Seria egoísta da minha parte não incluir nela quem sempre me ajudou nesta caminhada e a quem nunca desistiu de me recordar das minhas capacidades, sem nunca me deixarem desistir.

Dito isto, queria expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Professor Doutor Rolando Pereira Simões Dias, pela oportunidade de realizar esta dissertação com a sua orientação, pelos conhecimentos científicos transmitidos, pela disponibilidade, pelo apoio incondicional e pela motivação dada ao longo da realização deste trabalho, o meu mais sincero obrigado, não poderia ter escolhido melhor orientador.

Agradeço à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) e ao FEDER no âmbito do Programa PT2020 pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020).

À Catarina Gomes, agradeço por transmitir todos os seus conhecimentos, pela ajuda, pela paciência e sobretudo pela amizade. Ao Amir Bzainia, por estar sempre disponível em ajudar, pelas conversas sobre assuntos aleatórios. A todos os meus colegas do LSRE pelo apoio prestado, assim como às responsáveis dos laboratórios de Química Analítica e Processos Químicos, Engenheira Paula Plasencia e Engenheira Maria João Afonso pela sua disponibilidade na utilização dos equipamentos.

Aos meus amigos e companheiros de casa Diana Costa, João Pinto, Christopher Gonçalves, pela amizade, pelas conversas, pela motivação, por todos estes anos de folia.

Às minhas amigas da minha terra Natal, mais conhecidas pelas minhas “*pinez*”, Daniela Costa, minha prima, um dos meus pilares, Cindy Almeida uma amiga verdadeira e de longa data, obrigado por tudo, pelo carinho, pelo amor, pela amizade, pela motivação e por sempre acreditarem em mim. Ao meu amigo Carlos Lourenço que também contribuiu sempre para o meu sucesso.

Ao Tiago Vila Franca, que sempre me incentivou, que todos os dias me lembrava que tinha um mestrado para acabar, pelo amor, pela amizade, pelo carinho, pela ajuda e por acreditar em mim sempre.

À minha Amiga Cristina Duarte, Amiga esta com “A” grande, que vou sempre levar no coração, obrigado por tudo, pelas quase 24h/24h de companhia, pelas horas infinitas passadas no laboratório, pela disponibilidade em ajudar, pela paciência em dias menos bons, pela boa

disposição contagiante, pela motivação, por seres o meu lembrete e sobretudo pela tua amizade que levo para a vida.

A alguém especial que apesar de tudo ao longo deste tempo me fez ter um sorriso e uma boa disposição contagiante, motivando-me assim todos os dias para este desafio.

Por último e não menos importante, aos meus pais e ao meu irmão, os meus verdadeiros pilares, que sempre me apoiaram e motivaram, que nunca me deixaram desistir, pelos ensinamentos e educação que me deram, pela amizade, amor, e confiança, a vocês estarei grata eternamente. Aos meus avós que sem eles nada disto teria sido possível, às minhas tias e primos pelo apoio incondicional que nunca irei esquecer, um agradecimento especial à minha tia Sofia Campos, que é como se fosse uma irmã mais velha. A vocês todos amo-vos de coração.

Obrigada.

Resumo

Neste trabalho foi realizada a avaliação de adsorventes molecularmente impressos para a concentração, fracionamento e purificação de polifenóis contidos em extratos de subprodutos da amêndoa. Foram considerados doze materiais sintetizados em condições diferentes no que respeita à presença de moléculas molde de polifenóis, composição química e técnica de polimerização (precipitação e suspensão inversa). Os testes realizados incluíram também resinas comerciais geralmente utilizadas para recuperar polifenóis presentes em extratos vegetais, nomeadamente os adsorventes DAX-8, XAD4 e XAD7HP.

Foram produzidos diferentes extratos de subprodutos de amêndoa, nomeadamente extratos de casca de amêndoa (*shell*) em etanol/água 80/20, acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 e acetato de etilo/etanol 50/50, extratos de casca verde de amêndoa (*hull*) em etanol/água 80/20 e um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa (*blanching*). Procurou-se assim explorar diferentes possibilidades para a valorização dos subprodutos através da variação do perfil dos extratos em compostos fenólicos.

Realizaram-se testes de retenção dos polifenóis presentes nos diversos extratos considerando múltiplos adsorventes. Foi demonstrada a elevada capacidade dos materiais contendo o monómero funcional 4-vinilpiridina para reter polifenóis presentes em extratos de natureza muito diferente. Este facto decorre da forte interação entre os grupos piridil presentes nessas redes de polímero e as moléculas de alvo. Os resultados obtidos mostram que os adsorventes baseados 4-vinilpiridina podem ser usados para projetar novos processos de adsorção/desorção visando a valorização eficiente e sustentável dos polifenóis presentes em subprodutos de amêndoa.

Foi estudada a dinâmica de adsorção de polifenóis considerando processos fechados e processos contínuos. Estes estudos visaram avaliar em pequena escala a potencialidade dos adsorventes para serem considerados em processos industriais de valorização dos subprodutos de amêndoa. Devido ao bom desempenho combinado em diferentes condições de operação testadas, nestes estudos foi usado como referência um polímero molecularmente impresso com rotina como polifenol molde e obtido por polimerização em suspensão inversa. Através de adsorção/desorção demonstrou-se a possibilidade efetiva de concentrar, fracionar e realizar a mudança de solvente para polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa com obtenção de uma fração enriquecida em isoramnetina-3-O-rutinose.

Palavras chave: Impressão Molecular, Adsorventes, Polifenóis, Subprodutos de Amêndoa, Bioeconomia Circular

Abstract

This work was devoted to the assessment of molecularly imprinted adsorbents for the concentration, fractionation and purification of polyphenols contained in extracts from almond by-products. Twelve materials synthesized in different conditions concerning the presence of template polyphenol molecules, chemical composition and polymerization technique (precipitation and inverse suspension) were considered within this purpose. Moreover, commercial synthetic resins often used to recover polyphenols from plant extracts were also included in the assessment work, namely the DAX-8, XAD4 and XAD7HP materials.

Different extracts from almond by-products were produced, specifically almond shell extracts in ethanol/water 80/20, acetonitrile/dimethylformamide 50/50 and ethyl acetate/ethanol 50/50, almond hull extracts in ethanol/water 80/20 and the aqueous extract resulting from the almond blanching process. In this way, different possibilities for the valorization of almond by-products were explored through the change of the phenolic profile of the extracts.

The retention of the polyphenols present in the diverse extracts was evaluated considering multiple adsorbents. It was demonstrated the high capacity of the materials containing the functional monomer 4-vinylpyridine for the retention of polyphenols contained in extracts of very different natures. This outcome is a consequence of the strong interaction between the pyridyl groups present in these polymer networks and the target molecules. The results obtained shown that the adsorbents based on 4-vinylpyridine can be used to design new adsorption/desorption processes aiming at the efficient and sustainable valorization of the polyphenols contained in almond by-products.

The dynamics of adsorption of polyphenols was studied considering batch and continuous processes. These runs aimed at the small scale evaluation of the potentialities of the adsorbents to be used in industrial processes for the valorization of almond by-products. Due to the good combined performance evidenced at different working conditions, a molecularly imprinted polymer, synthesized with rutin as template polyphenol and using inverse suspension polymerization, was considered as reference. Using sorption/desorption, was demonstrated the effective possibility for concentration, fractionation and solvent change for polyphenols contained in almond by-products and a fraction enriched with isorhamnetin-3-O-rutinoside was obtained.

Keywords: Molecular Imprinting, Adsorbents, Polyphenols, Almond By-products, Circular Bioeconomy

Índice Geral

Agradecimentos	IV
Resumo	VI
Abstract	VII
Capítulo 1	1
1. Introdução	1
1.1. Principais objetivos	2
1.2. Organização da Dissertação	5
Capítulo 2	7
2. Amêndoa	7
2.1. Composição Química	9
2.2. Compostos dos subprodutos da amêndoa	11
2.2.1. Película interior da amêndoa	12
2.2.2. Casca exterior	13
2.2.3. Casca Verde	13
2.3. Polifenóis	14
2.4. Flavonoides	16
2.4.1. Quercetina	18
2.4.2. Rutina	19
2.5. Técnicas de extração	20
2.5.1. Soxhlet	20
2.5.2. Ultrassons	21
2.6. Técnica de adsorção	22
2.7. Extração fase sólida (SPE)	23
Capítulo 3	25
3. Polímeros molecularmente impressos (MIPs)	25
Capítulo 4	28
4. Materiais e equipamentos	28
4.1. Reagentes usados na síntese dos MIPs	28
4.2. Reagentes utilizados na quantificação de polifenóis através de HPLC	30
4.3. Equipamentos	33
4.3.1. HPLC cromatografia líquida de alta eficiência	33
4.3.2. UV-vis Ultravioleta visível	34
4.3.3. Outros equipamentos	36
4.4. Estudos experimentais	36
4.4.1. Procedimento experimental	37

4.4.1.1.	Extração em diferentes solventes através de <i>Soxhlet</i> e <i>blanching</i>	37
4.4.1.2.	Síntese de MIPs e NIPs, respectiva lavagem/secagem.....	38
4.4.1.3.	SPE (Extração em fase sólida).....	42
4.4.1.4.	Operação em <i>Batch</i>	43
4.4.1.5.	Operação em contínuo	44
Capítulo 5	46
5.	Resultados e Discussão	46
5.1.	Racional considerado na síntese de adsorventes molecularmente impressos	46
5.2.	Análise de extratos de subprodutos da amêndoa por HPLC com sistema de díodos (HPLC-DAD).....	50
5.3.	Testes de retenção de polifenóis com extratos da casca exterior da amêndoa (<i>shell</i>) em etanol/água 80/20	57
5.4.	Testes de retenção de polifenóis com extratos da casca verde da amêndoa (<i>hull</i>) em etanol/água 80/20	59
5.5.	Testes de retenção de polifenóis com extratos aquosos do branqueamento da amêndoa (<i>blanching</i>).....	60
5.6.	Testes de retenção de polifenóis com extratos da casca exterior da amêndoa (<i>shell</i>) em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50	61
5.7.	Testes de retenção de polifenóis com extratos da casca exterior da amêndoa (<i>shell</i>) em acetato de etilo/etanol 50/50	63
5.8.	Dinâmica de adsorção de polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa considerando processos fechados e processos contínuos.....	65
5.9.	Concentração, purificação e fracionamento de polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa	67
Capítulo 6	71
6.	Conclusão	71
Referências bibliográficas:	74
Apêndice	a

Índice de Figuras

Figura 1: Amendoeira em flor (http://beiramedieval.blogspot.com/2007/06/associacao-amigos-da-amendoeira-celebra.html).....	7
Figura 2: Produção a nível Nacional de amêndoa (INE,2018)	8
Figura 3: Gráfico relativo à área de produção de amendoal em Trás-os-Montes, relativo ao ano de 2017(Centro Nacional de Competências dos Frutos Secos, Amêndoa Estudo de produção e comercialização nas terras de Trás-os-Montes).....	8
Figura 4: Estrutura dos principais flavonoides presentes na amêndoa. (Determination of Flavonoids and Phenolics and Their Distribution in Almonds, 2006).....	10
Figura 5: Partes da amêndoa (https://www.mdpi.com/1420-3049/22/10/1774/htm)	11
Figura 6: Processo de obtenção dos subprodutos da amêndoa, na indústria da amêndoa.	12
Figura 7: Casca verde da amêndoa.	14
Figura 8: Estrutura química dos flavonóides.	16
Figura 9: Estrutura das 10 principais classes de flavonóides.....	17
Figura 10: Estrutura química da quercetina, molécula alvo desta investigação.	19
Figura 11: Estrutura molecular da Rutina, molécula alvo desta investigação.	20
Figura 12: Montagem de extração Soxhlet.	21
Figura 13: MIP_Querc_1 quando levado ao ultrassons.	22
Figura 14: Extração fase sólida SPE.	24
Figura 15: Representação esquemática da preparação do MIP da quercetina.	26
Figura 16: Registo fotográfico do equipamento HPLC (high performance liquid chromatography) usado ao longo deste trabalho.	34
Figura 17: Registo fotográfico do equipamento UV-vis Ultravioleta visível.....	35
Figura 18: Extração em Soxhlet do shell em Acetonitrilo/Dimetilformamida (50/50)	38
Figura 19: Pesagem do shell no cartucho de fibra de vidro.	38
Figura 20: Registo fotográfico da última etapa de síntese do MIP_Querc_1, com uma T=60°C	39
Figura 21: MIP_Rut_1 e NIP3 após lavagem e secagem.	40
Figura 22: Registo fotográfico da síntese do MIP_Querc_2, obtido por suspensão inversa, em que a fase do monómero é adicionada à fase óleo, que se encontra num banho de parafina a T= 60°C.....	41
Figura 23: Primeira etapa dos elutions (água) dos MIP_Pol_2, MIP_Rut_2 e DAX-8.....	44

Figura 24: Simulação da operação em batch no MIP_Pol_2 com blanching	44
Figura 25: Simulação da operação em contínuo, com o MIP_Rut_2 sendo alimentado por blanching.	45
Figura 26: Análise por LC-DAD-ESI/MSn de um extrato de casca de amêndoa [38] indicando a presença de polifenóis como a quercetina e a rutina, entre outros.	50
Figura 27: Análise HPLC-DAD do padrão de ácido gálico para comparação com o perfil fenólico observado em extratos de subprodutos de amêndoa.	52
Figura 28: Análise HPLC-DAD do padrão de catequina para comparação com o perfil fenólico observado em extratos de subprodutos de amêndoa.	52
Figura 29: Análise HPLC-DAD do padrão de rutina para comparação com o perfil fenólico observado em extratos de subprodutos de amêndoa	53
Figura 30: Análise HPLC-DAD do padrão de quercetina para comparação com o perfil fenólico observado em extratos de subprodutos de amêndoa.	53
Figura 31: Análise HPLC-DAD do extrato de casca de amêndoa (shell) em etanol/água 80/20 produzido neste trabalho.	54
Figura 32: Análise HPLC-DAD do extrato aquoso do branqueamento da amêndoa produzido neste trabalho.....	55
Figura 33: Análise HPLC-DAD do extrato de casca verde de amêndoa (hull) em etanol/água 80/20 produzido neste trabalho.	55
Figura 34: Análise HPLC-DAD do extrato de casca de amêndoa (shell) em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 produzido neste trabalho.	56
Figura 35: Análise HPLC-DAD do extrato de casca de amêndoa (shell) em acetato de etilo/etanol 50/50 produzido neste trabalho.	56
Figura 36: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-2.	58
Figura 37: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos etanol/água 80/20 de casca exterior da amêndoa (shell).....	59
Figura 38: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos etanol/água 80/20 de casca verde da amêndoa (hull).....	60
Figura 39: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos aquosos do branqueamento da amêndoa (blanching).	61
Figura 40: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 de casca exterior da amêndoa (shell).....	62

Figura 41: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos acetato de etilo/etanol 50/50 de casca exterior da amêndoa (shell).....	64
Figura 42: Dinâmica de adsorção observada experimentalmente no processamento de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa em tanque fechado com os materiais DAX8, MIP-POL-2 e MIP-RUT-2. Condições de operação: massa de adsorvente $m=1$ g e volume de fase líquida no tanque $V=25$ mL. Absorção UV medida a 280 nm.	66
Figura 43: Dinâmica de adsorção observada experimentalmente no processamento de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa em coluna SPE com os materiais DAX8, MIP-RUT-2 e MIP-QUER-1. Operação com 200 mg de cada adsorvente na coluna SPE e absorção UV medida a 280 nm	66
Figura 44: Dinâmica de adsorção observada experimentalmente no processamento de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa em tanque contínuo com o material MIP-RUT-2. Condições de operação: caudal de processamento $Q=1$ mL/min, massa de adsorvente $m=1$ g e volume de fase líquida no tanque $V=25$ mL.	67
Figura 45: Análise HPLC-DAD de uma fração recolhida em metanol/ácido acético 90/10 após saturação do adsorvente MIP-RUT-2 com um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa.	69
Figura 46: Análise HPLC-DAD de uma fração recolhida em metanol/ácido acético 90/10 após saturação do adsorvente MIP-RUT-2 com um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa. É também apresentada a análise HPLC-DAD do extrato original. Absorção UV a 280 nm.....	69
Figura 47: Análise HPLC-DAD de uma fração recolhida em metanol/ácido acético 90/10 após saturação do adsorvente MIP-RUT-2 com um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa. É também apresentada a análise HPLC-DAD do extrato original. Absorção UV a 320 nm.....	70
Figura 48: Análise HPLC-DAD de uma fração recolhida em metanol/ácido acético 90/10 após saturação do adsorvente MIP-RUT-2 com um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa. É também apresentada a análise HPLC-DAD do extrato original. Absorção UV a 380 nm.....	70

Índice de Esquemas

Esquema 1: Plano deste trabalho.....	4
--------------------------------------	---

Índice de tabelas

Tabela 1: Flavonóides e ácidos fenólicos já identificados na amêndoa. (Determination of Flavonoids and Phenolics and Their Distribution in Almonds, 2006)	18
Tabela 2: Reagentes utilizados no processo de síntese de polímeros molecularmente impressos	28
Tabela 3: Reagentes utilizados na quantificação de polifenóis.....	30
Tabela 4: Descrição dos equipamentos utilizados ao longo deste trabalho.....	36
Tabela 5: Extratos produzidos em diferentes solventes.	37
Tabela 6: Condições utilizadas na produção de adsorventes molecularmente impressos desenvolvidos nesta investigação ou anteriormente sintetizados pelo grupo onde se realizou este trabalho.....	49

Lista de Apêndice

Apêndice A: Análises por HPLC-DAD de extratos de casca exterior de amêndoa (<i>shell</i>) em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais.....	b
Apêndice B: Análises por HPLC-DAD de extratos de casca verde de amêndoa (<i>hull</i>) em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais.....	i
Apêndice C: Análises por HPLC-DAD de extratos aquosos do branqueamento da amêndoa (<i>blanching</i>) antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais.....	p
Apêndice D: Análises por HPLC-DAD de extratos de casca exterior de amêndoa (<i>shell</i>) em acetoneitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais.....	w
Apêndice E: Análises por HPLC-DAD de extratos de casca exterior de amêndoa (<i>shell</i>) em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais.....	cc

Lista de Abreviaturas

4VP – 4-vinilpiridina

ACN – Acetonitrilo

AIBN – 2,2'-azo-bis-isso-butironitrilo

AN – Acrilonitrilo

DI – Água desionizada

DMF – N,N-dimetilformamida

EGDMA – Etileno glicol dimetacrilato

EtOH – Etanol

HAc – Acido Acético

HCl – Ácido Clorídrico

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

MeOH – Metanol

MIP's – Polímeros molecularmente impressos

Nip's- Polimeros s/impressão molecular

SPE – Extração com fase sólida

Span-80 – Polisorbato 80

UV – vis – Ultravioleta visível

Capítulo 1

1. Introdução

A amêndoa (*Prunus dulcis*), caracterizada pelo seu delicioso sabor, textura e valor nutricional é mundialmente consumida já desde a antiguidade. Em Portugal, nomeadamente em Trás-os-Montes e Algarve [1], a produção deste fruto seco tem um papel económico e cultural bastante importante. A amêndoa é um produto muito versátil, pode ser consumida com ou sem película (pele), sendo que a maior parte dos seus subprodutos são descartados para produzir energia ou para alimentação de animais. É um alimento rico em polifenóis, que contribuem para a qualidade do fruto. Os polifenóis, são compostos bioativos presentes em matrizes vegetais, que devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias proporcionam efeitos benéficos na saúde humana, como prevenção de doenças cardiovasculares, antienvelhecimento e anticancerígenas. Devido aos benefícios dos polifenóis presentes na amêndoa, estudos demonstram eficácia em doenças cardiovasculares proveniente do consumo de amêndoa. Os polifenóis presentes na amêndoa, estão concentrados na interface lipídica que contribuem para a cor da amêndoa e melhoram a sua vida útil devido à atividade antioxidante e antimicrobiana [2]. Durante o processo de colheita da amêndoa, a maior parte dos subprodutos, como a casca verde, a casca exterior e a película interior, são descartados. A valorização destes subprodutos é de todo importante, devido à presença significativa de polifenóis. O conteúdo fenólico total dos extratos etanólicos da casca verde e da película interior, é nove a dez vezes maior que o conteúdo fenólico presente na amêndoa [3]. A composição fenólica da película interior da amêndoa ainda não foi exaustivamente estudada, devido à sua complexidade estrutural, tem um valor económico muito baixo, mas representa $\pm 4\%$ do peso total da amêndoa, contendo 70–100% do total de fenóis presentes na amêndoa. Nos últimos tempos, têm sido estudados estes subprodutos de maneira a serem valorizados como fontes de compostos com propriedades antioxidantes podendo ser utilizadas para controlar o processo oxidativo na indústria de alimentos ou como ingredientes funcionais para a elaboração de suplementos nutricionais [4]. Como referido anteriormente, os subprodutos são portadores de polifenóis, nos quais estão presentes flavonoides e não-flavonoides. Dentro dos flavonoides os compostos maioritários são a quercetina e a rutina. A película interior da amêndoa, é industrialmente removida através de um processo denominado *blanching*. Este processo consiste em colocar a amêndoa com a

película interior em água fervente durante breves instantes, sendo depois essa água descartada. A elevada quantidade de compostos fenólicos presentes na película interior da amêndoa, torna-se um fator importante para a comunidade científica e ambiental na caracterização e identificação dos polifenóis presentes na água resultante do processo de *blanching*.

A extração de compostos fenólicos das matrizes vegetais é geralmente realizada através de técnicas de extração convencionais nomeadamente extração Soxhlet, extração por ultrassom e extração usando condições supercríticas. Neste trabalho, apenas será abordada a técnica de extração por Soxhlet e ultrassom.

Os polímeros molecularmente impressos (MIPs), são redes de polímeros que apresentam reconhecimento molecular para uma determinada molécula. Como já foi comprovado em trabalhos anteriores, realizados pelo nosso grupo de investigação [5], o uso destes materiais na retenção e purificação de compostos fenólicos mostrou-se bastante eficiente. Assim, no sentido de valorizar os compostos fenólicos presentes nos subprodutos da amêndoa, os MIPs serão assim utilizados como adsorventes. A sua eficácia será comprovada por cromatogramas obtidos através de HPLC. Como método de comparação, serão utilizados adsorventes comerciais, de maneira a analisar as potenciais vantagens dos MIPs nestes processos. De facto, espera-se uma maior eficiência na purificação e concentração de polifenóis através do uso de adsorventes molecularmente impressos. A introdução de funcionalidade (ex. através de grupos de 4-vinilpiridina), a criação de cavidades com especificidade para a molécula alvo e a modificação da morfologia são potenciais vantagens dos MIPs relativamente a outros adsorventes de uso geral não projetados de forma particular. O desenvolvimento dos MIPs para estes processos de adsorção poderá contribuir para a sua simplificação e sustentabilidade, com redução da pegada ecológica (ex. diminuindo da utilização de solventes orgânicos) e aumento da viabilidade económica (ex. reduzindo o consumo energético).

1.1. Principais objetivos

A presente dissertação será dedicada ao estudo da purificação e fracionamento de polifenóis presentes nos subprodutos da amêndoa. A extração destes subprodutos (casca verde e casca exterior) será feita em Soxhlet utilizando diferentes solventes, para o estudo da selectividade dos MIPs. Para a casca exterior (*shell*) foram utilizados os solventes etanol/água (80/20), acetato nitrilo/dimetilformamida 50/50 e acetato de etilo/etanol 50/50, relativamente à casca

verde (*hull*) o extrato foi feito em etanol/água 80/20, podendo estes serem aplicados diretamente. No caso da película interior a técnica de extração utilizada é o *blanching* onde o solvente utilizado foi a água, que deve ser filtrada devido a possíveis subprodutos existentes na pele da amêndoa.

Para valorizar os compostos fenólicos presentes nos subprodutos da amêndoa e de modo a diminuir os custos económicos e a pegada ecológica foram desenvolvidos MIPs como adsorventes, que serão comparados com os adsorventes comerciais (DAX-8, XAD4, XAD7HP).

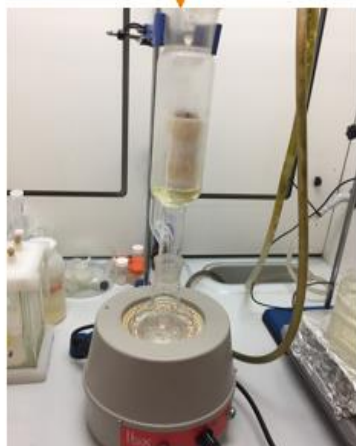
Numa segunda parte deste trabalho, foi criado um protótipo para a simulação de um processo industrial, sendo eles operação num processo contínuo e operação em tanque agitado.

Posterior à análise de todos os resultados será selecionado o material com melhor desempenho e serão identificados os compostos fenólicos nele presente. O esquema seguinte descreve superficialmente o objetivo deste trabalho.

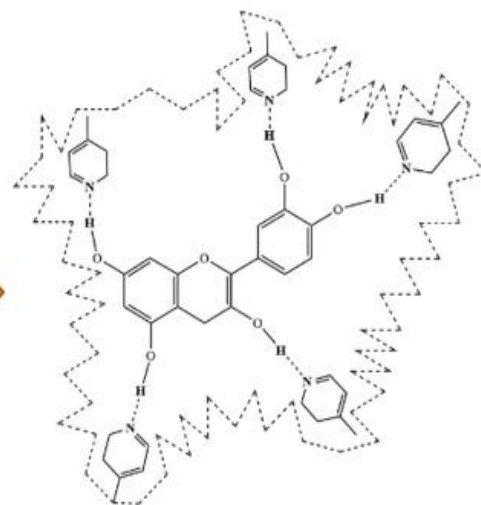


Molécula molecularmente impressa (Quercetina/4VP)

Extração com baixo teor de água



Adsorção direta com alta concentração de polifenóis



- ✓ Maior simplicidade no processo
- ✓ Maior flexibilidade no processo
- ✓ Maior eficiência no processo
- ✓ Maior seletividade

- Purificação
- Fracionamento
- Concentração

1.2. Organização da Dissertação

Esta dissertação está dividida em 6 capítulos. No primeiro capítulo consta uma breve introdução do tema abordado ao longo deste trabalho, bem como os objetivos pretendidos.

O segundo capítulo aborda a fundamentação teórica, onde se fala da amêndoa, dos seus subprodutos referindo as três cascas da amêndoa (*shell*, *hull*, *blanching*), das propriedades químicas de cada um dando uma introdução para os polifenóis. Nos polifenóis estão presentes as moléculas alvo escolhidas para este trabalho sendo elas a quercetina e a rutina. Também são abordadas 3 técnicas de extração, por *Sohxlet*, ultrassom e SPE.

No terceiro capítulo é dada uma introdução aos polímeros molecularmente impressos (MIPs), que foram sintetizados no laboratório com o objetivo de desenvolver um polímero para uma molécula alvo, tendo sido utilizados como adsorventes para fracionar, purificar e concentrar os compostos fenólicos presentes nos extratos dos subprodutos da amêndoa.

Relativamente ao quarto capítulo são descritos os reagentes, equipamentos e materiais utilizados na síntese dos MIPs, assim como em todas as operações ao longo deste trabalho. Também são dados a conhecer os procedimentos, da extração de compostos fenólicos por *sohxlet*, a técnica de *blanching*, extração em fase sólida (SPE), assim como a simulação das operações em *batch* e em contínuo.

No quinto capítulo são apresentadas as condições de síntese dos polímeros molecularmente impressos, é feita uma análise dos extratos dos subprodutos da amêndoa feitos em diferentes condições demonstrado através de gráficos provenientes do HPLC. São apresentados os resultados dos testes de retenção dos polifenóis nos extratos antes e após a adsorção em SPE e a eficiência de adsorventes baseados em 4VP na retenção de polifenóis. Por fim é referido um processo em *batch* onde o objetivo é concentrar, purificar e fracionar os compostos fenólicos presentes na água de branqueamento da amêndoa (*blanching*), fazendo uma adsorção/desorção. Foi feita uma saturação para posteriormente fazer uma desorção com seis solventes diferentes.

O sexto capítulo é constituído por alguns pontos conclusivos bem como sugestões para um trabalho futuro. Como mencionado anteriormente os MIPs sintetizados com o monómero 4VP demonstram uma elevada eficiência em reter polifenóis presentes nos

extratos de subprodutos da amêndoa mesmo tendo diferentes solventes. Os testes de adsorção realizados, permitiram confirmar que o MIP_RUT_2 é um adsorvente com um bom desempenho, este foi testado em SPE, operação contínua e em *batch*. Quando testada a concentração, purificação e fracionamento dos polifenóis presentes no extrato aquoso considerando o MIP_RUT_2, obteve-se uma fração mais purificada. A identificação de compostos fenólicos foi feita através do HPLC.

Capítulo 2

2. Amêndoa

A amêndoa, cujo nome científico é *Purnus dulcis*, pertence à família *Rosaceae*, provém de uma árvore (amendoeira) sendo popular pelo mundo inteiro devido à sua resistência ao clima e capacidade para resistir à falta de água [3], nasce dentro de três cascas, a primeira conhecida como casca verde (*hull*), a segunda é a casca exterior (*shell*) e a terceira é a película interior com uma tonalidade castanha. À amêndoa poderá dar-se o nome de *kernel* (núcleo).

A nível mundial a produção de amêndoa é dominada pela América do Norte. (59%), seguida pela Europa (15%), onde se destaca a Espanha como principal produtor Europeu (11%) [6]. Em Portugal, as condições climáticas são muito favoráveis e a produção da amêndoa (Figura 2) tem aumentado ao longo dos anos, primeiramente começou em Trás-os-Montes e no Algarve, e neste momento a produção já alastrou para as Beiras e Ribatejo [1]. A produção referente ao ano de 2018 foi de 21.642 toneladas sendo a área cultivada de 39.642 ha [6]. A amendoeira (Figura1) possui uma grande importância económica, ambiental, cultural e social, sendo que em Trás-os-Montes, tem muita importância económica devido a muitos produtores dependerem deste setor [7]. A figura 3 é relativa à área total de amendoal (19.206 ha) em Trás-os-Montes, dos amendoais de regadio e sequeiro [8]. Relativamente ao Alentejo a área de amendoal é de aproximadamente de 7750 ha [9].



Figura 1: Amendoeira em flor (<http://beiramedieval.blogspot.com/2007/06/associo-amigos-da-amendoeira-celebra.html>)

Estima-se que a produção de amêndoa deste ano possa alcançar 34 mil toneladas, um aumento de 55% face ao ano de 2019. Este aumento deve-se ao grande consumo nacional de amêndoa, relacionado com a importância de estilos de vida saudáveis e também ao aumento da área de amendoal [7]. Em relação às três cascas, são descartadas anualmente 2.546.321 toneladas das mesmas, estas representam 80% do peso do fruto e só a película interior é comestível, podendo as outras terem outras aplicações [6]. Em Portugal tendo em conta que a casca verde chega cada vez menos à indústria, visto que no processo de colheita as máquinas fazem a separação deixando-as no campo, estima-se 2000 toneladas da mesma, já a película interior são estimadas entre 108 e 144 toneladas, sendo que referente ao ano de 2017 foram descartadas 9.000 toneladas de casca exterior [9].

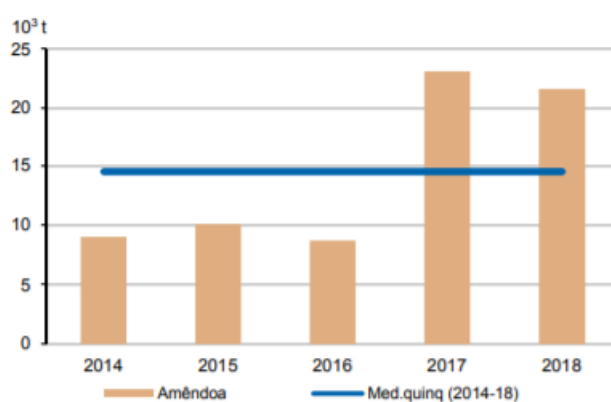


Figura 2: Produção a nível Nacional de amêndoa (INE,2018)

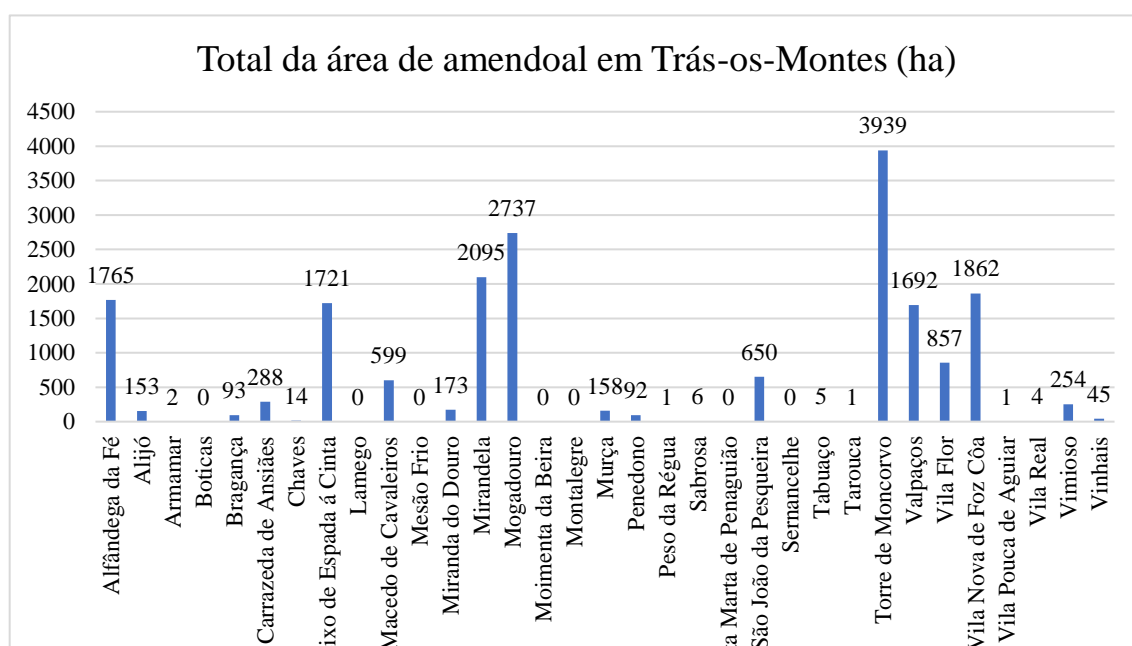


Figura 3: Gráfico relativo à área de produção de amendoal em Trás-os-Montes, relativo ao ano de 2017(Centro Nacional de Competências dos Frutos Secos, Amêndoa Estudo de produção e comercialização nas terras de Trás-os-Montes)

Existem dois tipos de amêndoa, a amêndoa doce que é comestível e a amêndoa amarga que não deve ser ingerida. A produção deste fruto começa na plantação da árvore que poderá demorar até 5 anos para a primeira recolha de amêndoa, e 12 para atingir maturidade suficiente para a capacidade total de produção [10]. Entre Fevereiro e Março a amendoeira começa a florir, entre o final de Agosto e início de Setembro a casca verde começa a secar e a abrir, então dá-se início à colheita. Em seguida é feita a separação da casca exterior, por fim a película interior pode ou não ser removida, pela técnica de *blanching* (branqueamento).

A casca verde e a exterior, anteriormente eram descartadas passavam a ser subprodutos para queima de modo a produzirem energia, atualmente têm sido estudadas outras finalidades em que possam ser utilizadas pois são ricas em compostos bioativos (flavonoides e ácidos fenólicos). Em relação à película interior, esta é comestível pois tem propriedades biológicas interessantes, servindo também para produção de energias e alimentação de animais, também rica em compostos fenólicos. A amêndoa em si é caracterizada por o seu alto valor nutricional, e cada vez mais valorizada, pois é rica em energia contendo lípidos (50% do peso do *kernel*), proteínas, minerais e fibras alimentares [3] tem um baixo teor de água o que faz com que a qualidade se mantenha, reduzida probabilidade de crescimento de microrganismos e tenha longo tempo de validade.

A amêndoa é diariamente utilizada em todo o mundo de diversas maneiras, seja comida a cru, com pele, sem pele, em diversos pratos, em pastelarias.

2.1. Composição Química

Como referido anteriormente, a amêndoa é um alimento rico em energia essencialmente devido ao seu alto teor de óleo, sendo que a sua composição nutricional varia de acordo com a forma de processamento. O principal componente é a gordura (50% de gorduras insaturadas mono e polinsaturada) que faz com que tenha um grande valor calórico (aproximadamente 600 kcal/100 g de *kernel*), seguido da proteína e hidratos de carbono, os teores de cinzas e água são inferiores a 5% [11].

A amêndoa tem vários componentes, e em 28 g de amêndoa existe uma fonte de vitamina E (α -tocoferol 36,4%), manganês (36%), magnésio (19,5%), cobre (16%), fosforo (13,4%), fibra (13,2%), e proteína (12,1%) e riboflavina (13,5%). Uma ingestão

controlada da amêndoa (4 g/d), não traz ganho de peso e reduz 1% a concentração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estas têm um baixo índice glicêmico, reduzem o colesterol e têm apresentado uma ação anti-inflamatória [11].

Tem uma fonte de fitonutrientes importantes, nomeadamente ácidos fenólicos e polifenóis, tais como flavonoides e proantocianidinas. Componentes como, flavonoides (isoramnetina, kaempferol, quercetina), flavanóis (catequina, epicatequina), flavanonas (naringina), antocianidinas (cianidina, delphinidina), procianidinas (B2, B3) e ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido protocatecúico, ácido vanílico) (Figura4), são encontrados em maior abundância na película interior [11].

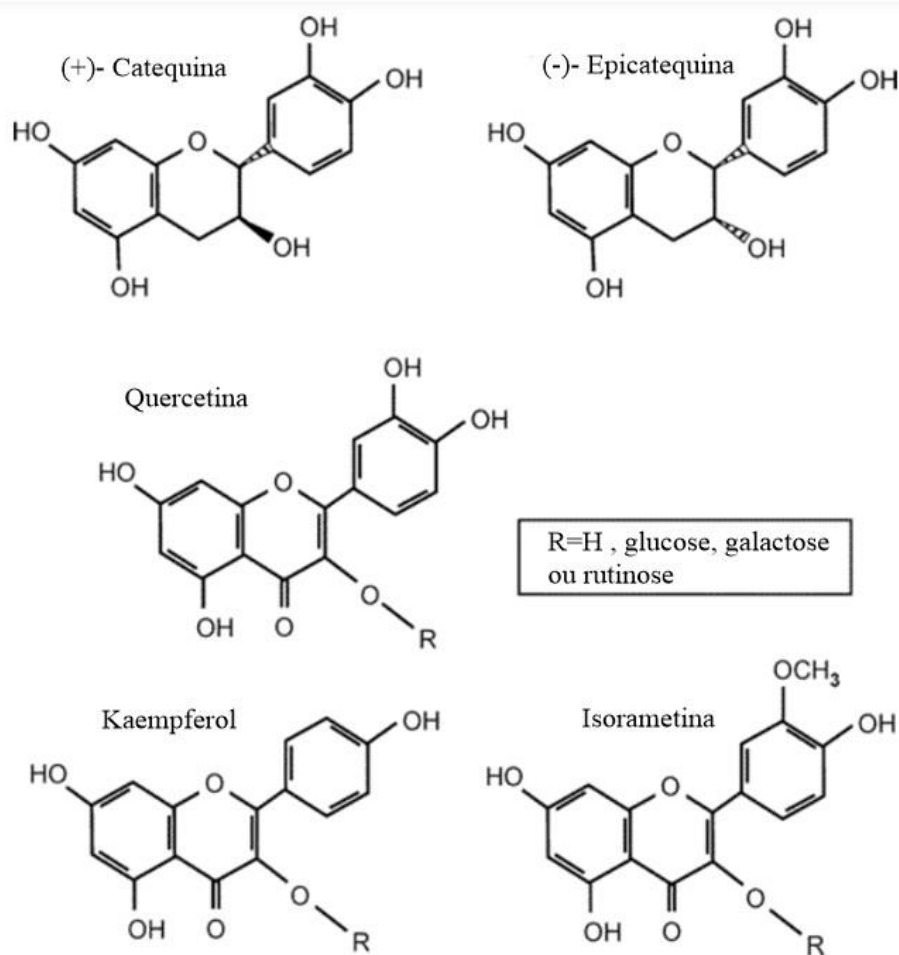


Figura 4: Estrutura dos principais flavonoides presentes na amêndoa. (Determination of Flavonoids and Phenolics and Their Distribution in Almonds, 2006)

2.2. Compostos dos subprodutos da amêndoa

A produção de amêndoa baseia-se basicamente no seu consumo (*kernel*), e na pouca valorização da grande quantidade de subprodutos (Figura 5) por ela gerada, que até ao momento têm servido como fonte de energia, alimentação de animais [3]. Esses subprodutos, têm vindo a ser estudados ao longo dos anos, pois as suas propriedades físico-químicas e a composição desses materiais sugerem possíveis aplicações alternativas, como a recuperação de compostos fenólicos e o seu uso como preservação natural dos alimentos aditivos e suplementos alimentares [3].



Figura 5: Partes da amêndoa (<https://www.mdpi.com/1420-3049/22/10/1774/htm>)

A casca de verde representa 52% do peso total, a casca exterior juntamente com a película interior e o *kernel* representa 33%, e o peso do *kernel* representa 15%, estes valores são referentes ao total do peso fresco [3] (Figura 6). Relativamente ao total do peso seco a casca verde representa 10%, a casca exterior 75% e a película interior junto com o núcleo entre 6-8% [9].

Todos subprodutos possuem componentes benéficos para a saúde, sendo que os extratos da película interior exerceram maior efeito preventivo para o LDL humano [12].

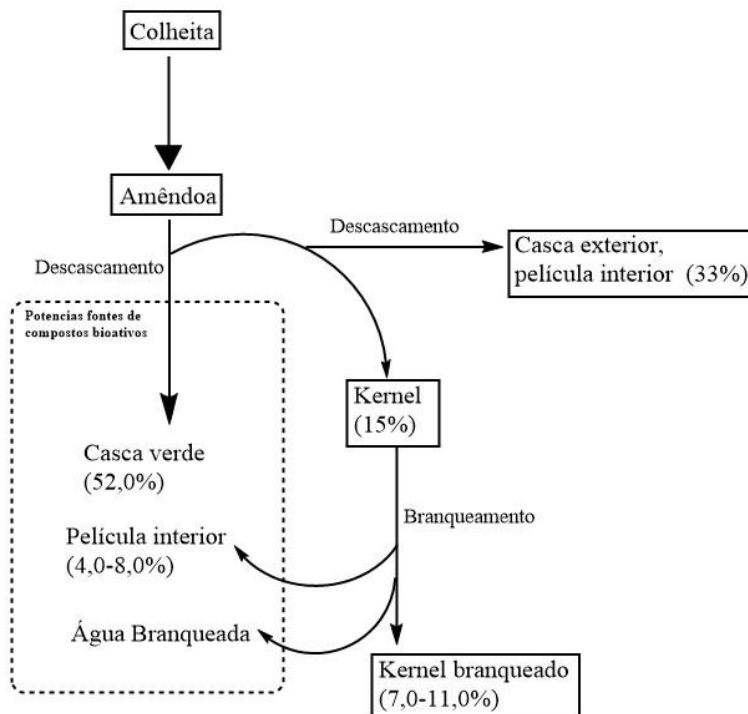


Figura 6: Processo de obtenção dos subprodutos da amêndoa, na indústria da amêndoa.

2.2.1. Película interior da amêndoa

A película interior da amêndoa tem uma cor castanha, e é removida através da técnica de *blanching*. Os compostos fenólicos presentes na película interior da amêndoa ainda não foram completamente estudados, mas sabe-se que possuem compostos flavonóides e não-flavonóides. Dentro do grupo dos não-flavonóides estão presentes o ácido protocatecúico, vanílico e *p*-hidroxibenzóico, já nos flavonóides estão incluídos flavanóis, flavonóis, di-hidroflavonóis e flavanonas [4]. Segundo a literatura, primeiramente foram identificaram os monômeros de flavanol (+) - catequina e (-) - epicatequina, bem como os dímeros, procianidinas B1, B3 e B4, mas não pelos trihidroxilados (galocatecina e epigalocatequina). Seguidamente foi confirmada a presença de procianidinas do tipo B. Na classe dos flavonóis identifica-se o 3-*O*-glucósidos, -galactósidos e -utinósidos de quercetina, kaempferol e isorametina e as suas agliconas. Nas flavanonas, naringenina-7-*O*-glucósido, eriodictiol-7-*O*-glucósido e eriodictiol-7-*O*-galactósido e suas agliconas correspondentes também foram identificados [4].

O conteúdo fenólico de extratos etanólicos na película interior e das cascas verdes são superiores ao do *kernel* (88 ± 2 , 71 ± 2 e 8 ± 1 mg equivalentes de quercetina/g de extrato, respetivamente) [11].

Foi verificado que a extração de polifenóis da película interior da amêndoa é influenciada pelo método de extração, tendo maior eficiência as amêndoas sujeitas à extração por *blanching* [13].

2.2.2. Casca exterior

A casca exterior, também ela de cor castanha, é composta principalmente por celulose (29,8-50,7%), hemicelulose (19,3%-29,0%) e lignina (20,4%-50,7%).

A sua dureza está associada à quantidade total de lignina formada durante o seu desenvolvimento [3]. A maior parte da lignina é insolúvel em meio ácido [14], mas outra parte pode não ser solúvel nesse meio, sendo assim, as cascas de amêndoa podem sofrer hidrólise ácida [15], com o objetivo de se obter uma fase líquida que contém açúcares, produtos resultantes da desidratação de açúcares, ácido acético e compostos derivados da lignina solúvel em ácido. Estes podem posteriormente ser usados na produção de oxiaromáticos relevantes para a saúde, cosméticos e indústria alimentar. A fração solúvel em acetato de etilo do hidrolisado pode ser utilizada para evitar a ocorrência de oxidação de óleos obtidos a partir de peixe e de emulsões, devido ao seu elevado conteúdo em ácidos gordos polinsaturados, o que os torna suscetíveis à oxidação [15].

2.2.3. Casca Verde

A casca verde (Figura 4) é a primeira casca da amêndoa, ela representa de 35,0% a 62% do peso total da amêndoa, dependendo da sua espessura e variedade [3]. Até hoje foi-lhe atribuída pouca utilidade, mas pode ser uma grande fonte importante de compostos bioativos.

A composição nutricional da casca verde, depende não apenas da variedade de amêndoa, mas também de fatores ambientais e do manuseamento agrônômico, estes contribuem fortemente para as propriedades físico-químicas e fitoquímicas do *kernel*. Em

geral, o teor de açúcar na casca verde varia de 18,0 a 30,0%, o teor de proteínas varia de 2,1 a 8,8% e a fibra bruta varia de 10,0 a 24,9%. A fibra em detergente ácido varia de 20,6 a 35,2%, a fibra em detergente neutro de 10,0 a 15,0%, a celulose de 20,6 a 35,2% e a lignina bruta varia de 7,5 a 15,6% [3].



Figura 7: Casca verde da amêndoa.

Em estudos feitos, foram extraídos ácidos betulínico, oleanólico e ursólico, a partir de éter dietílico, tendo eles demonstrado propriedades anti-inflamatórias, anti-HIV e anticancerígena. Os extratos metanólicos preparados a partir da casca verde apresentam como composto fenólico maioritário o ácido clorogénico, onde foram detetados os isómeros ácidos 5-O-cafeoilquínico, 4-O-cafeoilquínico e 3-Ocafeoilquínico. Esses extratos foram capazes de retardar a formação de dienos conjugados durante a oxidação do metil-linoleato. As cascas verdes também contêm esteróis, designadamente stigmasterol e β -sitosterol. [11]

2.3. Polifenóis

Os polifenóis ou compostos fenólicos são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático, ligado a um ou mais grupos hidroxilo. A sua estrutura molecular pode variar entre uma simples molécula fenólica a polímeros complexos de

elevado peso molecular [16]. A maioria destes compostos apresenta-se conjugado a mono- ou oligossacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos, podendo também ocorrer como derivados funcionais, como esteres ou metilésteres [17]. Estes compostos são produzidos pela maioria das plantas como parte integrante da sua estrutura e desempenham diversas funções, funções estruturais nos tecidos de sustentação ou proteção, estratégias de defesa contra herbívoros e agentes patogénicos, agentes protetores contra condições climáticas e oxidação das biomoléculas. Estas suas funções devem-se essencialmente à sua capacidade antioxidante, ou seja, à sua capacidade de agir como agentes redutores, dadores de prótons, sequestradores de radicais livres e supressores do anião superóxido. Os compostos fenólicos também são um fator importante na reprodução e crescimento da planta e também no desenvolvimento de pigmentos e compostos voláteis que estão diretamente interligados com as características organolépticas (visíveis pelos humanos) de cada planta [17].

Os compostos fenólicos podem ser classificados por flavonoides ou não-flavonoides. Os polifenóis são compostos secundários, sintetizados no reino vegetal através de pentose-fosfato, chiquimato e fenilpropanoide, agrupando-se assim em quatro grupos principais, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides e taninos [17]. É de salientar que os polifenóis mais comuns na dieta humana são os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Por sua vez, os flavonoides são o grupo mais importante e que se divide em flavonóis, flavononas, flavanois, flavonas, antocianinas e isoflavonas.

No caso dos polifenóis presentes na amêndoa, eles são uma mistura de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos que contribuem para a capacidade antioxidante das amêndoas de maneira aditiva ou mesmo sinérgica. É importante a quantificação dos polifenóis nela presente, de maneira a estimar a contribuição para a ingestão alimentar [2].

Relativamente aos benefícios dos polifenóis para a saúde, dependem do seu metabolismo e absorção, sendo estes determinados pela sua estrutura. Estes funcionam como atividade antioxidante na prevenção de reações oxidativas e de formação de radicais livres, bem como na proteção contra danos ao DNA das células. São também considerados com propriedades anti-inflamatória, anti-carcinogénica, anti-aterogénica, anti-trombótica, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora [18]. No caso do consumo da amêndoa, estudos indicam que melhoram a saúde cardiovascular, síndrome metabólica, redução do colesterol, contribuiu para a modulação lipídica e diabetes [2].

Devido às suas propriedades, antioxidantes e relacionadas com a eficácia no tratamento de doenças (ex: diabetes, doenças cardiovasculares colesterol), o tamanho do mercado global dos polifenóis deve chegar a US \$ 2,08 bilhões até 2025 de acordo com um relatório da *Gran View Research, Inc.*, expandindo a CAGR (taxa de crescimento anual composta) para 7,2 % durante o período previsto. Com o avanço tecnológico é possível aos fabricantes aumentarem os benefícios dos polifenóis na cura de variadas doenças. De salientar que existem polifenóis presentes em plantas, ervas, frutas e vegetais, e com o desenvolvimento de tecnologia econômica para a extração, deverá aumentar o crescimento do mercado nos próximos anos [19].

O maior mercado em termos de volume é a Ásia seguida da América do Norte. Devido ao aumento da consciencialização perante a saúde, e os benefícios dos polifenóis, o mercado deverá aumentar nos próximos anos em países como a China, Índia, Coreia do Sul e Japão [19].

2.4. Flavonoides

Os flavonoides (Figura 5) são moléculas de baixo peso molecular, constituída por 15 átomos de carbono (C6-C3-C6). Possuem dois anéis aromáticos (A e B), ligados por uma cadeia alifática de três carbonos, que normalmente se encontra sobre a forma condensada de um pirano (anel C). Podem ser caracterizados através da sua estrutura química, principalmente no grau de oxidação no anel C. Contrariamente aos ácidos fenólicos, apresentam biossíntese mista, o anel aromático A deriva da via acetato enquanto que os anéis B e C derivam da via chiquimato [17].

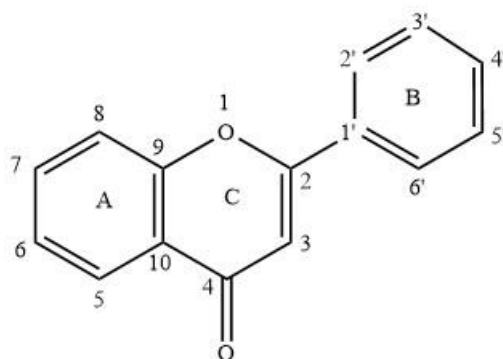


Figura 8: Estrutura química dos flavonóides.

Dividem-se em 14 classes diferentes, determinados a partir do padrão de oxidação e da substituição do anel C. Dentro dessas classes, 10 são as mais abundantes nos alimentos, sendo elas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanóis, dihidroflavanóis, 3-flavanóis, 3,4-flavanóis, chalconas, auronas e antocianidinas [17] (Figura 6). A tabela 1 é relativa a flavonoides e ácidos fenólicos presentes na amêndoa, anteriormente estudados [20].

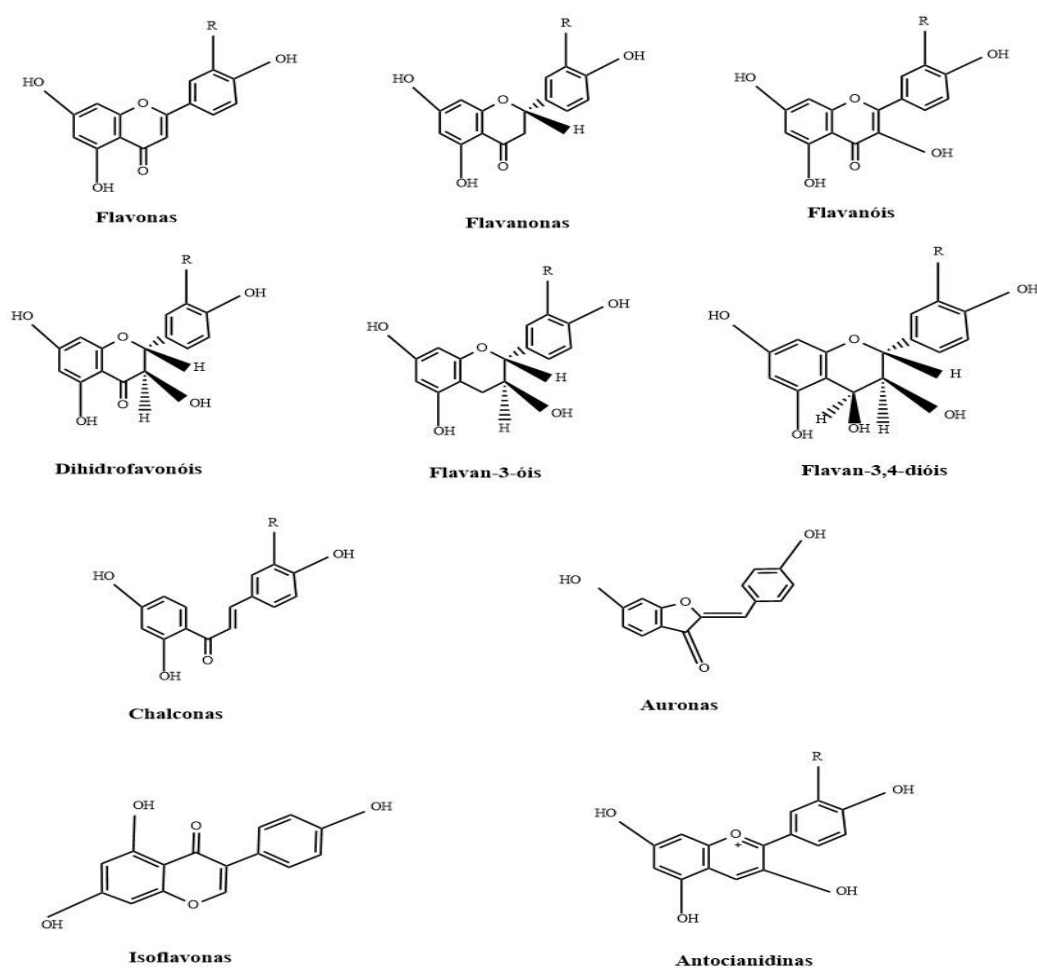


Figura 9: Estrutura das 10 principais classes de flavonóides.

Tabela 1: Flavonóides e ácidos fenólicos já identificados na amêndoa. (*Determination of Flavonoids and Phenolics and Their Distribution in Almonds*, 2006)

Numeração	Composto
1	Catequina
2	Ácido Protocatecuico
3	Epicatequina
4	Ácido p-hidroxi-benzóico
5	Ácido vanílico
6	Quercetina-3-O-galactosídeo
7	Naringenina-7-O-glicosídeo
8	Quercetina-3-O-rutnose
9	Quercetina-3-O-glicosídeo
10	Dihidroxi Kaempferol
11	Kaempferol-3-O-glicosídeo
12	Isorametina-3-O-galactosídeo
13	Kaempferol-3-O-glicosídeo
14	Kaempferol-3-O-rutnose
15	Isorametina-3-O-rutnose
16	Eriodictiol
17	Quercetina
18	Naringenina
19	Kaempferol
20	Isorametina

2.4.1. Quercetina

A quercetina (3,3',4,5,7-penta-hidroxi-flavona) (Figura 10) é o composto mais ativo da família das flavonas, é proveniente das folhas, frutos e flores de algumas plantas. É alvo de grande interesse devido às suas bioatividades, como a inoxidabilidade, propriedade antiviral, anti tumoral e ajuste da função imunológica, sendo também aérea de interesse as suas aplicações químicas. A quercetina normalmente é determinada por HPLC-UV, quimioluminescência eletrogerada e eletroforese capilar [21].

Na natureza a quercetina é existente em concentrações baixas, e é similarmente estrutural com outros flavonoides, então é necessária uma preparação seletiva da amostra antes de se iniciar a análise cromatográfica. Geralmente para separar os compostos é utilizada a técnica de SPE, para garantir a separação seletiva de analitos de matrizes complexas do mundo real, através de materiais seletivos que desempenham mecanismos de reconhecimento molecular [21].

Em estudos realizados, onde foram sintetizados MIPs, usando como molécula modelo a quercetina, 4-vinilpiridina como monômero funcional e EGDMA como reticulante, apresentou um excelente desempenho na separação de quercetina. Outros estudos foram feitos, trocando o monómero funcional, e verificou-se também eficiente. As propriedades dos MIP'S para a quercetina variam com os diferentes monómeros funcionais [21].

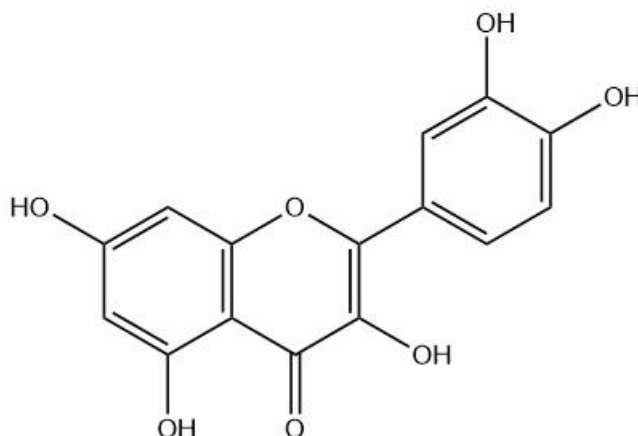


Figura 10: Estrutura química da quercetina, molécula alvo desta investigação.

2.4.2. Rutina

A rutina (Figura 11) é um flavonoide que pertence à subclasse dos flavonóis, tem sido estudada devido aos seus resultados interessantes para a indústria farmacêutica. Este pode ser encontrado em vários tipos de alimentos, como a cebola, uva, trigo, feijão vermelho, maçãs, tomates, vinho chá preto e na amêndoa e nos seus substratos [22].

A biossíntese da rutina tem início na combinação das duas principais vias dos compostos fenólicos, chiquimato e acetato [22].

Relativamente à sua estrutura, apresenta um dissacarídeo (raminose+glicose) ligados à posição três do anel pirano. A afinidade dos glicídeos pela membrana das células epitais exerce um importante papel na absorção de compostos lipofílicos. Estudos demonstram que a rutina foi completamente hidrolisada por glicosidases produzidas pelas enterobacterias dando origem a quercetina 3-glicosídica e a quercetina aglicona. A rutina

e quercetina apresentam metabólitos idênticos, como diosmetina, isohamnetina e tamariximetina, após 24 horas do início da dieta contendo 0,2% de quercetina ou 0,4% de rutina [22].

A rutina é utilizada em diversas atividades farmacêuticas, ajuda também nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados a doenças hemorrágicas e hipertensão, ajudando na resistência e permeabilidade da parede dos vasos.

A rutina também tem como benefício, ajudar na perda de visão, é anti-inflamatória, anticarcinogénica, anti-hiperlepidêmica, entre outros. Tem uma ampla diversidade no reino vegetal, logo destaca-se de outros flavonoides [22].

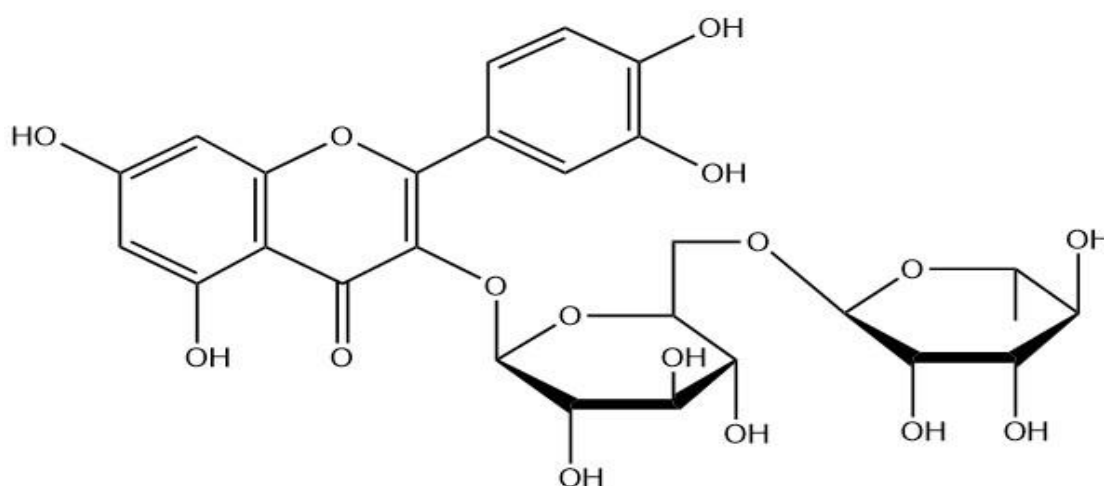


Figura 11: Estrutura molecular da Rutina, molécula alvo desta investigação.

2.5. Técnicas de extração

2.5.1. Soxhlet

A técnica de extração por soxhlet (Figura 12), foi desenvolvida inicialmente para extrair lípidos, mas também agora utilizada para extrair compostos fenólicos de compostos em fase sólida, através de aquecimento com geração de refluxo. Esta extração é possível quando o composto desejado tem uma solubilidade limitada num determinado solvente e as impurezas são insolúveis nesse determinado solvente [23]. Tem como vantagem não precisar de monitorização constante e utilizar uma pequena quantidade de

solvente que passa várias vezes pelo composto tornando a amostra mais concentrada. Como desvantagem, identifica-se as elevadas temperaturas de operação, com a possível degradação dos compostos devido à presença de luz e ar e o tempo de processo dependente do número de ciclos efetuado [24].

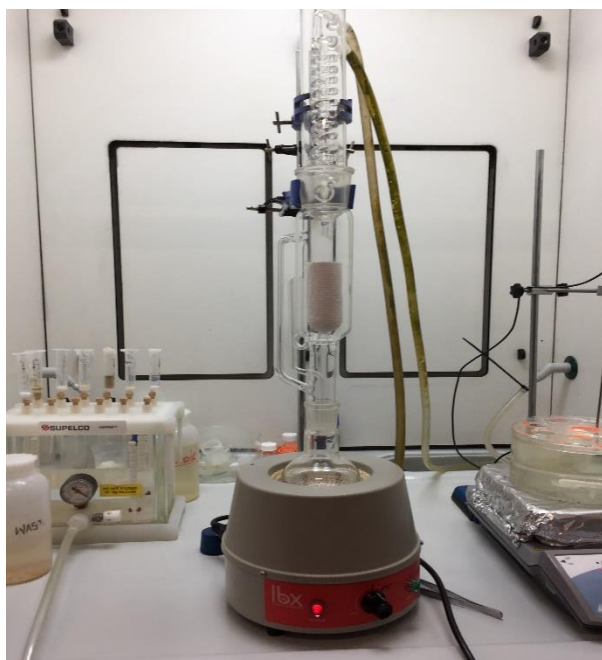


Figura 12: Montagem de extração Soxhlet.

2.5.2. Ultrassons

O processo de extração assistido por ultrassom (Figura 13) utiliza a energia de ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior à capacidade auditiva do ouvido humano [25]. Esta baseia-se na formação de ondas mecânicas de baixa frequência, que criam uma única vibração que causa uma variação na pressão no líquido gerando a cavitação. Esta cavitação facilita a ruptura das paredes celulares, pois é próxima ao tecido da amostra [26].

Esta técnica pode ser dividida em duas áreas, alta potência ou baixa potência. As ondas ultrassônicas de alta potência, causam mudança física e química permanente, porque produzem cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. Nas ondas de baixa potência, o importante é o efeito do meio sobre a onda. [25]

É uma operação com diversas vantagens, nomeadamente o seu simples funcionamento, possibilidade de utilização para uma ampla faixa de tamanho da amostra, não necessita de muito tempo nem de altas temperaturas ou de grandes pressões, é económica e amiga do ambiente [26].

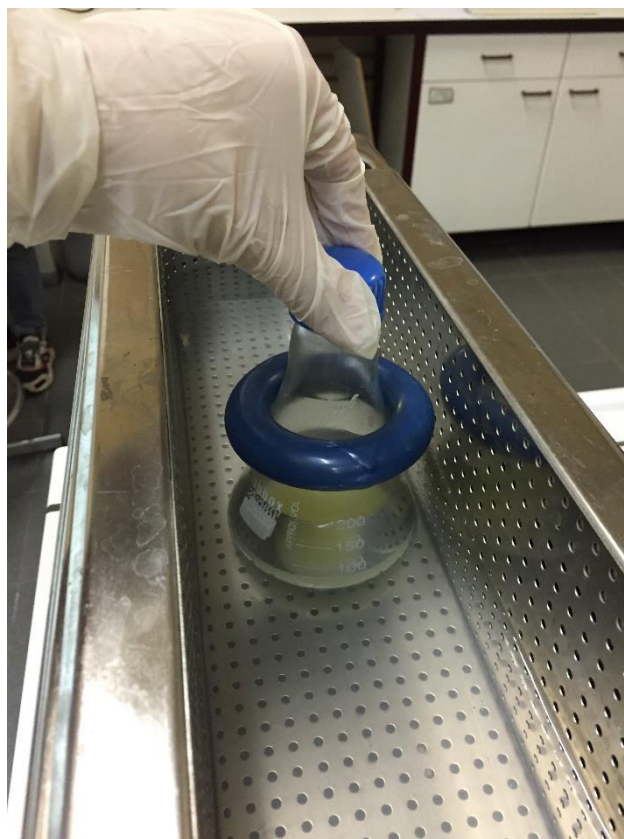


Figura 13: MIP_Querc_1 quando levado ao ultrassons.

2.6. Técnica de adsorção

A adsorção é uma operação de transferência de massa que explora a possibilidade de certos sólidos concentrarem na sua superfície determinadas substâncias existentes em fluidos líquidos ou gasosos, possibilitando a separação dos componentes desses fluidos. Os componentes adsorvidos, concentram-se na superfície externa, por isso quanto maior for a superfície por unidade de massa sólida, mais eficaz será a adsorção. Normalmente os adsorventes são sólidos com partículas porosas [27].

Os processos de adsorção estão divididos em três mecanismos fundamentais, histórico, de equilíbrio e cinéticos. No primeiro caso, os poros do material adsorvente têm dimensões características, em que só entram algumas partículas descartando as outras.

No segundo, os diferentes sólidos recebem diferentes espécies de adsorvatos (espécie que se acumula na interface do material), que são adsorvidos, preferencialmente a outros sólidos. O terceiro baseia-se nas diferentes difusividades das diversas espécies nos poros adsorventes [27].

Também podem ser classificados em relação à sua polaridade, sendo, polares ou hidrofílicos, apolares ou hidrofóbicos. Geralmente, os adsorventes hidrofílicos ou polares são desenvolvidos para adsorver substâncias mais polares que o fluido no qual estão contidas. Os apolares ou hidrofóbicos, são utilizados na remoção de espécies menos polares [28].

Os polímeros molecularmente impressos, podem ser utilizados como adsorventes, devido às suas características peculiares. Estes podem ter maior eficácia que os adsorventes comerciais, pois podem ser projetados para funcionar mesmo quando o solvente tem um baixo teor de água (por exemplo) e com elevada especificidade. Já os adsorventes comerciais, são em geral pouco seletivos, baseiam-se fundamentalmente em efeitos hidrofóbicos, gerando processos de adsorção/desorção complexos o que conduz à redução da eficiência de operação.

2.7. Extração fase sólida (SPE)

A extração por SPE (Figura 14) é uma das técnicas mais utilizadas para a extração de líquido-sólido. Os analitos presentes numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes após a passagem por um cartucho que contém um solvente. É utilizado um solvente orgânico seletivo para remover os interferentes, e outro para lavar os analitos de interesse. A escolha do adsorvente depende da capacidade de adsorção frente às espécies escolhidas [27]. Para a extração são necessários quatro passos, o acondicionamento, o carregamento (*loading*), a lavagem (*washing*) e a eluição (*elution*).

Pode fazer-se a extração SPE de duas formas, on-line e off-line. Na extração on-line a margem de erro é minimizada porque não se transfere manualmente o cartucho para o cromatógrafo [29].

Como em todos os métodos, existem vantagens e desvantagens. Este método apresenta vantagens em relação a métodos mais clássicos, como sensibilidade e qualidade

do resultado, podendo fazer-se várias extrações em simultâneo. Como desvantagem identifica-se por exemplo, a necessidade de solventes mais hidrofóbicos ou de volumes maiores de solventes orgânicos comuns para a remoção de solutos de maior hidrofobicidade da fase sólida, o preço elevado dos cartuchos. Na etapa de dessorção do analito no cartucho do SPE normalmente são requeridos solventes tóxicos em elevadas concentrações.



Figura 14: Extração fase sólida SPE.

Capítulo 3

3. Polímeros molecularmente impressos (MIPs)

Os polímeros molecularmente impressos (MIPs), são materiais sintéticos, que se baseiam na criação de uma rede de polímeros de cavidades feitas sob medida, com uma seletividade predefinida para o composto alvo para o qual foram projetados [30] [31]. O processo de impressão passa por três etapas, auto-montagem do monómero funcional, polimerização com a criação de uma rede de polímero e remoção da molécula modelo, após isto, as cavidades tridimensionais formadas devem corresponder à molécula alvo (tamanho, forma e disposição dos grupos funcionais) [30]. O objetivo é promover um polímero eficiente para o composto alvo.

Em geral, para um composto alvo particular (ex. quercetina), as moléculas modelo selecionadas estabelecem interações de ligação com monómeros funcionais (ex. 4VP), os componentes resultantes são copolimerizados com excesso de reticulante (ex. EGDMA) na presença de um iniciador de radicais livres (ex. AIBN) por polimerização térmica (Figura 15). A remoção das moléculas modelo cria locais de ligação específicos, arranjando um espaço preciso para os grupos funcionais na rede de polímeros, juntamente com a forma. Assim sendo, são feitas novas ligações reversíveis e grande reconhecimento seletivo das moléculas alvo.

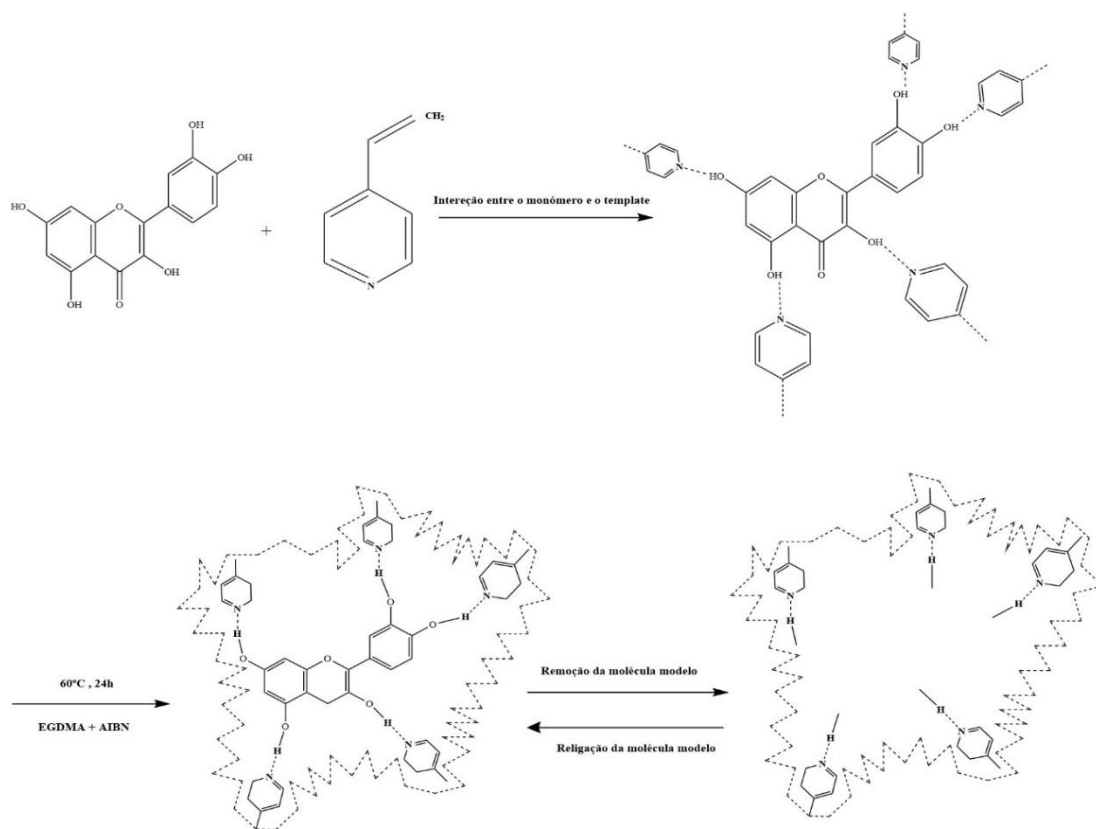


Figura 15: Representação esquemática da preparação do MIP da quercetina.

O seu desempenho poderá ser afetado por variados fatores, desde o processo de separação sendo eles a composição química e interações entre o modelo e o monómero funcional, e também pelo mecanismo da reação/suspensão [32]. Relativamente ao comportamento no reconhecimento molecular, este poderá ser afetado pela morfologia dos materiais obtidos, consequente da possível limitação dos mecanismos de transferência de massa [33]. É de salientar que os polímeros molecularmente impressos, têm vantagens em relação aos comerciais, devido ao seu processo de impressão, eles são feitos por medida, são materiais funcionais com especificidade para o seu composto alvo, têm maior margem de operação com extratos pouco aquosos, sendo que, leva a um número menor de etapas processuais, maior concentração de polifenóis e menor consumo de solventes orgânicos, são ainda mais económicos devido à sua sustentabilidade, e potencialmente melhores para o meio ambiente.

Em particular, nos últimos tempos os MIPs demonstraram ter um grande potencial como adsorventes para a extração de fase sólida (SPE). A vantagem é ter um número menor de etapas no processo de adsorção, maior concentração de polifenóis e menor consumo de solventes orgânicos.

Capítulo 4

4. Materiais e equipamentos

Neste capítulo, é descrito os reagentes, equipamentos e materiais utilizados na síntese dos MIPs, assim como em todas as operações ao longo deste trabalho. A utilização dos mesmos é enunciada nos capítulos 4 e 5.

4.1. Reagentes usados na síntese dos MIPs

Tabela 2: Reagentes utilizados no processo de síntese de polímeros molecularmente impressos.

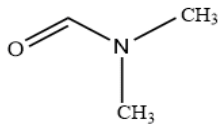
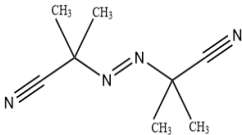
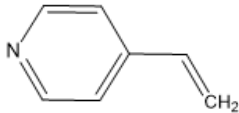
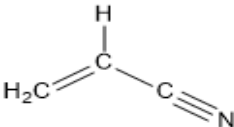
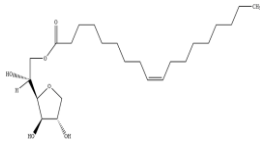
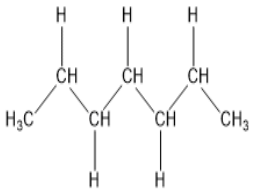
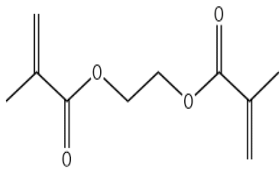
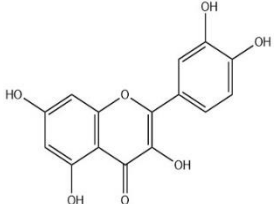
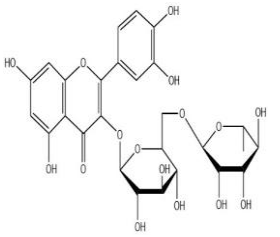
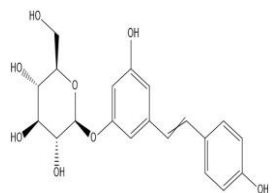
Reagentes	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Massa volúmica (g/ml)	Fornecedor
N,N-dimetilformamida (DMF)		73,09	0,944	VWR Chemicals
2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo (AIBN)		164,21	1,1	Fluka
Acetonitrilo (ACN)	$\text{H}_3\text{C} - \text{C} \equiv \text{N}$	41,04	0,781	VWR Chemicals
4-vinilpiridina (4VP)		105,4	1,051	Alpha Aesar
Acrilonitrilo (AN)		53,06	0,81	Sigma-Aldrich
Span-80		428,68	-	-

Tabela 2: (Continuação)

Reagentes	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Massa volúmica (g/ml)	Fornecedor
N-heptano		100,21	0,69	Sigma-Aldrich
Etileno-glicol dimetacrilato (EGDMA)		198,22	1,051	Sigma-Aldrich
Quercetina		302,2	-	Acros Organics
Rutina		664,6	-	Acros Organics
Polidatina		390,4	-	Sigma-Aldrich
Amberlite® XaD4	-	-	1,02	Sigma-Aldrich
Amberlite® XAD7HP	-	-	1,05	Sigma-Aldrich
Supelite™ DAX-8	-	-	1,09	Sigma-Aldrich

4.2. Reagentes utilizados na quantificação de polifenóis através de HPLC

Na tabela 3 são apresentados reagentes utilizados na quantificação de polifenóis através de HPLC.

Tabela 3: Reagentes utilizados na quantificação de polifenóis.

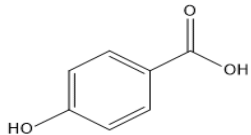
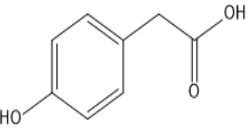
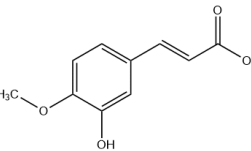
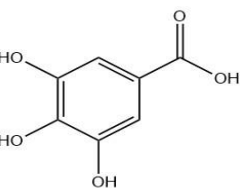
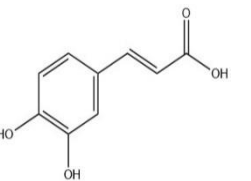
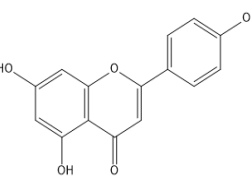
Reagentes	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Massa volúmica (g/ml)	Fornecedor
Ácido 4- hidroxibenzóico		138,12	1,46	Sigma-Aldrich
Ácido 4-hidroxifenil acético		152,1	-	Extrasynthese
Ácido ferulico		194,2	1,14	Acros-Organics
Ácido gálico		170,1	1,7	Sigma-Aldrich
Ácido cafeíco		180,2	1,48	Acros-Organics
Apigenina		270,2	-	Extrasynthese

Tabela 3: (Continuação)

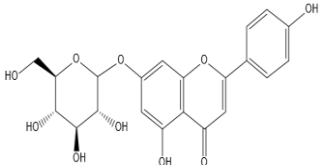
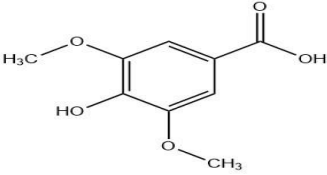
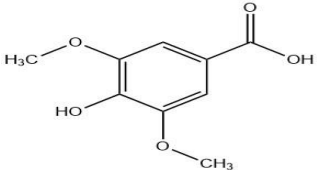
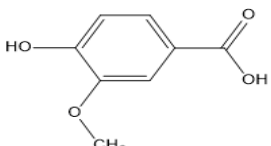
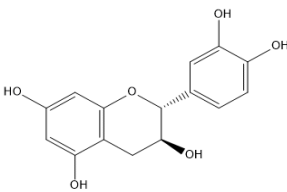
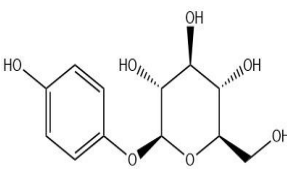
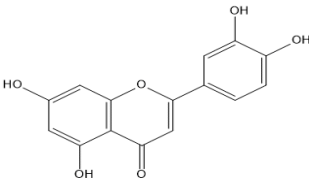
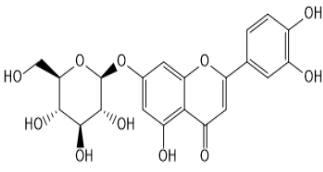
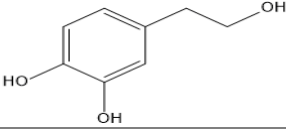
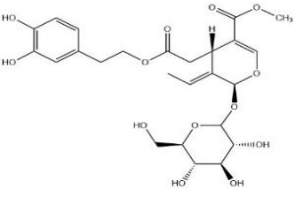
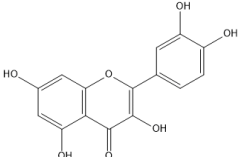
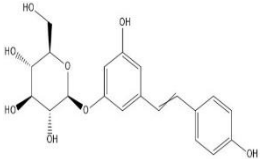
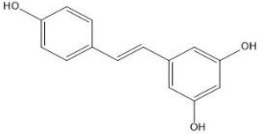
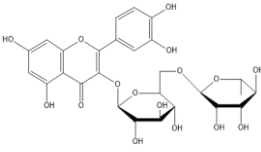
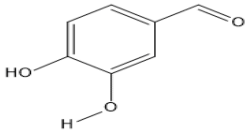
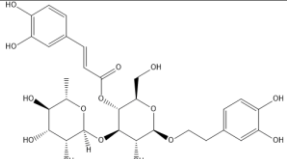
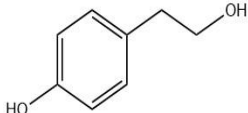
Reagentes	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Massa volúmica (g/ml)	Fornecedor
Apigenina 7-glicosídeo		432,4	-	Extrasynthese
Ácido Sinápico		224,2	-	Extrasynthese
Ácido Sirínico		198,2	-	Extrasynthese
Ácido Vanílico		168,14	-	Extrasynthese
Catequina		290,3	-	Sigma-Aldrich
Arbutina		272,3	-	NA

Tabela 3: (Continuação)

Reagentes	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Massa volúmica (g/ml)	Fornecedor
Luteolina		286,2	-	Extrasynthese
Luteolina 7-glicosídeo		448,4	-	Extrasynthese
Hidroxitirosol		154,2	-	Extrasynthese
Oleuropeína		540,5	-	PanReac-Applichem
Quercetina Hidratada		302,2	1,8	Acros-Organics
Polidatina		390,4	-	Sigma-Aldrich
Resveratrol		228,25	-	Sigma-Aldrich
Rutina		664,6	-	Acros-Organics
Vanilina		152,2	1,06	Extrasynthese

Verbascosídeo		624,6	-	Extrasynthese
Tirosol		138,2	-	Extrasynthese

4.3. Equipamentos

4.3.1. HPLC cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência, mais conhecida por HPLC (high performance liquid chromatography), é uma técnica utilizada para separação de componentes de uma mistura de forma a conseguir quantificá-los [34]. Normalmente esta técnica é utilizada em amostras de alimentos, água, solo entre outros e utiliza-se para fazer análises qualitativas como separação de um produto químico termicamente instável e de compostos biológicos. Também é utilizada em análises quantitativas, onde determina a concentração de um composto. Esta técnica é utilizada na separação de componentes com grande peso molecular e com uma baixa volatilidade. O HPLC (Figura 16) utiliza uma fase móvel líquida que separa os componentes da amostra, estes são dissolvidos num solvente e em seguida obrigados a passar por uma coluna de alta pressão [35]. Os componentes não interagem com a fase estacionária e saem em diferentes momentos. Ao sair da coluna os componentes passam por um detetor que emite um sinal e é contruído assim um gráfico [34].

Este equipamento é constituído por seis sistemas, sendo eles o sistema de reservatório da fase movel (reservatório de vidro com mistura de solventes polares ou não polares, dependente da composição da amostra), sistema de bombeamento da fase movel (bomba que transporta a fase movel do reservatório pela coluna), sistema de injeção (injetor onde é injetado um volume da amostra), sistema analítico (constituído pela coluna cromatográfica, feita de material inerte que resiste a varias pressões), sistema de deteção (sistema baseado na absorvância no ultravioleta e no visível) e sistema de aquisição de dados (através do sinal emitido pelo detetor este é registado e enviado para uma base de dados) [35].

No caso desta experiência, os solventes utilizados foram acetatonitrilo/água(pH=3) (90/10) e água (pH=3)/ acetatonitrilo (90/10), a quantidade de amostra injetada na coluna foi de 0,5 ml em cada experiência.



Figura 16: Registro fotográfico do equipamento HPLC (high performance liquid chromatography) usado ao longo deste trabalho.

4.3.2. UV-vis Ultravioleta visível

A espectrofotometria nas regiões ultravioleta e visível (UV-Vis), é uma técnica analítica, utilizada na indústria e nas áreas de investigação, é aplicada tanto para compostos orgânicos como inorgânicos. O equipamento é de fácil manuseamento, com um custo relativamente baixo, possibilita a realização de análises rápidas, com eficiência e sem formação de subprodutos nas amostras [36]. O procedimento envolve medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivação química e ligação a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises de fluxo [37].

Relativamente ao funcionamento do equipamento, consiste em dois feixes de luz que vão incidir num monocromador que por sua vez espalha o feixe de luz no comprimento de onda definido. Estes feixes de luz vão incidir nas células de quartzo uma com a amostra a ser lida e a outra com a amostra de referência, por fim o detetor vai identificar a intensidade de luz transmitida [37].

A fundamentação da espectrofotometria deriva da Lei de Lambert-Beer, sendo esta a base matemática para medidas de absorção de radiação, nos três estados (líquido, sólido e gasoso)) nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho [36].



Figura 17: Registro fotográfico do equipamento UV-vis Ultravioleta visível

4.3.3. Outros equipamentos

Tabela 4: Descrição dos equipamentos utilizados ao longo deste trabalho.

Equipamento	Modelo	Marca	Software
Balança analítica	AS/220/C/2	RADWAG	-
Extrator Soxhlet	HM01 Series	Labbox	-
Espectrofotómetro UV-vis	V-530	JASCO	VWS-580 Spectra Manager
Sistema de extração em fase sólida	Manifold Standard 12 - Port Model	SIGMA ALDRICH	-
Bomba de vácuo	RE30022C	Stuart	-
Medidor de pH	inoLab	WTW	-
HPLC	MD-4010	Jasco	-
Banho ultrassons	ULTRASONS-H	P SELECTA	-
	SW 1	SONO SWISS	-
Centrifuga de laboratório	Scanspeed mini	LABOGENE	-
	Centrifuge 5810 R	Eppendorf	-
	CompactStar CS 4	VWR	-
Placa de aquecimento	VMS-C7	VWR	-
		ADVANCED	-
Placa de agitação	S03 series	Lbx	-
		instruments	-
Estufa de vácuo	22	Vacuell	-

4.4. Estudos experimentais

Nesta secção são descritos todos os procedimentos experimentais realizados ao longo deste trabalho. É descrito o procedimento da realização dos extratos em diferentes solventes, assim como a síntese dos MIPs e a limpeza/secagem dos mesmos. Também são descritos os procedimentos experimentais do SPE, assim como as operações em Batch e em contínuo.

4.4.1. Procedimento experimental

4.4.1.1. Extração em diferentes solventes através de *Soxhlet* e *blanching*

Os subprodutos da amêndoa (*shell, hull*) foram devidamente secos numa estufa a vácuo durante 48h a uma temperatura de 40°C. Após isso foram triturados e posteriormente pesados (Tabela 5) para cartuchos de fibra de vidro próprios para utilização em *Soxhlet*.

Prepararam-se diferentes soluções de 200 ml de solvente (Etanol/Água (80/20), Acetonitrilo/Dimetilformamida (50/50), Acetato de Etilo/Etanol (50/50)) que foram separadamente colocadas em diferentes balões de destilação.

Durante a extração a manta de aquecimento foi mantida a uma temperatura de 80°C, foram feitos dois ciclos de extração para o solvente etanol/água (80/20) e três ciclos para os solventes acetatonitrilo/Dimetilformamida (50/50) e acetato de etilo/ etanol (50/50).

Para obter o blanching, levou-se 700 ml de água ao ponto de ebulição, mergulharam-se 230g de amêndoa (fruto e pele interior) durante um minuto, reservando-se a água (*blanching*) resultante. O blanching foi filtrado duas vezes para não conter nenhum resíduo proveniente da pele da amêndoa.

Tabela 5: Extratos produzidos em diferentes solventes.

Resíduo	Peso do resíduo (g)	Solvente (ml)	Solvente
<i>Hull</i>	28,0	200	Etanol/Água (80/20)
<i>Shell</i>	25,40	200	Etanol/Água (80/20)
<i>Shell</i>	25,4829	200	Acetonitrilo/Dimetilformamida (50/50)
<i>Shell</i>	25,4858	200	Acetato de Etilo/Etanol (50/50)
Pele e fruto	230,0	700	Água

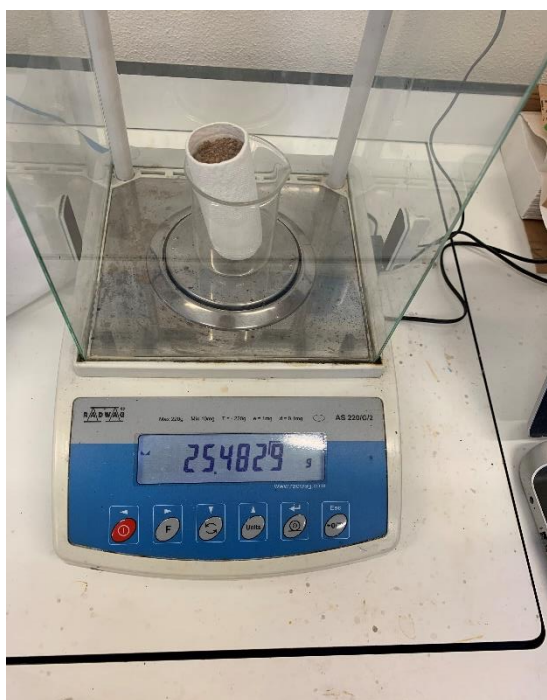


Figura 19: Pesagem do *shell* no cartucho de fibra de vidro.



Figura 18: Extração em *Soxhlet* do *shell* em Acetonitrilo/Dimetilformamida (50/50)

4.4.1.2. Síntese de MIPs e NIPs, respetiva lavagem/secagem

Foram realizados dois tipos de síntese dos MIPs, por precipitação e por suspensão inversa, de modo a comparar a morfologia e o desempenho dos materiais. Na tabela 6 estão representadas todas as condições de síntese dos MIPs usados neste trabalho.

- **Precipitação**

Dissolveu-se 600 mg de *template* em 55 ml de solvente (acetatonitrilo/dimetilformamida (91/9)), não sendo possível a dissolução completa adicionou-se mais solvente de modo a conseguir uma solução homogênea. Foi adicionado 1,077 ml do monómero (4-vinilpiridina) e colocou-se no ultrassom durante 30 minutos para promover as interações entre o monómero e o *template*. Após os 30 minutos, adicionou-se 1,820 ml de reticulante (EGDMA) e 250 mg de iniciador (AIBN). Verificou-se se a solução estava homogênea e deu-se início à degaseificação com argon durante 30 minutos. Por fim a solução foi levada a um banho de parafina, durante 24h a 60°C, sob

agitação (Figura 20). Este procedimento é relativo aos MIPs, sendo que para os NIPs o procedimento é igual, mas não contém o *template*.

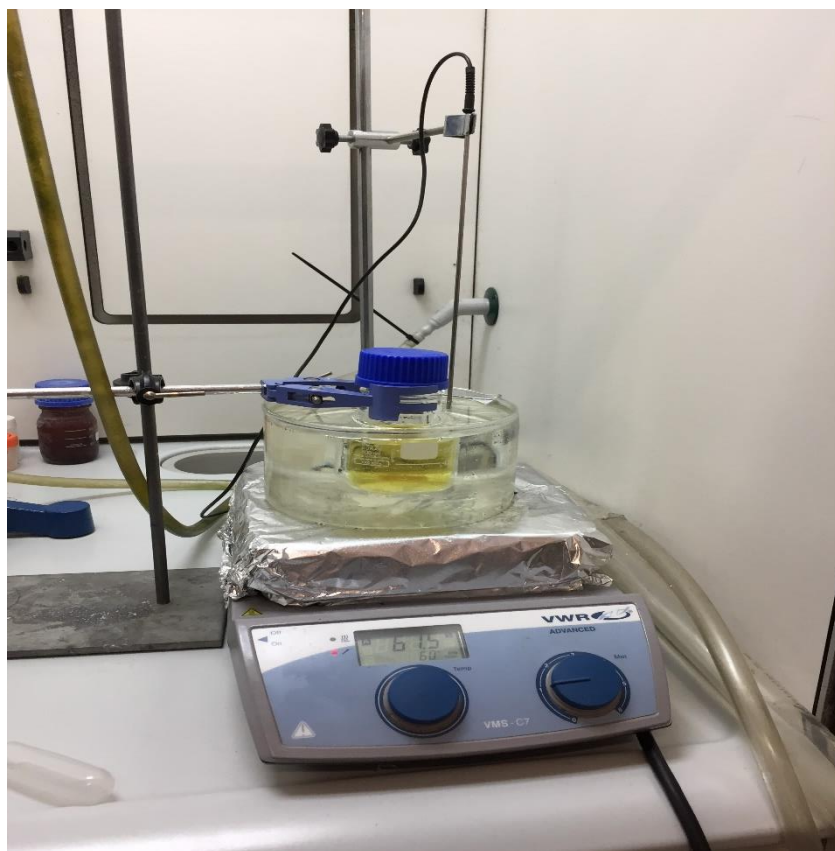


Figura 20: Registo fotográfico da última etapa de síntese do MIP_Querc_1, com uma $T=60^{\circ}\text{C}$

- **Lavagem/secagem (precipitação)**

Para efetuar a lavagem dos MIPs e NIPs, foi necessário dividir o conteúdo resultante da síntese em tubos de falcon (capacidade:11 ml) e levado a centrifugar durante 10 minutos a 6,5 rpm. Após essa etapa foram deixados a repousar, até se verificarem duas fases uma líquida e uma sólida. A fase líquida foi removida e descartada, e perfez-se o volume com metanol/ácido acético (90/10), os tubos foram novamente levados à centrifuga, repetindo-se este procedimento algumas vezes. Ao longo do processo de limpeza para comprovar a eficiência, foram retiradas algumas amostras antes de descartar a fase líquida e lidas no UV-vis. Por fim os frascos foram levados secar aproximadamente 72h numa estufa a vácuo a 40°C .

Devido ao NIP 2 ter partículas muito pequenas sendo difícil a separação de fases (líquida e sólida) o processo de limpeza foi o mesmo utilizado nos acima mencionados,

com a diferença da centrifuga utilizada. Para o NIP 2 foi utilizada uma centrifuga com uma maior capacidade de rpm (12000 rpm).



Figura 21: MIP_Rut_1 e NIP3 após lavagem e secagem.

- **Suspensão inversa**

Preparou-se uma solução com 600,4 mg de *template*, 1,082 ml e 0,18 de solventes acetonitrilo e dimetilformamida respetivamente. Em seguida juntou-se 1,08 ml de monómero (4-vinilpiridina) e 1,82 ml de reticulante (EGDMA). Todos os reagentes foram colocados pela ordem descrita e ao contrário dos MIPs por precipitação, esta solução não ficou homogénea e por esse motivo foi necessário acrescentar 0,2 ml de dimetilformamida e levar ao ultrasons até se tornar numa solução sem partículas visíveis. Após esse procedimento, colocou-se 65 mg de iniciador (AIBN), e foi para a degaseificação com árgon durante 30 minutos.

Posteriormente foi preparada uma solução de 24 ml de n-heptano e 164 mg de Span-80 que foi colocada no banho de parafina até atingir a temperatura de 60°C com forte agitação. Quando a temperatura estabilizou juntou-se gota a gota da primeira solução preparada à segunda solução, ficando a reagir durante 24h no banho a 60°C, sempre com agitação em vortex.

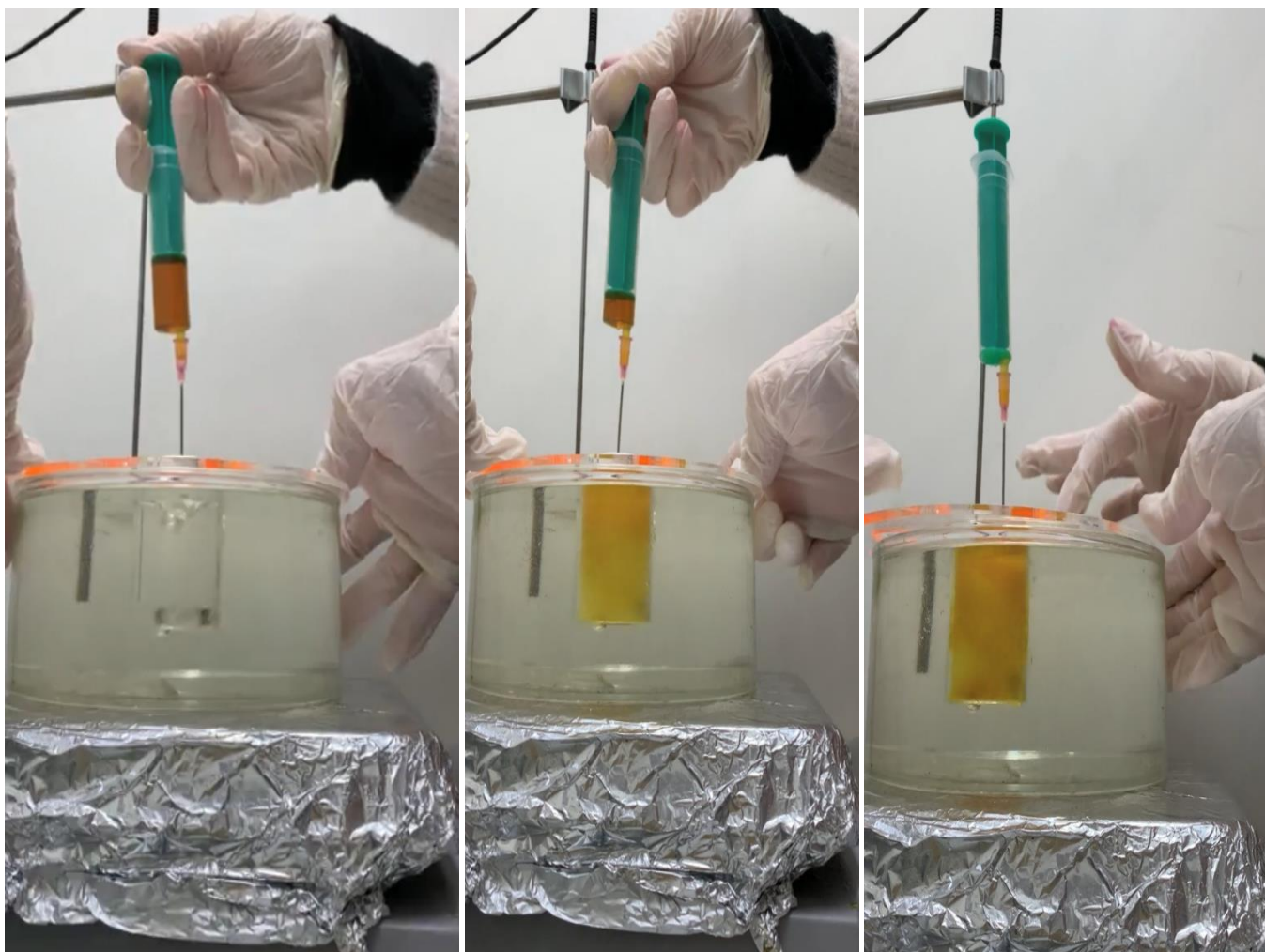


Figura 22: Registro fotográfico da síntese do MIP_Querc_2, obtido por suspensão inversa, em que a fase do monômero é adicionada à fase óleo, que se encontra num banho de parafina a $T= 60^{\circ}\text{C}$

- **Lavagem/ secagem (suspensão inversa)**

Relativamente à lavagem e secagem dos MIPs sintetizados por suspensão inversa, esta foi feita em Soxhlet, onde foram colocados 200 ml de solvente (metanol/ ácido acético (90/10), com três ciclos de lavagem, a uma temperatura média de 80°C . Para idealizar uma temperatura foi feita a média dos pontos de ebulição dos solventes sendo de esta de $91,3^{\circ}\text{C}$, mas devido ao ponto de ebulição do solvente em maior quantidade ser de $64,7^{\circ}\text{C}$ a opção foi de 80°C . Após a lavagem foram colocados na estufa a 40°C durante aproximadamente 72h.

4.4.1.3. SPE (Extração em fase sólida)

Após a limpeza e secagem dos MIPs e NIPs, foram pesados 200 mg de cada um para seringas individuais, o mesmo aconteceu para os adsorventes comerciais (DAX-8, XAD7HP, XAD4). Foram colocados no SPE, foi novamente feita uma série de limpeza com 5 ml de metanol/ ácido acético (90/10) durante aproximadamente 15 min em todos os envolvidos para comprovar que estavam efetivamente limpos, foi verificada a limpeza através da absorvância lida no UV-vis.

Foram feitos vários testes no SPE, cada teste foi feito em meios adequados ao extrato (*shell, hull, blanching*) a ser utilizado, visto que foram feitos com diferentes solventes. Durante 24 horas foram deixados a condicionar em 5 ml de solvente (etanol/ água (80/20), acetatonitrilo/ dimetilformamida (50/50), acetato de etilo/etanol (50/50), água) escolhido através do extrato que ia ser utilizado (*shell, hull, blanching*).

A extração em fase sólida dividiu-se em três partes, o *loading* que é feito com o extrato escolhido, o *washing* onde é utilizado o solvente em que foi feito o extrato e o *elution* executado com um solvente forte (metanol/acido acético (90/10)). Em cada seringa foi colocado 5 ml de extrato (*shell, hull, blanching*), ligou-se a bomba de vácuo, controlou-se a pressão, abriu-se a torneira controlando de maneira a que a fase líquida demora-se aproximadamente 15 minutos a sair, após o termino a fase líquida foi devidamente identificada e guardada no frigorifico para mais tarde analisar no HPLC, este primeiro passo é chamado de *loading*. O segundo passo é o *washing*, onde o solvente a ser utilizado vai ser escolhido através do extrato (*shell, hull, blanching*) que anteriormente se utilizou no *loading*. O procedimento é o mesmo 5 ml de solvente, durante aproximadamente 15 minutos, a fase líquida do *washing* também é guardada para posterior análise. Por fim é feito o *elution* com 5 ml de metanol/ acido acético (90/10), novamente durante aproximadamente 15 minutos, e a fase líquida final é guardada para mais tarde analisar em HPLC.

Ao fim de realizar o teste os adsorventes são deixados novamente a condicionar no solvente durante 24 horas

4.4.1.4. Operação em *Batch*

Para a simulação da operação em *batch* (Figura 24) foi montado um circuito que envolvia uma bomba peristáltica para conseguir obter um caudal controlado. Este teste foi feito só com um tipo de extrato (*blanching*) e o adsorvente utilizado ficou 24 horas a condicionar em água antes do início da experiência, a água foi removida após o término do tempo. No início do circuito está um tanque que contém aproximadamente 1g do adsorvente escolhido (DAX-8, MIP_Querc_1, MIP_Pol_2, MIP_Rut_2), para fazer o teste de adsorção foi necessário saturar o adsorvente, para isso colocou-se 25 ml de *blanching* e ligou-se a bomba programada a um caudal de 1ml/min. Foi retirada uma amostra inicial de 2 ml da fase líquida, que foi repostada com mais 2 ml de extrato (*blanching*), para manter um volume constante, o mesmo aconteceu mais vezes com intervalos definidos. É de salientar que em todo este processo foi utilizado um filtro dentro do tanque para evitar a saída de partículas e rentabilizar ao máximo a reação. O nível de saturação foi comprovado através da curva de saturação obtida através da leitura das amostras retiradas no UV-vis. Após a saturação, a fase líquida foi removida e foram feitos seis *elutions* com solventes diferentes, que foram feitos pela ordem a seguir descrita, água, metanol/ água (50/50), metanol/ água (80/20), metanol/água (95/5), metanol/ácido acético (90/10) e metanol/água (pH=2) (90/10). Para o primeiro *elution*, foram colocados 5 ml de água no tanque, levou-se a um banho de parafina a 50°C durante 1h:30 minutos, depois retirou-se a fase líquida e foi devidamente guardada para posterior leitura no HPLC. O mesmo procedimento aconteceu para os outros *elutions*. Para finalizar foi sempre feito um *elution* com dimetilformamida para uma maior limpeza do adsorvente.



Figura 24: Simulação da operação em batch no MIP_Pol_2 com *blanching*

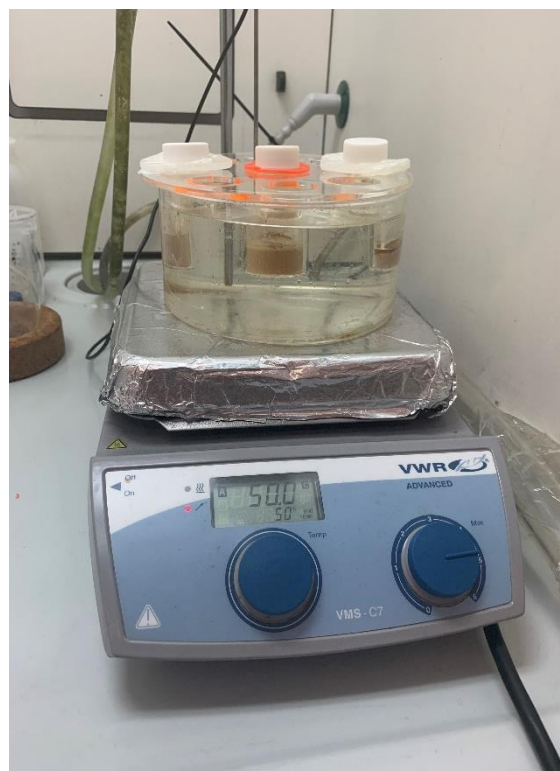


Figura 23: Primeira etapa dos elutions (água) dos MIP_Pol_2, MIP_Rut_2 e DAX-8.

4.4.1.5. Operação em contínuo

Semelhantemente à operação em *batch*, nesta operação também foi utilizada a bomba peristáltica, no entanto foram necessárias duas para montar o sistema contínuo. O sistema baseou-se numa primeira bomba a retirar a fase líquida do tanque e a descartar a mesma, e a segunda bomba serviu para o tanque estar sempre em contínua alimentação de extrato (Figura 25.). As bombas inicialmente foram calibradas para um caudal igual a 1ml/min, sendo que devido a problemas com o filtro inserido no tubo de extração da fase líquida, teve de ser ajustado ao longo da experiência. Antes de começar o adsorvente esteve em condicionamento durante 24 horas com água.

Para este teste foi necessário pesar para o tanque aproximadamente 1g do adsorvente (MIP_Rut_2) e foram colocados 25 ml de extrato (*blanching*) com o objetivo de saturar o adsorvente. Foram retiradas amostras a vários intervalos de tempo definidos, e foram lidas no UV-vis, de maneira a ser projetada uma curva de saturação.

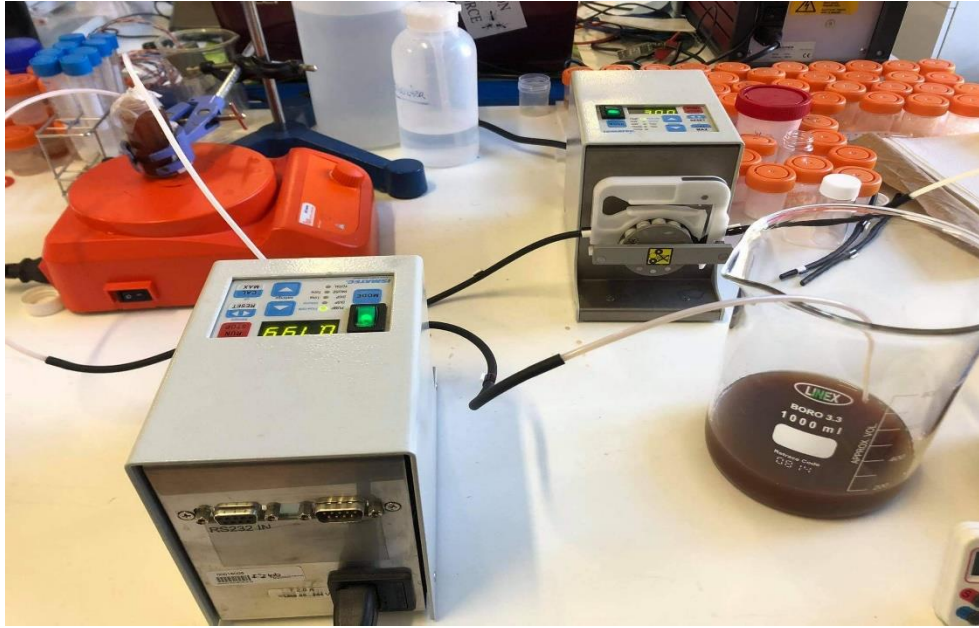


Figura 25: Simulação da operação em contínuo, com o MIP_Rut_2 sendo alimentado por *blanching*.

Capítulo 5

5. Resultados e Discussão

Este trabalho teve como objetivo geral a avaliação de adsorventes molecularmente impressos para a concentração, fracionamento e purificação de polifenóis contidos em subprodutos da amêndoa. Para esse efeito foram considerados resultados anteriores do grupo de investigação onde esta investigação foi realizada com relação à síntese de Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs) para polifenóis [5,33,38]. Especificamente, foi explorada com extratos de subprodutos de amêndoa a forte interação entre redes de polímero contendo 4-vinilpiridina (4VP) e um grande número de polifenóis, por analogia com o demonstrado anteriormente para extratos de subprodutos da vinha, cortiça, castanha ou cebola [5,33,38]. A investigação aqui apresentada inclui uma análise comparativa de novos adsorventes sintetizados, materiais anteriormente produzidos pelo grupo de investigação onde este trabalho foi realizado e ainda resinas sintéticas disponíveis comercialmente.

5.1. Racional considerado na síntese de adsorventes molecularmente impressos

Na Tabela 6 são apresentadas as condições utilizadas na produção de adsorventes molecularmente impressos desenvolvidos nesta investigação ou anteriormente sintetizados pelo grupo onde se realizou este trabalho. O racional considerado para a síntese desses MIPs baseia-se na seguinte abordagem:

i) A consideração de moléculas molde de baixo custo de modo a tornar eventualmente possível a comercialização dos adsorventes. Por outro lado, foram selecionadas moléculas molde pertencentes a diferentes famílias que poderão ser consideradas como moléculas substitutas (“surrogate molecule”) para efeitos de síntese dos MIPs (abordagem usualmente considerada em síntese farmacêutica). A estrutura dessas moléculas partilha pontos comuns com outros polifenóis alvo podendo servir para a introdução de alguma especificidade nos adsorventes desenhados. Em concreto, considerou-se a quercetina (um flavonoide presente em muitos vegetais), a rutina (um flavonoide glicosado) e a polidatina (um estilbeno glicosado também encontrado em algumas plantas). Note-se que a

glicosilação de polifenóis de base é um fenômeno usualmente observado em muitas plantas. Nos subprodutos de amêndoa está reportada a presença de rutina, quercetina e muitos dos seus derivados glicosados. A título ilustrativo, apresentam-se na Figura 26 resultados de um trabalho anterior realizado neste grupo [39] para a análise de um extrato de casca de amêndoa por cromatografia líquida com detecção por um sistema de díodos e espectroscopia de massa (LC-DAD-ESI/MSⁿ) onde se identificou a presença dessas moléculas molde (entre outros tipos de flavonoides e vários derivados glicosados). A caracterização do perfil fenólico da amêndoa e seus subprodutos pode também ser encontrada em vários outros trabalhos de investigação [40-42]. Embora não esteja reportada a presença de polidatina em subprodutos de amêndoa, os MIPs sintetizados com esta molécula foram também considerados para avaliar um possível efeito deste molde substituto na retenção de polifenóis (o efeito “surrogate” como acima mencionado). Note-se que a presença de um polifenol no processo de síntese de um adsorvente para além de poder gerar a formação de cavidade específicas, tem também um efeito importante na morfologia dos materiais resultantes [5,33,38]. Assim, a consideração de moléculas substitutas em impressão molecular pode gerar benefícios indiretos no desempenho dos adsorventes através da manipulação da sua morfologia (ex. tamanho de partículas conduzindo ao aumento de taxas de transferência de massa).

ii) A polimerização por precipitação e em suspensão inversa foram alternativamente consideradas como forma de manipular a morfologia dos adsorventes (tamanho das partículas formadas) e desta forma avaliar o seu desempenho como resultado da potencial alteração das taxas de transferência de massa em processos de adsorção/desorção. Note-se que o tamanho das partículas do adsorvente é uma questão importante na sua aplicação prática em processos contínuos com colunas de enchimento devindo à potencial geração de pressões demasiado altas quando o seu diâmetro é muito reduzido (ex. $\ll 1 \mu\text{m}$).

iii) A 4-vinilpiridina (4VP) foi considerada como monómero funcional principal devido à forte interação dos grupos piridil com vários polifenóis, como demonstrado recentemente em trabalhos deste grupo [5,33,38]. Em alguns produtos foi considerada a incorporação de acrilonitrilo (AN) com o objetivo de avaliar também a interação do grupo nitrilo com os polifenóis, nomeadamente em comparação com o grupo piridil do 4VP.

iv) A composição do solvente de polimerização foi selecionada tendo em consideração a minimização da sua interação competitiva com as moléculas molde. Em concreto, tentou-se a utilização de solventes com baixa capacidade de estabelecer ligações de hidrogénio,

nomeadamente o acetonitrilo (ACN), para não prejudicar o processo de impressão molecular. A adição de DMF demonstrou-se necessária em proporções que garantissem a solubilidade total da mistura inicial de polimerização (monómeros + molécula molde + iniciador). O solvente utilizado tem também um forte impacto na morfologia das partículas de polímero obtidas [5,33,38]. Neste contexto foi também considerada a polimerização em etanol/água.

v) A composição do sistema de polimerização (definida pelos parâmetros Y_M , Y_I , Y_{CL} , $Y_{FM/T}$ e $Y_{C/D}$) segue as linhas gerais dos fundamentos da impressão molecular e baseia-se também em resultados deste grupo de investigação com polifenóis [38-40]. O significado desses parâmetros é o seguinte:

- Y_M representa a fração mássica de monómero funcional + reticulante na solução de polimerização (%).
- Y_I representa a fração molar de iniciador relativamente a monómero funcional + reticulante (%).

Tabela 6: Condições utilizadas na produção de adsorventes molecularmente impressos desenvolvidos nesta investigação ou anteriormente sintetizados pelo grupo onde se realizou este trabalho.

Adsorvente	Molécula Molde	Técnica de polimerização	Monómeros Funcionais	Solvente	Y_M	Y_I	Y_{CL}	$Y_{FM/T}$	$Y_{C/D}$
MIP-QUER-1	Quercetina	Precipitação	4VP	ACN/DMF 91/09	5,6	7,8	49,1	5	-
MIP-QUER-2	Quercetina	Suspensão Inversa	4VP	ACN/DMF 70/30	57,8	2	49,1	5	3,2
MIP-QUER-3	Quercetina	Suspensão Inversa	4VP/AN 50/50	ACN/DMF 70/30	57,9	1,2	9,7	15	3,8
MIP-POL-1	Polidatina	Precipitação	4VP	ACN/DMF 91/09	5,6	7,8	49,1	6	-
MIP-POL-2	Polidatina	Suspensão Inversa	4VP	ACN/DMF 83/17	62,4	2	49,1	6	3,5
MIP-RUT-1	Rutina	Precipitação	4VP	ACN/DMF 65/35	3,9	7,9	49,1	10	-
MIP-RUT-2	Rutina	Suspensão Inversa	4VP	ACN/DMF 26/74	31,9	2	49,1	10	1,5
NIP1	-	Precipitação	4VP	ACN/DMF 91/09	5,6	7,8	49,1	-	-
NIP2	-	Precipitação	4VP	ACN/DMF 91/09	5,6	7,8	49,1	-	-
NIP3	-	Precipitação	4VP	ACN/DMF 65/35	3,9	7,9	49,1	-	-
NIP4	-	Suspensão Inversa	4VP	ACN/DMF 70/30	57,8	2	49,1	-	3
NIP5	-	Precipitação	4VP/AN 50/50	EtOH/H ₂ O 67/33	16,8	0,54	10	-	-

- Y_{CL} representa a fração molar de reticulante na mistura monómero funcional + reticulante (%).
- $Y_{FM/T}$ representa a razão molar entre monómero funcional e molécula molde.
- $Y_{C/D}$ representa a razão mássica entre a fase de óleo e a fase de monómeros na polimerização por suspensão inversa.

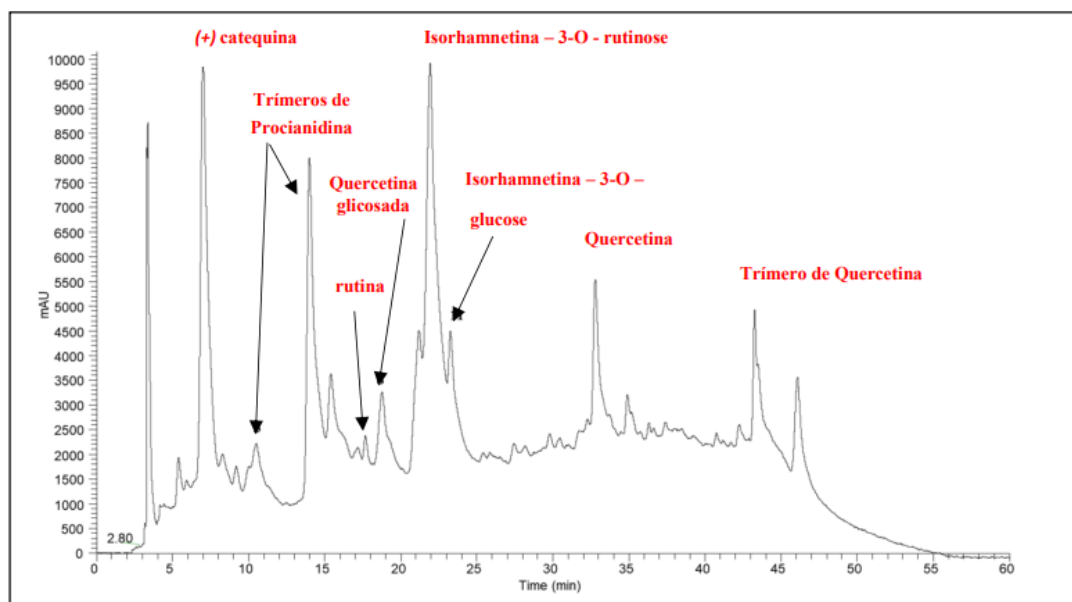


Figura 26: Análise por LC-DAD-ESI/MSⁿ de um extrato de casca de amêndoa [38] indicando a presença de polifenóis como a quercetina e a rutina, entre outros.

5.2. Análise de extratos de subprodutos da amêndoa por HPLC com sistema de díodos (HPLC-DAD)

Neste trabalho a análise de extratos obtidos a partir de subprodutos da amêndoa foi realizada por HPLC com sistema de díodos (HPLC-DAD). Note-se que esta técnica é menos dispendiosa do que a análise por LC-DAD-ESI/MSⁿ sendo, portanto, uma alternativa mais viável quando se pretende tratar um grande número de amostras. A identificação/quantificação dos polifenóis pode ser realizada por HPLC-DAD considerando a comparação com resultados LC-DAD-ESI/MSⁿ (ver Figura 26) e/ou usando padrões de algumas moléculas consideradas representativas das famílias de compostos esperadas.

Nas Figuras 27 a 35 são apresentados resultados obtidos neste contexto, nomeadamente as análises HPLC-DAD para os padrões de ácido gálico, catequina, rutina e quercetina, bem como as análises HPLC-DAD de diversos extratos de subprodutos de amêndoa. Estes resultados

foram utilizados em conjunto com a análise LC-DAD-ESI/MSⁿ apresentada na Figura 26. Os cromatogramas dos padrões (Figuras 27 – 29) permitiram obter estimativas da zona de eluição de alguns compostos esperados em extratos de subprodutos de amêndoa. Por outro lado, os respectivos espectros de absorção UV foram utilizados para auxiliar a identificação dos polifenóis tendo em consideração a mistura complexa que é observada nos extratos.

Tendo em consideração todos os dados acima descritos, nas Figuras 31-35 apresentam-se tentativas de identificação de compostos fenólicos de referência (ou respectivas zonas de eluição) nos diferentes extratos de subprodutos de amêndoa produzidos neste trabalho, nomeadamente:

- i) Extrato de casca de amêndoa (*shell*) em etanol/água 80/20 (Figura 31): ácido gálico, catequina, rutina, quercetinas glicosadas, isoramnetina-3-O-rutinoze, quercetina.
- ii) Extrato aquoso do branqueamento da amêndoa (Figura 32): ácido gálico, catequina, rutina, isoramnetina-3-O-rutinoze.
- iii) Extrato de casca verde de amêndoa (*hull*) em etanol/água 80/20 (Figura 33): ácido gálico, catequina, rutina, quercetinas glicosadas, isoramnetina-3-O-rutinoze, quercetina.
- iv) Extrato de casca de amêndoa (*shell*) em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 (Figura 34): menor impacto das quercetinas glicosadas relativamente aos perfis anteriores.
- v) Extrato de casca de amêndoa (*shell*) em acetato de etilo/etanol 50/50 50 (Figura 34): menor impacto das quercetinas glicosadas relativamente aos perfis anteriores.

Deve realçar-se novamente a complexidade dos extratos de subprodutos de amêndoa apresentados nas Figuras 31-35, contendo muitos mais compostos fenólicos para além daqueles acima referidos. A identificação simples aqui apresentada serve apenas como referência para avaliação do desempenho dos diferentes adsorventes considerados neste trabalho, conforme explorado nas próximas secções deste capítulo.

É também importante referir que foram considerados neste trabalho extratos de subprodutos de amêndoa obtidos em diferentes condições (ex. misturas de diferentes solventes orgânicos ou sistemas aquosos) de forma a avaliar o desempenho dos diferentes adsorventes em gamas alternativas de processamento. Estes estudos serão úteis para o possível projeto e otimização desses processos de adsorção/desorção tendo em consideração diversos perfis fenólicos, o solvente considerado e a aplicação dos produtos obtidos (ex. indústrias alimentares ou indústrias químicas requerendo diferentes graus de pureza/composição).

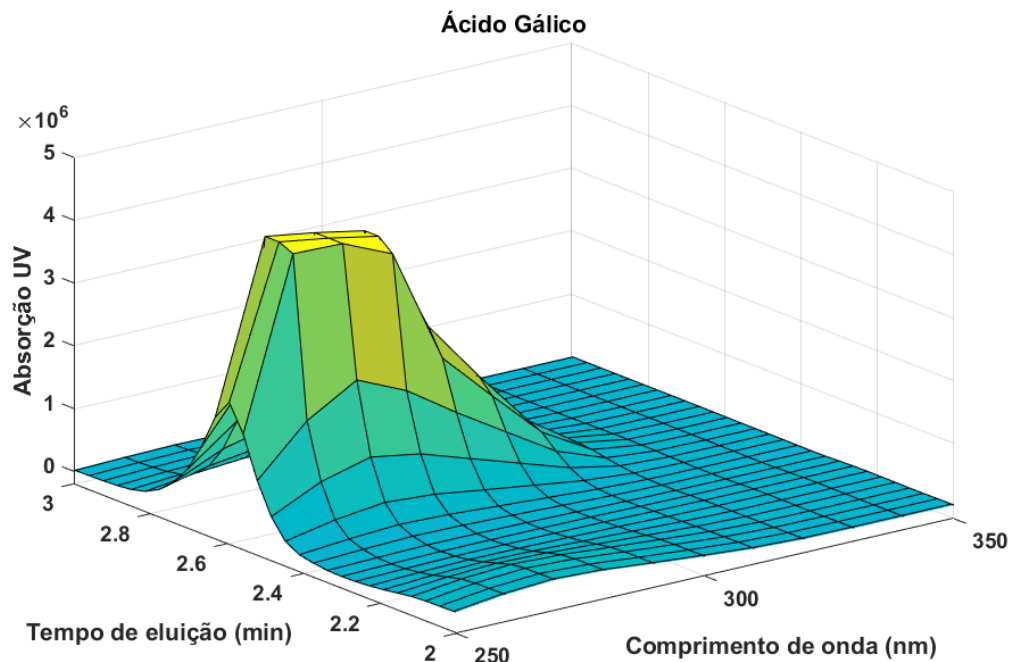


Figura 27: Análise HPLC-DAD do padrão de ácido gálico para comparação com o perfil fenólico observado em extratos de subprodutos de amêndoa.

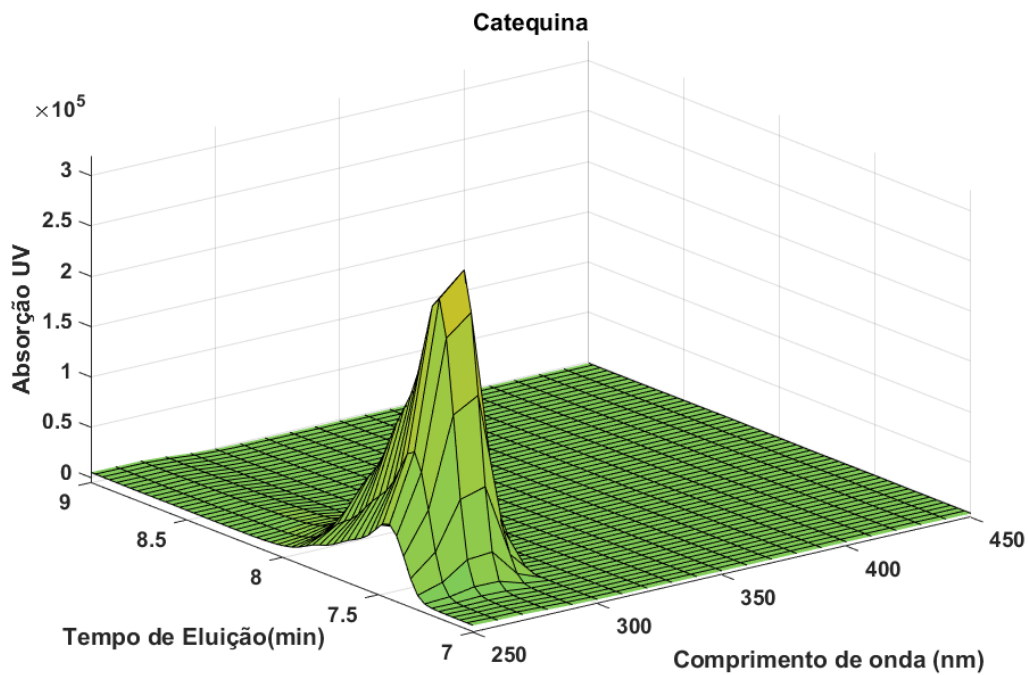


Figura 28: Análise HPLC-DAD do padrão de catequina para comparação com o perfil fenólico observado em extratos de subprodutos de amêndoa.

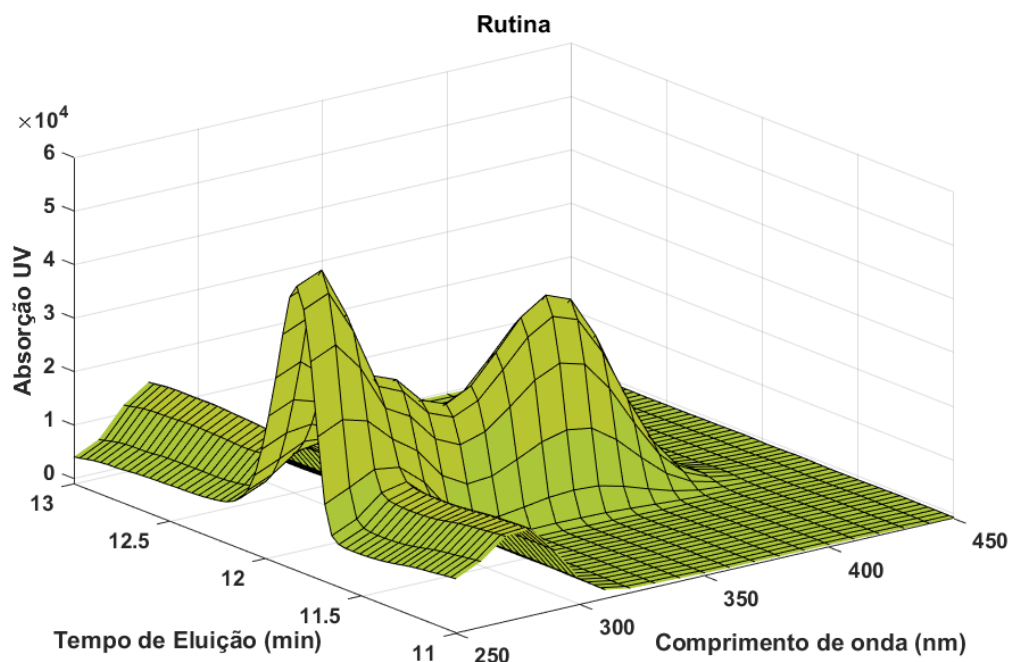


Figura 29: Análise HPLC-DAD do padrão de rutina para comparação com o perfil fenólico observado em extratos de subprodutos de amêndoa

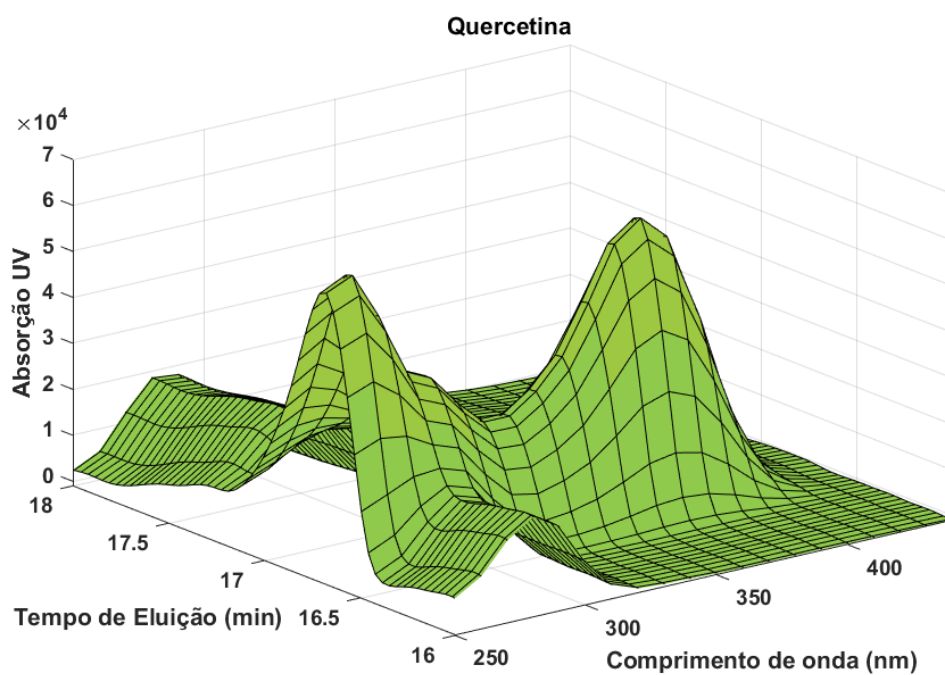


Figura 30: Análise HPLC-DAD do padrão de quercetina para comparação com o perfil fenólico observado em extratos de subprodutos de amêndoa.

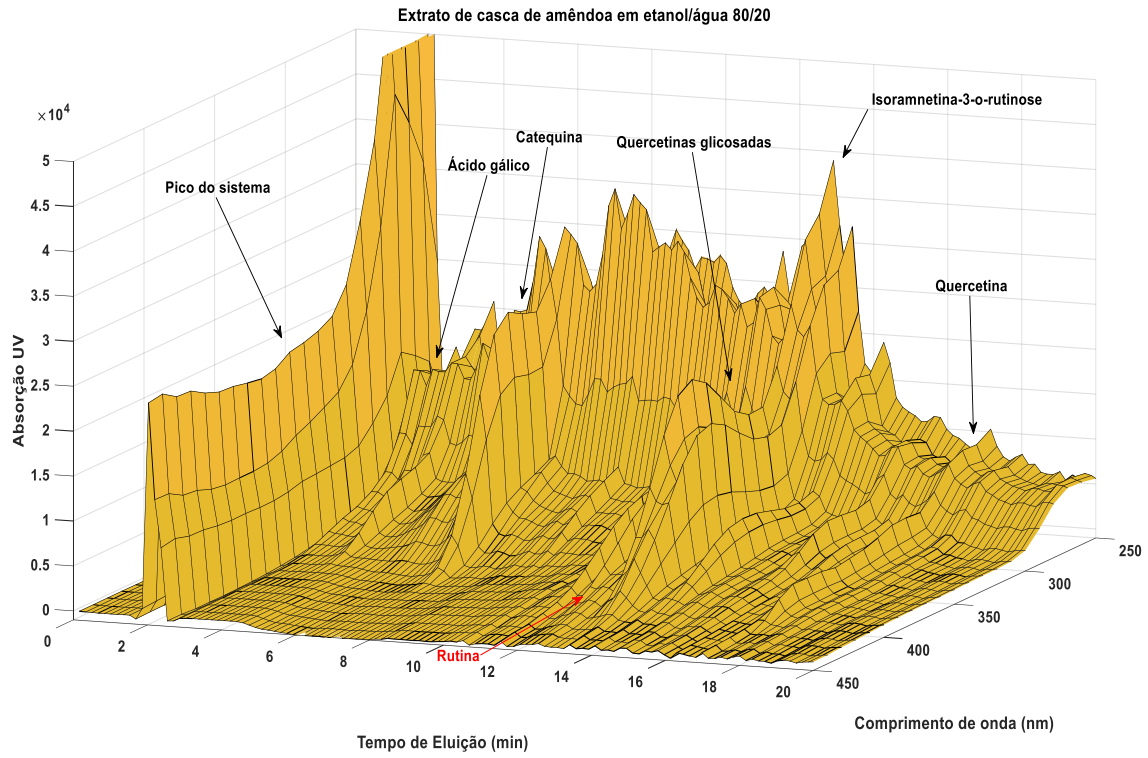


Figura 31: Análise HPLC-DAD do extrato de casca de amêndoa (*shell*) em etanol/água 80/20 produzido neste trabalho.

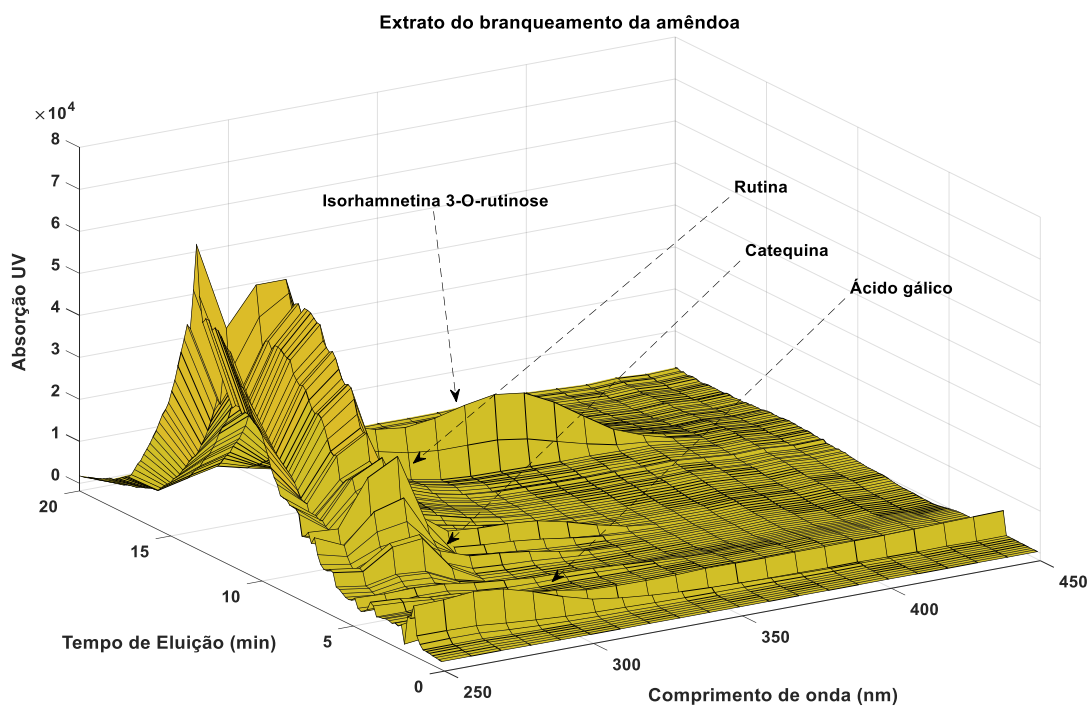


Figura 32: Análise HPLC-DAD do extrato aquoso do branqueamento da amêndoa produzido neste trabalho.

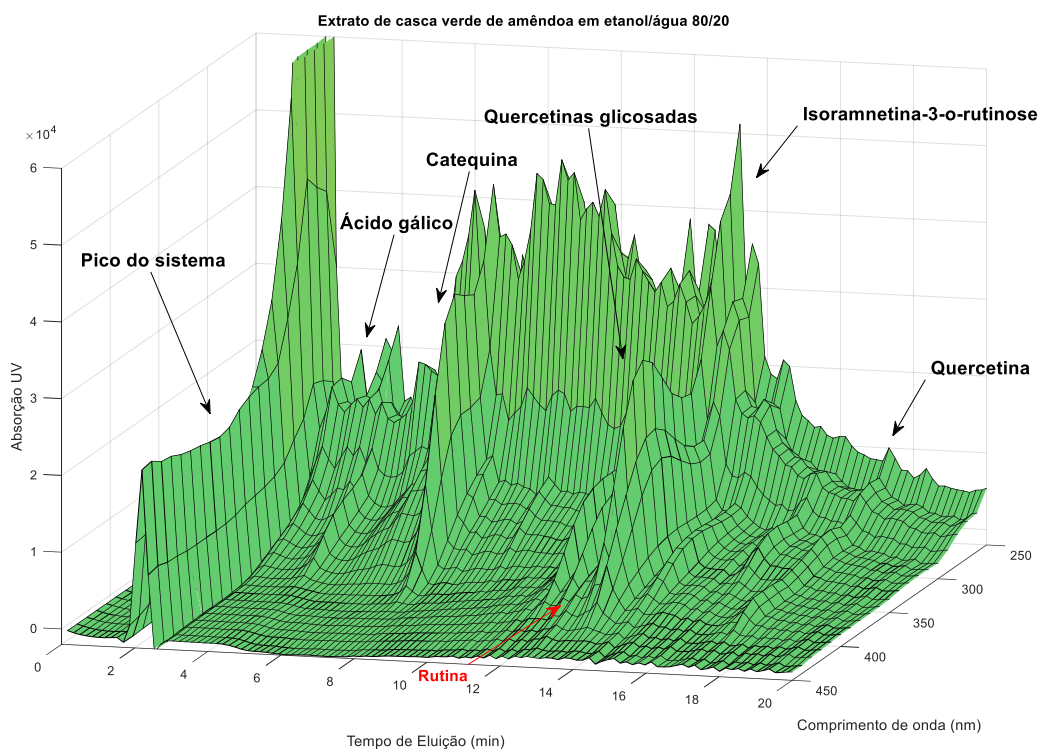


Figura 33: Análise HPLC-DAD do extrato de casca verde de amêndoa (*hull*) em etanol/água 80/20 produzido neste trabalho.

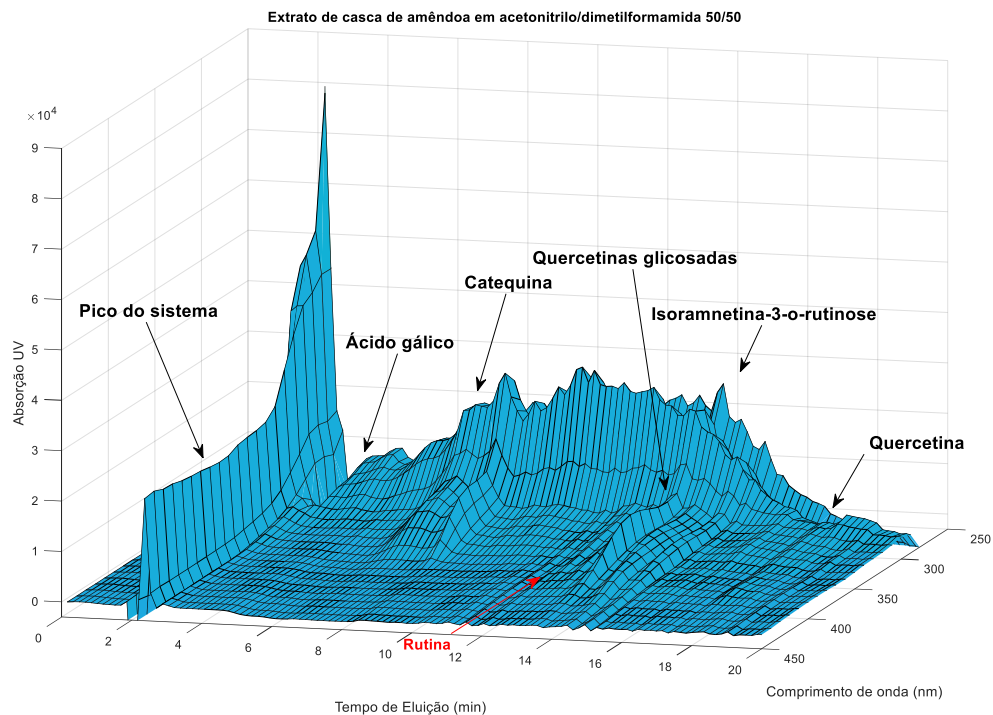


Figura 34: Análise HPLC-DAD do extrato de casca de amêndoa (*shell*) em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 produzido neste trabalho.

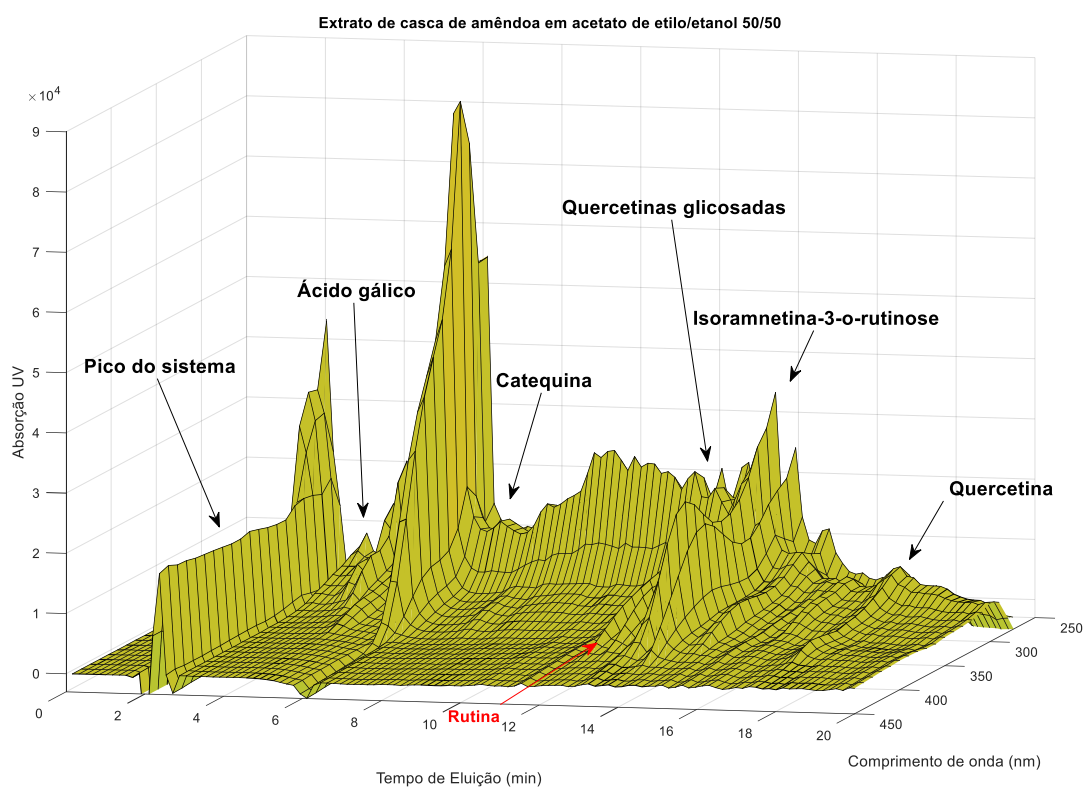


Figura 35: Análise HPLC-DAD do extrato de casca de amêndoa (*shell*) em acetato de etilo/etanol 50/50 produzido neste trabalho.

5.3. Testes de retenção de polifenóis com extratos da casca exterior da amêndoa (*shell*) em etanol/água 80/20

Na Figura 36 apresentam-se resultados da análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no material MIP-RUT-2. Este material foi aqui considerado para efeitos ilustrativos e análises HPLC-DAD correspondentes ao teste de retenção SPE com outros adsorventes podem ser encontradas no Apêndice A deste trabalho. Devido à morfologia inadequada para operação em modo contínuo (ex. tamanho de partículas impedindo o escoamento SPE ou partículas demasiado pequenas permitindo a sua passagem através dos filtros), alguns dos adsorventes descritos na Tabela 6 não foram incluídos nestes testes (MIP-QUER-2, MIP-POL-1, NIP1, NIP2).

Os resultados apresentados na Figura 36 demonstram a capacidade do adsorvente para reter diretamente polifenóis presentes no extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20. As medições a diferentes comprimentos de onda ($\lambda=280, 320, 360$ e 380 nm) ilustram a diversidade de compostos fenólicos retidos na rede de polímero fabricada (ex. ver Figura 31 para análise espectral do extrato de casca de amêndoa).

As áreas dos cromatogramas do extrato original (linhas a azul) e após a sua adsorção SPE no material MIP-RUT-2 (linhas a vermelho) foram utilizadas para calcular a percentagem de polifenóis retidos neste processo. Uma análise similar foi feita para os restantes adsorventes utilizados (ver resultados no Apêndice A). Na Figura 37 são apresentados os resultados de retenção globais agregados para os testes SPE realizados com o extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20. Esses resultados mostram que os adsorventes produzidos com base em 4VP (com e sem impressão molecular) têm a capacidade de reter de forma apreciável os polifenóis presentes no extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20. Confirma-se assim, com subprodutos da amêndoa, a capacidade destes materiais para processar diretamente extratos com baixo teor de água, conforme demonstrado anteriormente com outros sistemas [5,33,38]. Estes resultados revestem-se de importância acrescida quando comparados com o desempenho de outros adsorventes comerciais muitas vezes utilizados na valorização de extratos vegetais, nomeadamente as resinas DAX-8, XAD4 e XAD7HP. De facto, conforme ilustrado na Figura 37, estes materiais comerciais apresentam uma baixa retenção de polifenóis

presentes no extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20. Desta forma, os adsorventes baseados em 4VP aqui considerados podem ser utilizados no projeto de processos de valorização de subprodutos de amêndoa com maior eficiência dada a possibilidade de trabalhar com concentrações de polifenóis mais elevadas (solubilidade destes compostos diminui em sistemas aquosos) e evitar a maior complexidade dos processos de adsorção/desorção (elevado número de etapas intermédias), gerando flexibilidade e poupança energética.

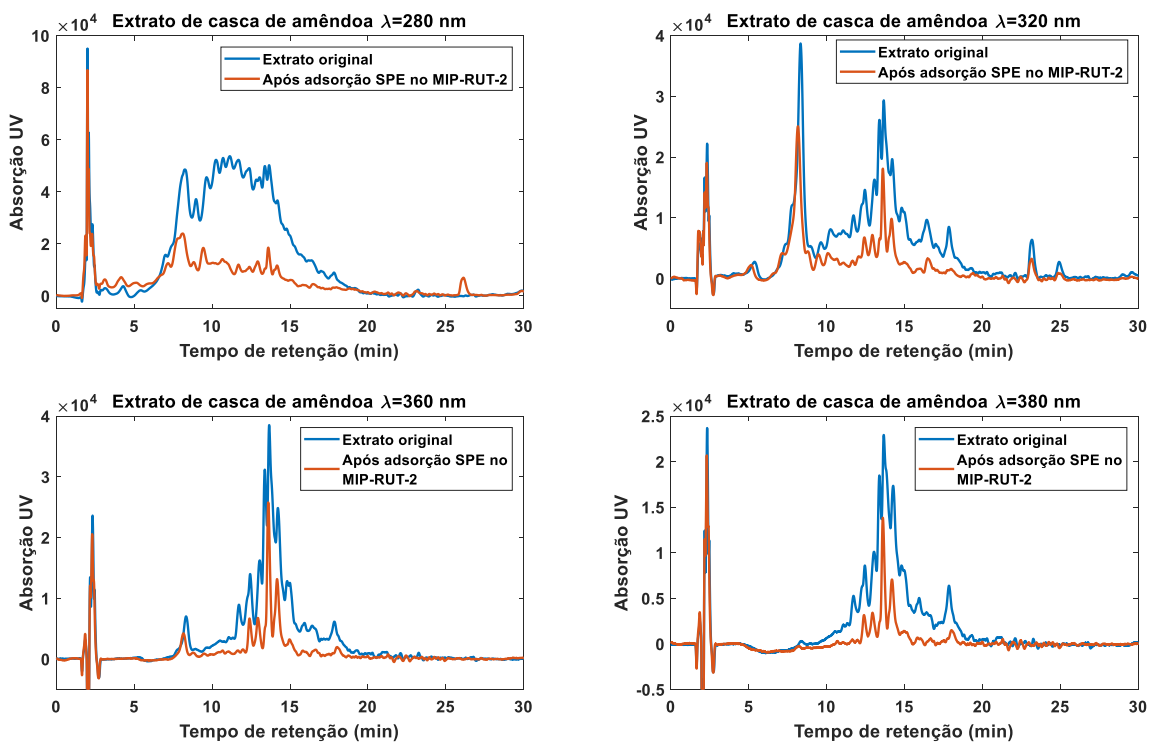


Figura 36: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-2.

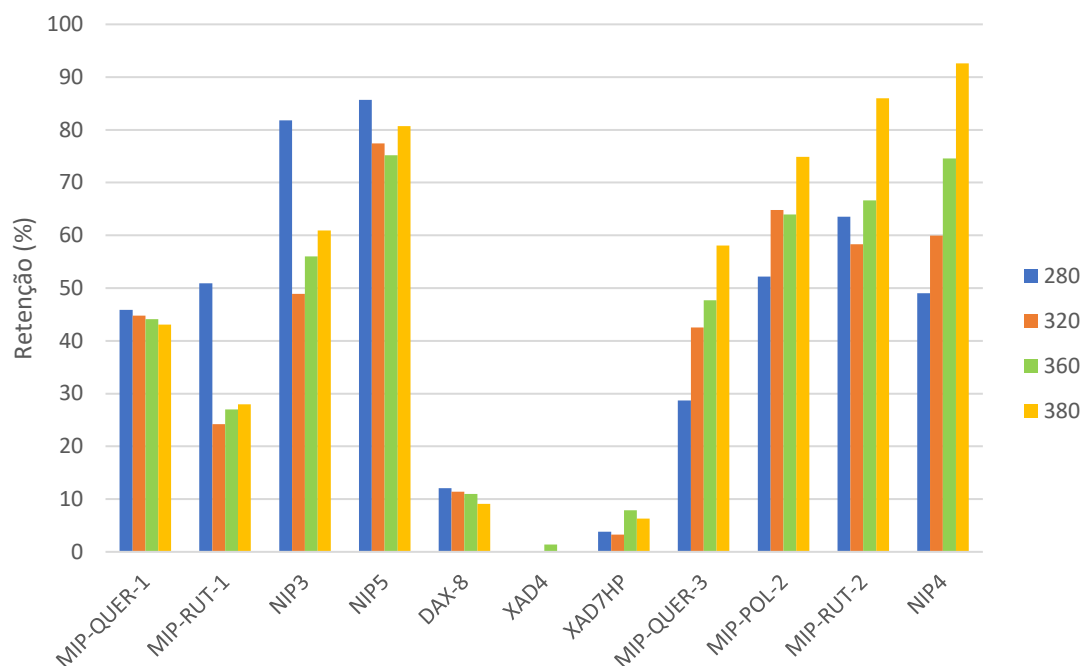


Figura 37: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos etanol/água 80/20 de casca exterior da amêndoa (*shell*).

5.4. Testes de retenção de polifenóis com extratos da casca verde da amêndoa (*hull*) em etanol/água 80/20

Na Figura 38 apresentam-se os resultados globais agregados para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos etanol/água 80/20 de casca verde da amêndoa (*hull*). Estes resultados decorrem da análise por HPLC-DAD do extrato após processamento em SPE. As análises HPLC-DAD correspondentes aos diversos adsorventes utilizados podem ser encontradas no Apêndice B deste trabalho.

Os resultados apresentados na Figura 38 confirmam com extratos etanol/água 80/20 de casca verde (*hull*) as observações acima reportadas com extratos etanol/água 80/20 de casca de amêndoa (*shell*), nomeadamente no que diz respeito à capacidade dos adsorventes baseados em 4VP para reter polifenóis mesmo quando presentes em extratos com baixo teor de água (etanol/água 80/20 neste caso). As vantagens dos adsorventes 4VP relativamente a resinas comerciais (DAX-8, XAD4, XAD7HP) ficam também evidenciadas na Figura 38. Estas observações reforçam a possibilidade de desenvolver novos processos de valorização de subprodutos de amêndoa considerando adsorventes baseados em 4VP (com/sem impressão molecular).

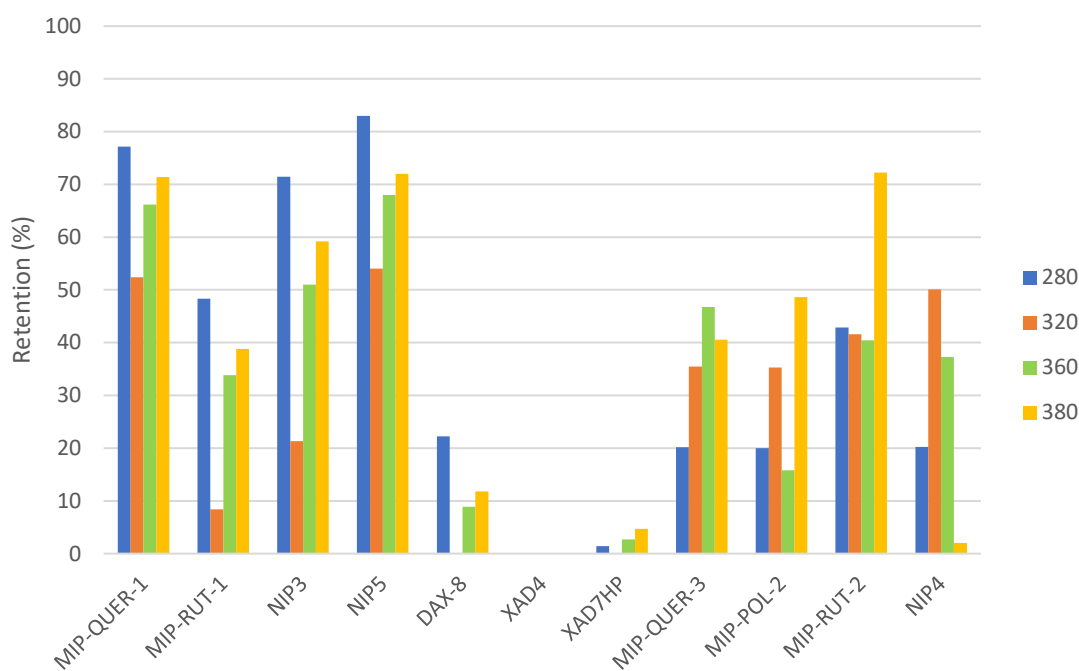


Figura 38: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos etanol/água 80/20 de casca verde da amêndoa (*hull*).

5.5. Testes de retenção de polifenóis com extratos aquosos do branqueamento da amêndoa (*blanching*)

Na Figura 39 apresentam-se os resultados globais agregados para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos aquosos do branqueamento da amêndoa (*blanching*). Como anteriormente, estes resultados decorrem da análise por HPLC-DAD do extrato após processamento em SPE com diferentes materiais. As análises HPLC-DAD correspondentes aos diversos adsorventes utilizados podem ser encontradas no Apêndice C deste trabalho.

Os resultados apresentados na Figura 39 demonstram de forma clara o efeito das interações hidrofóbicas (note-se que o solvente é agora aquoso) na retenção dos polifenóis. De facto, o desempenho de resinas comerciais (DAX8-8, XAD4, XAD7HP) é agora superior comparativamente ao observado com os mesmos materiais para solventes orgânicos (as interações hidrofóbicas são um mecanismo fundamental na sua capacidade de retenção). Por outro lado, observa-se uma diminuição da taxa de retenção de polifenóis com alguns MIPs

sintetizados (ex. MIP-QUER-1, MIP-RUT-1, MIP-POL-2) o que poderá decorrer da sua perda de especificidade em meios aquosos. No entanto outros adsorventes baseados em 4VP revelam um desempenho notável mesmo em meio aquoso (ex. MIP-RUT-2) o que demonstra o efeito das condições de síntese no seu desempenho.

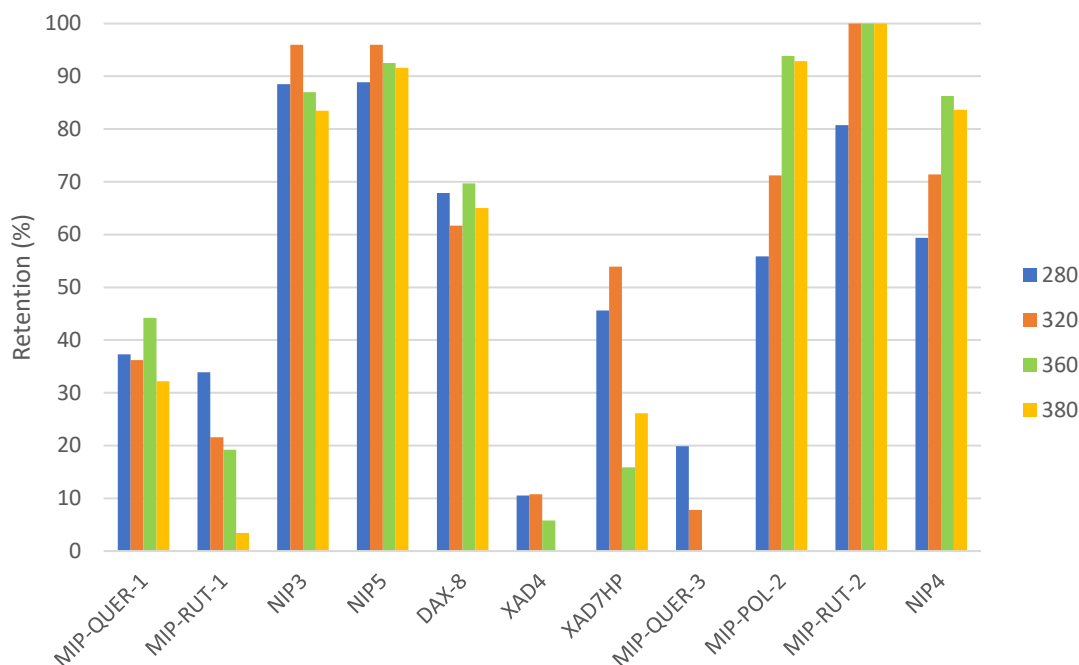


Figura 39: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos aquosos do branqueamento da amêndoa (*blanching*).

5.6. Testes de retenção de polifenóis com extratos da casca exterior da amêndoa (*shell*) em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50

Na Figura 40 apresentam-se os resultados globais agregados para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos da casca exterior da amêndoa (*shell*) em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50. Também aqui, os resultados globais decorrem da análise por HPLC-DAD do extrato após processamento em SPE com diferentes materiais. As análises HPLC-DAD correspondentes aos diversos adsorventes utilizados podem ser encontradas no Apêndice D deste trabalho.

Os resultados aqui apresentados diferem substancialmente dos ilustrados nas secções anteriores devido ao efeito do solvente do extrato. De facto, a taxa de retenção observada nos diferentes adsorventes com acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 é substancialmente menor.

Essa diminuição decorre do forte efeito de eluição que a dimetilformamida provoca para grande parte dos polifenóis originando o deslocamento da partição dos solutos entre fases sólido/líquido para a fase líquida.

Apesar da diminuição de retenção de polifenóis esperável devido à presença da dimetilformamida, é possível que estes resultados estejam influenciados pela eluição de polifenóis adsorvidos em testes anteriores quando é passado um solvente com elevada capacidade de eluição. Alguns dos cromatogramas apresentados no Apêndice D parecem de facto demonstrar a eluição de compostos retidos em testes anteriores quando se usa acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 (este efeito é mais evidente nas medições a 280 nm).

Desta forma, poderá ser útil em trabalhos futuros a reavaliação do desempenho dos adsorventes quando são usados solventes com forte poder de eluição como a dimetilformamida.

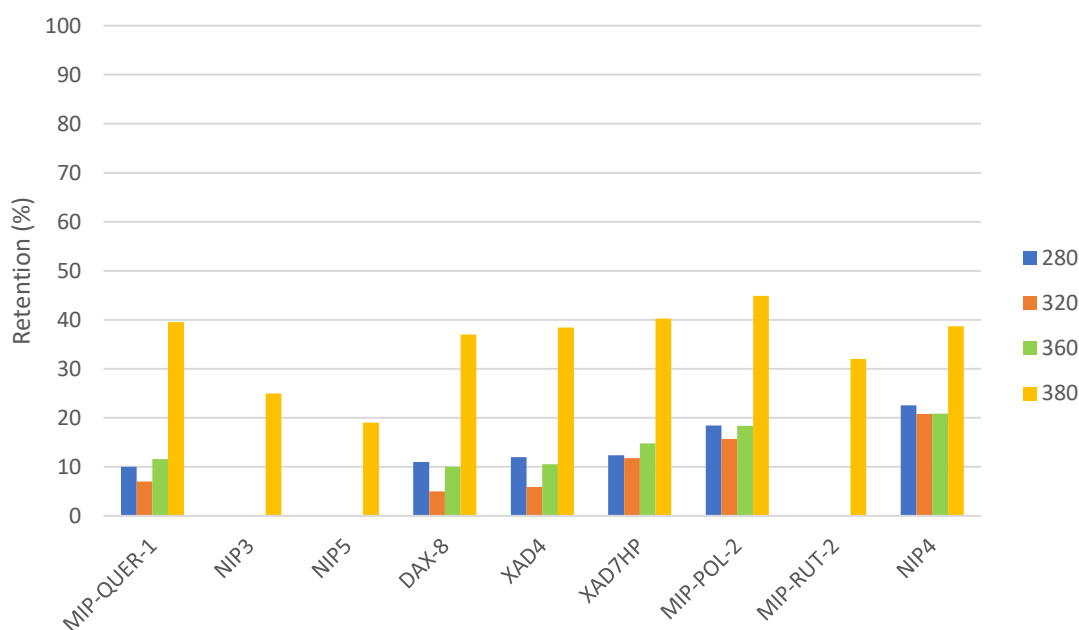


Figura 40: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 de casca exterior da amêndoa (*shell*).

5.7. Testes de retenção de polifenóis com extratos da casca exterior da amêndoa (*shell*) em acetato de etilo/etanol 50/50

Na Figura 41 apresentam-se os resultados globais agregados para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos da casca exterior da amêndoa (*shell*) em acetato de etilo/etanol 50/50. Novamente, os resultados globais decorrem da análise por HPLC-DAD do extrato após processamento em SPE com diferentes materiais. As análises HPLC-DAD correspondentes aos diversos adsorventes utilizados podem ser encontradas no Apêndice E deste trabalho.

Note-se que, tal como mencionado anteriormente, neste trabalho foram considerados extratos de subprodutos de amêndoa em diferentes solventes para avaliar o efeito deste parâmetro no seu processamento em conjunto com os diferentes adsorventes utilizados. Adicionalmente, as aplicações finais dos polifenóis podem também requerer a utilização de uma gama específica de solventes. Por exemplo, a utilização de misturas acetato de etilo/etanol é em princípio viável para a utilização dos produtos na indústria farmacêutica.

Os resultados apresentados na Figura 41 mostram novamente a importância do solvente no desempenho dos adsorventes considerados para retenção dos polifenóis. Note-se novamente o baixo desempenho das resinas comerciais (DAX8-8, XAD4, XAD7HP) comparativamente aos materiais baseados em 4VP (impressos e não impressos molecularmente). De facto, com a mistura orgânica aqui considerada (acetato de etilo/etanol) o efeito das interações hidrofóbicas no processo de retenção é negligenciável e predomina a forte interação entre os grupos piridil dos adsorventes baseados em 4VP e os polifenóis.

Os resultados apresentados nas secções 5.3-5.7 mostram o bom desempenho dos adsorventes baseados 4VP para a retenção de polifenóis quando são consideradas diferentes extratos de subprodutos de amêndoa, nomeadamente com relação aos solventes utilizados. Desta forma, estes materiais poderão ser considerados no projeto e otimização de processos mais eficientes e flexíveis para valorização de polifenóis presentes em subprodutos da amêndoa.

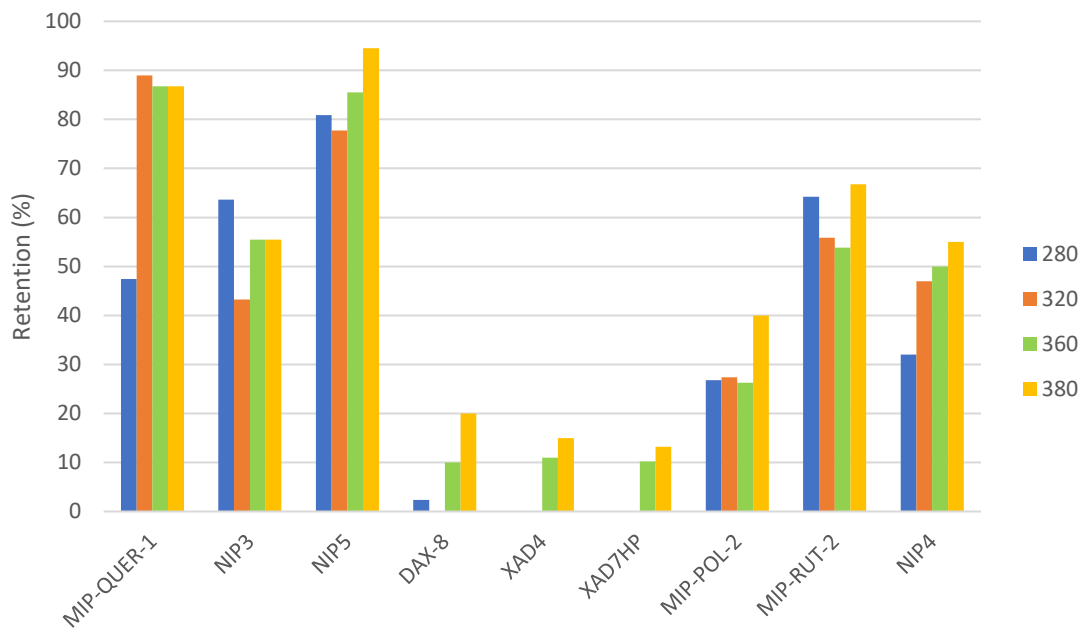


Figura 41: Resultados globais para a retenção em diferentes adsorventes de polifenóis presentes em extratos acetato de etilo/etanol 50/50 de casca exterior da amêndoa (*shell*).

5.8. Dinâmica de adsorção de polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa considerando processos fechados e processos contínuos

Após a avaliação geral apresentada nas secções anteriores, o desempenho de alguns dos materiais considerados neste trabalho foi testado através da sua utilização em processos de adsorção fechados e processos contínuos. Em concreto, foi medida a dinâmica de adsorção de polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa nas seguintes condições:

- (i) Operação em tanque fechado
- (ii) Operação contínua em coluna SPE
- (iii) Operação em tanque contínuo

Os resultados obtidos neste contexto são apresentados nas Figuras 42-44 onde constam também as respetivas condições de operação. Tendo em consideração o melhor desempenho global observado nas diferentes condições testadas para retenção de polifenóis, o material MIP-RUT-2, adsorvente baseado em 4VP molecularmente impresso com rutina através de polimerização por suspensão inversa (ver Tabela 1), foi selecionado como referência nestes estudos. Para efeitos comparativos, materiais como DAX8, MIP-QUER-1 ou MIP-POL-2 foram também incluídos nos estudos de dinâmica de adsorção reportados nas Figuras 42-44.

Os resultados obtidos demonstram a capacidade dos adsorventes 4VP para reter polifenóis considerando condições de operação flexíveis (*batch*, coluna SPE, tanques contínuos) e reforçam a sua potencial utilidade para valorização de subprodutos da amêndoa. Os resultados obtidos neste contexto demonstram também o superior desempenho do adsorvente MIP-RUT-2 comparativamente a materiais alternativos (ver Figuras 42 e 43 mostrando uma maior retenção de polifenóis com MIP-RUT-2) e realçam a importância das condições de síntese nas propriedades específicas dos materiais.

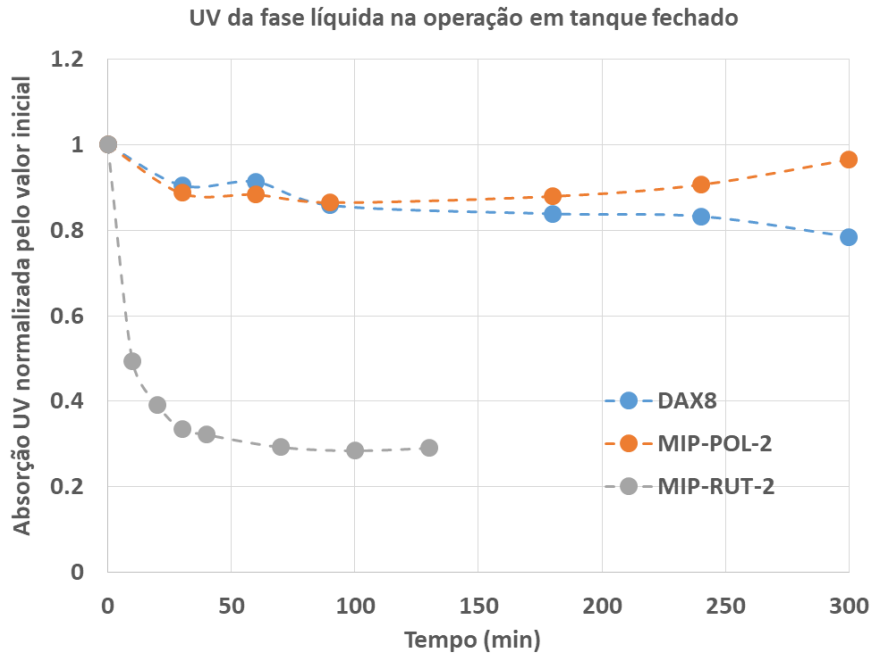


Figura 42: Dinâmica de adsorção observada experimentalmente no processamento de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa em tanque fechado com os materiais DAX8, MIP-POL-2 e MIP-RUT-2. Condições de operação: massa de adsorvente $m=1$ g e volume de fase líquida no tanque $V=25$ mL. Absorção UV medida a 280 nm.

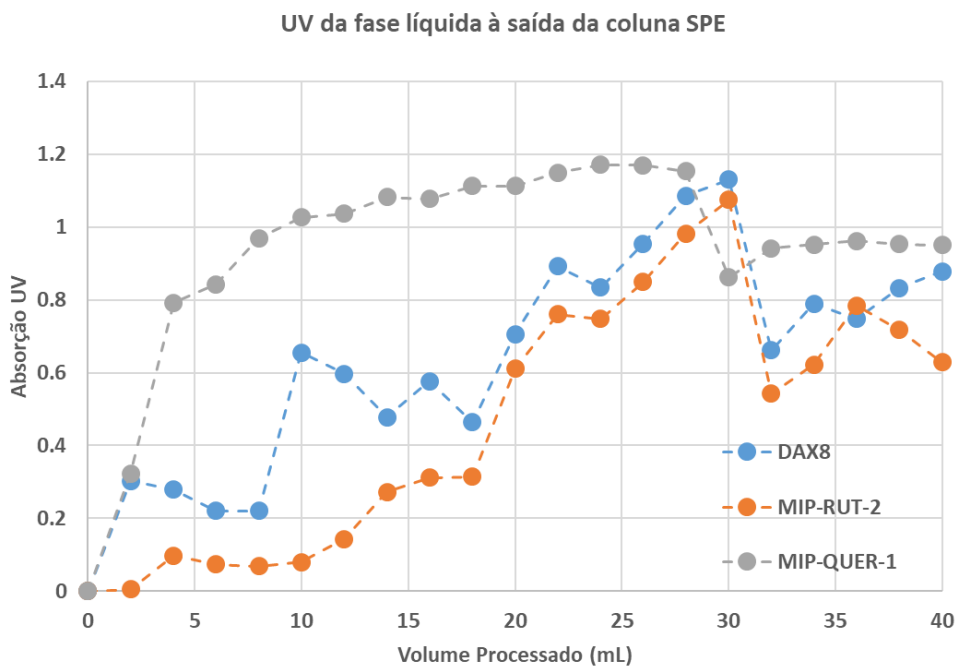


Figura 43: Dinâmica de adsorção observada experimentalmente no processamento de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa em coluna SPE com os materiais DAX8, MIP-RUT-2 e MIP-QUER-1. Operação com 200 mg de cada adsorvente na coluna SPE e absorção UV medida a 280 nm

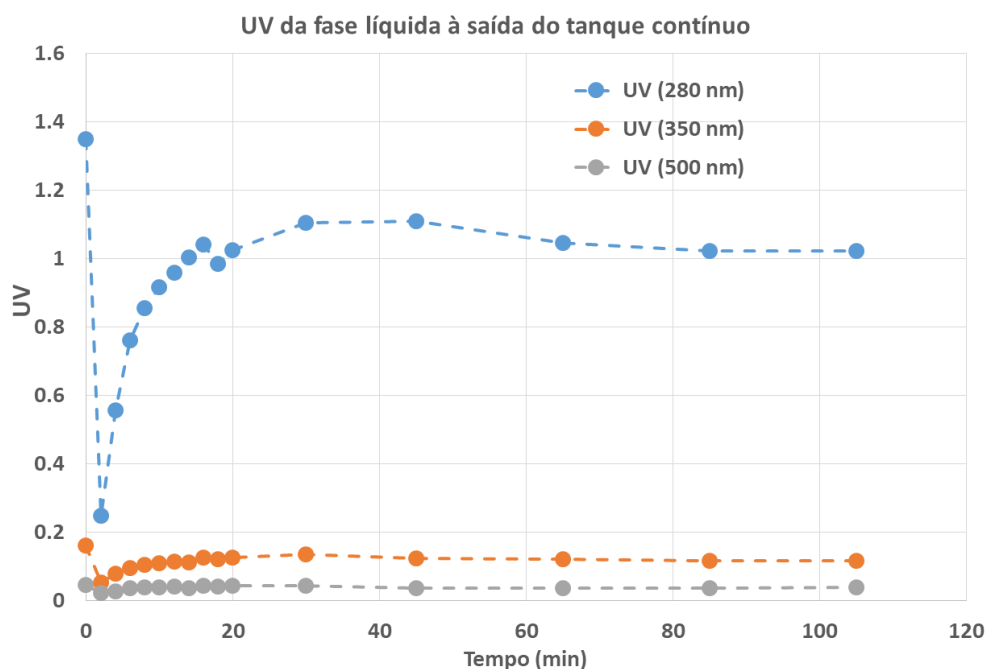


Figura 44: Dinâmica de adsorção observada experimentalmente no processamento de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa em tanque contínuo com o material MIP-RUT-2. Condições de operação: caudal de processamento $Q=1$ mL/min, massa de adsorvente $m=1$ g e volume de fase líquida no tanque $V=25$ mL.

5.9. Concentração, purificação e fracionamento de polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa

Após a demonstração da capacidade dos adsorventes baseados em 4VP para reter polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa, foi analisado o processo de concentração, purificação e fracionamento dessas moléculas que pode ser alcançado por adsorção/desorção. Para esse efeito, após saturação do adsorvente (ver exemplos na secção 5.8) foram considerados diferentes passos de desorção envolvendo a variação do solvente de eluição e/ou temperatura, nomeadamente a seguinte sequência a 50 °C:

- 1 – Água
- 2- Metanol/água 50/50
- 3- Metanol/água 80/20
- 4- Metanol/água 95/05
- 5- Metanol/ácido acético 90/10
- 6- Metanol/água(pH=2) 90/10

Nas Figuras 45 a 48 são apresentados resultados obtidos neste contexto considerando o processamento de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa com o adsorvente MIP-RUT-2. A Figura 45 mostra a representação 3D da análise HPLC-DAD para a fração recolhida em metanol/ácido acético 90/10 após saturação do adsorvente (ver exemplos na secção 5.8). A comparação da Figura 45 com a correspondente ao extrato original (Figura 32) permite observar o importante efeito de concentração alcançado com o processamento do extrato. Esse efeito fica também evidente nas Figuras 46-48 onde são comparados os cromatogramas 2D da fração recolhida e do extrato original fixando os comprimentos de onda a 280, 320 e 380 nm.

As Figuras 45-48 mostram também a possibilidade de usar processos de adsorção/desorção dos extratos de amêndoa para purificar e fracionar os polifenóis aí contidos. Outros compostos, como por exemplo açúcares (não observáveis por análise UV), são removidos dos extratos nas frações aquosas (ver sequência de eluição acima descrita começando com solventes aquosos). Caso uma separação mais restrita entre os polifenóis individuais seja necessária (resultados nas Figuras 45-48 mostram neste caso a obtenção de uma fração rica em isoramnetina-3-O-rutinose), ciclos adicionais de adsorção/desorção deverão ser considerados com uma sequência de variação de solvente/temperatura desenhada para o efeito pretendido.

Os resultados nas Figuras 45-48 mostram também a utilidade do processo de adsorção/desorção desenvolvido para aumentar a sustentabilidade na valorização dos polifenóis contidos em subprodutos de amêndoa. De facto, mostra-se que é possível a mudança desses compostos de um solvente aquoso para um solvente orgânico em simultâneo com a sua concentração. O processo de adsorção/desorção considerado envolve baixos custos energéticos e evita a alternativa energeticamente mais dispendiosa que seria necessário realizar para obtenção de um resíduo sólido de polifenóis através da evaporação da água.

Fracção recolhida em Metanol/Ácido acético após adsorção no MIP-RUT-2

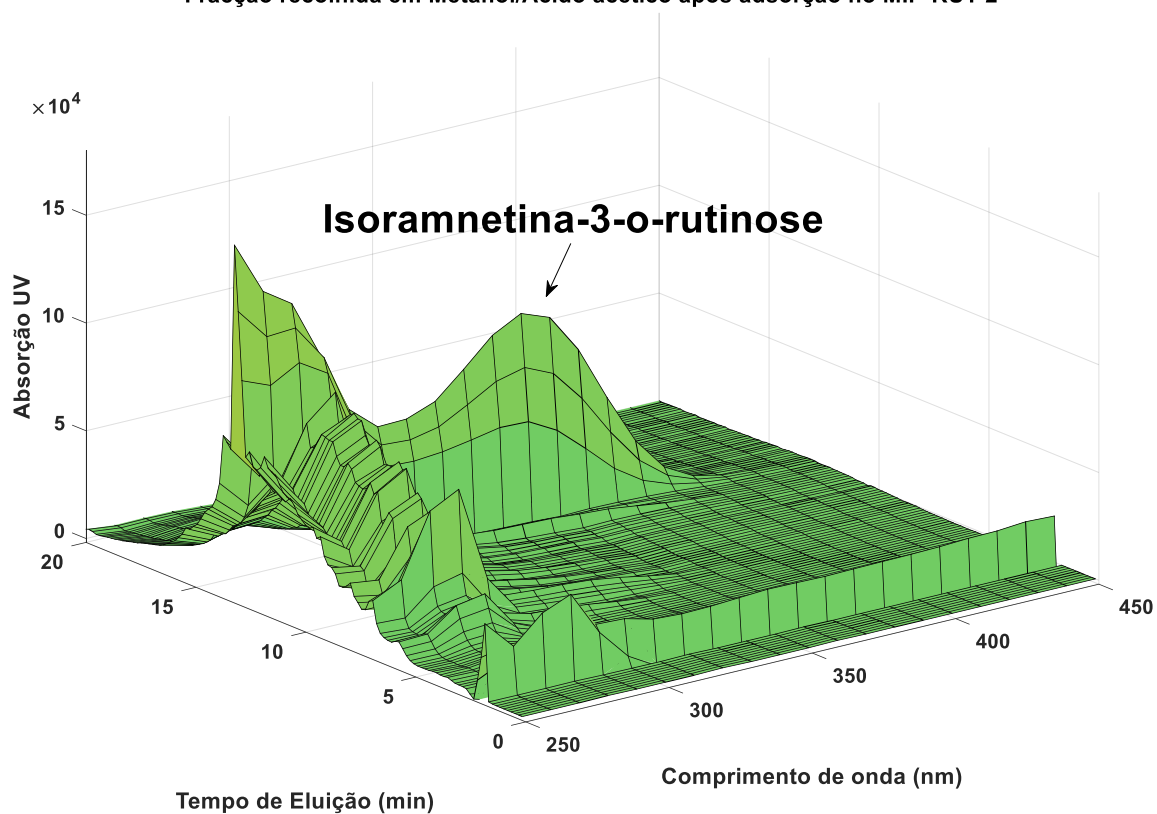


Figura 45: Análise HPLC-DAD de uma fracção recolhida em metanol/ácido acético 90/10 após saturação do adsorvente MIP-RUT-2 com um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa.

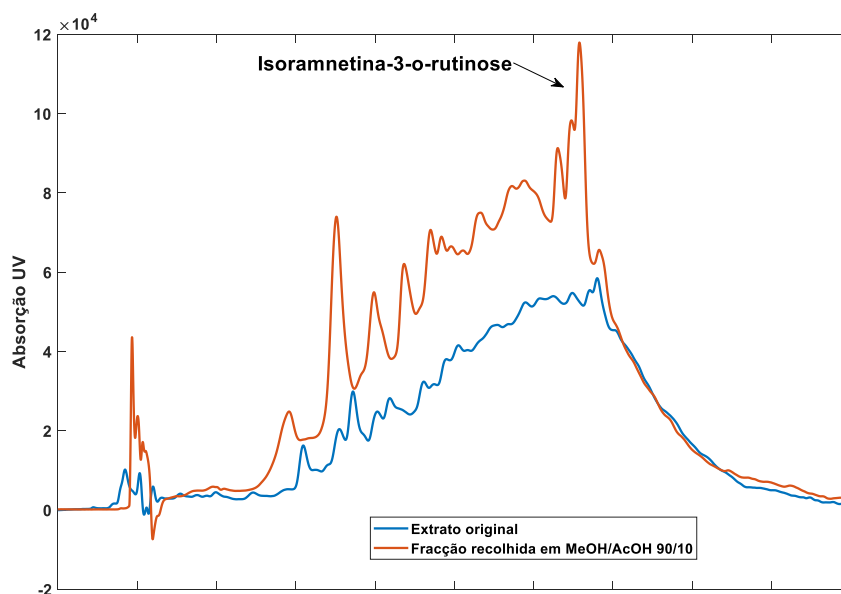


Figura 46: Análise HPLC-DAD de uma fracção recolhida em metanol/ácido acético 90/10 após saturação do adsorvente MIP-RUT-2 com um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa. É também apresentada a análise HPLC-DAD do extrato original. Absorção UV a 280 nm.

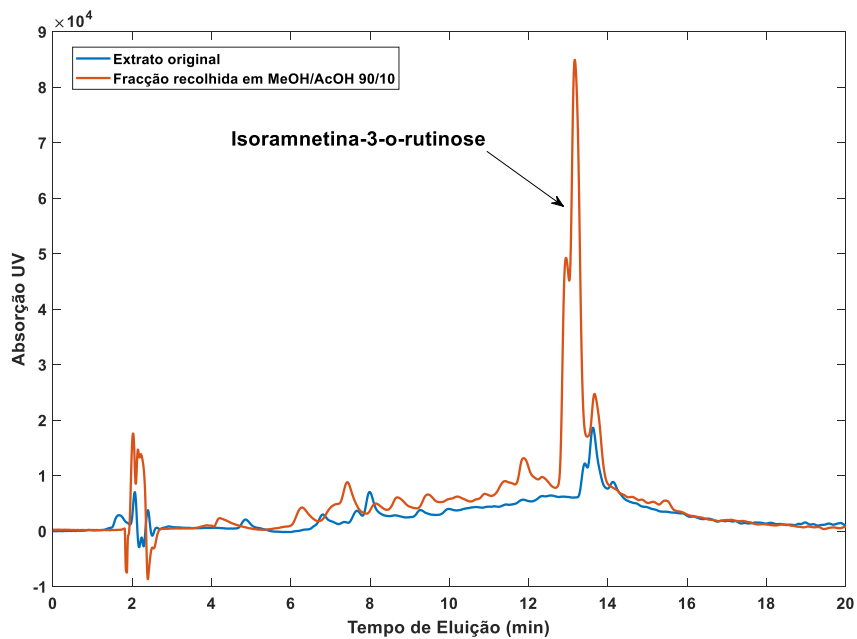


Figura 47: Análise HPLC-DAD de uma fração recolhida em metanol/ácido acético 90/10 após saturação do adsorvente MIP-RUT-2 com um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa. É também apresentada a análise HPLC-DAD do extrato original. Absorção UV a 320 nm.

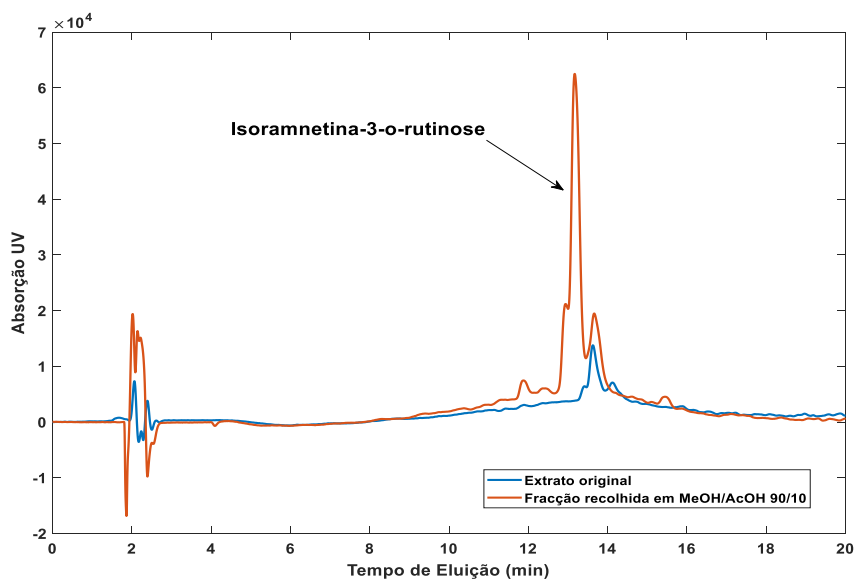


Figura 48: Análise HPLC-DAD de uma fração recolhida em metanol/ácido acético 90/10 após saturação do adsorvente MIP-RUT-2 com um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa. É também apresentada a análise HPLC-DAD do extrato original. Absorção UV a 380 nm.

Capítulo 6

6. Conclusão

Neste trabalho foi realizada a avaliação de adsorventes molecularmente impressos para a concentração, fracionamento e purificação de polifenóis contidos em extratos de subprodutos da amêndoa. Foram considerados doze materiais sintetizados em condições diferentes no que respeita à presença de moléculas molde de polifenóis, composição química e técnica de polimerização (ex. polimerização por precipitação e por suspensão inversa). Neste contexto, foram incluídos adsorventes com e sem impressão molecular. Em todos os casos, foi explorada a forte interação com muitos polifenóis do grupo piridil, presente em redes de polímero produzidas com o monómero funcional 4-vinilpiridina. Os testes realizados incluíram também resinas comerciais geralmente utilizadas para recuperar polifenóis presentes em extratos vegetais, nomeadamente os adsorventes DAX-8, XAD4 e XAD7HP.

Este trabalho incluiu a produção de diferentes extratos de subprodutos de amêndoa, nomeadamente extratos de casca de amêndoa (*shell*) em etanol/água 80/20, acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 e acetato de etilo/etanol 50/50, extratos de casca verde de amêndoa (*hull*) em etanol/água 80/20 e um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa (*blanching*). Procurou-se assim explorar diferentes possibilidades para a valorização de subprodutos da amêndoa através da variação do seu perfil em compostos fenólicos. Os diferentes extratos foram analisados por HPLC-DAD para uma identificação simples dos compostos presentes.

Foram realizados testes de retenção dos polifenóis presentes nos diversos extratos de subprodutos de amêndoa produzidos, envolvendo adsorventes molecularmente impressos (MIP), não-impressos (NIP) bem como resinas comerciais, e considerando a técnica de extração em fase sólida (SPE). A análise por HPLC dos extratos antes e após adsorção SPE foi usada para avaliar a retenção alcançada para os polifenóis nas diversas condições de trabalho consideradas (combinações extrato/adsorvente). De uma forma geral, os resultados obtidos mostram a elevada capacidade dos adsorventes contendo o monómero funcional 4-vinilpiridina para reter polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa de natureza muito diferente quanto ao solvente utilizado (ex. solventes puramente orgânicos ou sistemas aquosos). A capacidade de retenção de polifenóis destes adsorventes, observada numa ampla gama de

condições de operação, decorre da forte interação entre os grupos piridil presentes nessas redes de polímero e as moléculas de alvo. Por outro lado, as resinas comerciais consideradas apresentam uma capacidade elevada de retenção de polifenóis apenas em meio aquoso. Este facto surge em consequência do mecanismo de retenção de polifenóis com estes adsorventes se basear principalmente em interações hidrofóbicas.

Os resultados obtidos mostram que os adsorventes baseados 4-vinilpiridina podem ser usados para projetar novos processos de adsorção/desorção visando valorização de polifenóis presentes de subprodutos de amêndoa. Este trabalho demonstra que esses adsorventes devem permitir o desenvolvimento de processos melhoradas para a recuperação de polifenóis que apresentam:

- i) Maior simplicidade devido à possibilidade de manipular diretamente extratos de diferentes naturezas quanto ao tipo de solvente (orgânico/aquoso) e não apenas extratos de carácter aquoso.
- ii) Maior flexibilidade devido às múltiplas opções no tipo de extrato processado e correspondente perfil de compostos fenólicos.
- iii) Maior eficiência devido à possibilidade de processar extratos com elevada concentração em compostos fenólicos, dado que estes apresentam em geral maior solubilidade em solventes orgânicos.
- iv) Maior seletividade que poderá ser alcançada através do efeito de impressão molecular.

Neste trabalho foi também estudada a dinâmica de adsorção de polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa considerando processos fechados e processos contínuos, nomeadamente tanques fechados, tanques contínuos e operação em coluna de SPE. Estes estudos visaram avaliar em pequena escala a potencialidade dos adsorventes para serem considerados em processos industriais de valorização de extratos de subprodutos de amêndoa. Neste contexto, foram considerados diferentes materiais, mas os testes focaram-se num polímero molecularmente impresso com rutina como polifenol molde e obtido por polimerização em suspensão inversa (MIP-RUT-2). Este adsorvente demonstrou um bom desempenho combinado nas diferentes condições de operação testadas.

Por último, foi testada a concentração, purificação e fracionamento de polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa considerando o adsorvente MIP-RUT-2 com um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa (*blanching*) como caso de estudo. Os resultados obtidos

com o processo de adsorção/desorção implementado demonstram a possibilidade efetiva de concentrar, fracionar e realizar a mudança de solvente (com maior eficiência energética) para polifenóis presentes em extratos de subprodutos de amêndoa. A título ilustrativo demonstrou-se a obtenção de uma fração enriquecida em isoramnetina-3-O-rutinoze.

Em trabalhos futuros sugere-se o estudo do grau de seletividade entre diferentes compostos fenólicos de subprodutos da amêndoa que é possível obter com adsorventes molecularmente impressos (MIPs) relativamente aos análogos não impressos (NIPs) bem como o desenho de condições de desorção particulares (projeto de gradientes de solventes/temperatura) para fracionamento mais específico dos compostos bioativos.

Referências bibliográficas:

- [1] <http://vozdocampo.pt/2018/11/12/a-amendoeira-estado-da-producao/>, (Acedido em 12 de Fevereiro de 2020).
- [2] Bolling, B. W. (2017). Almond Polyphenols: Methods of Analysis, Contribution to Food Quality, and Health Promotion. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16.
- [3] Prgomet, I., Gonçalves, B., Domínguez-Perles, R., Pascual-Seva, N., & Barros, A. I. R. N. A. (2017). Valorization Challenges to Almond Residues: Phytochemical Composition and Functional Application. *Molecules* 22, 1774
- [4] Monagas, M., Garrido, I., Lebrón-Aguilar, R., Bartolome, B., & Gómez-Cordovés, C. (2007). Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) Skins as a Potential Source of Bioactive Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8498-8507
- [5] Gomes CP, Dias RCS, Costa MRPFN. (2019) Preparation of Molecularly Imprinted Adsorbents with Improved Retention Capability of Polyphenols and Their Application in Continuous Separation Processes. *Chromatographia* ;82(6):893-916
- [6] Pinto, J. A., Prieto, M. A., Ferreira, I. CFR., Belgacem, M.N., Rodrigues, A., Barreiro, F. (2020). Analysis of the oxypropylation process of a lignocellulosic material, almond Shell, using the response surface methodology (RSM). *Industrial Crops and Products* 153
- [7] <http://www.agrotec.pt/noticias/a-evolucao-da-producao-da-amendoa-em-portugal/> (Acedido a 12 de Fevereiro de 2020)
- [8] Centro Nacional de Competências dos Frutos Secos, amêndoa, Estudo e produção e comercialização das Terras de Trás-os-Montes.
- [9] Rodrigues, Â. M., Barreira, J. C. M., Ferreira, C. F. R., Bento, A. (2020). Frutos Secos: Uma aproximação à disponibilidade de subprodutos, Centro Nacional de Competências dos Frutos Secos.
- [10] <https://pt.wikihow.com/Cultivar-Am%C3%AAndoas> (Acedido em 12 de Fevereiro de 2020).
- [11] Ramalhosa, E. C. D., Magalhães, A., & Pereira, J. A. (2017). Amendoeira: Estado da Transformação, Centro Nacional de Competências dos Frutos Secos.

- [12] Wijeratne, S.S.K.; Abou-Zaid, M.M., e Shahidi, F. (2006). Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J. Agric. Food Chem. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 312–318.
- [13] Bolling, B.W., Dolnikowski, G., Blumberg, J.B. e Oliver Chen, C.Y. (2009). Quantification of Almond Skin Polyphenols by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Journal of Food Science*. 74, C326– C332
- [14] Esfahlan, A.J.; Jamei, R. e Esfahlan, R.J. (2010). The importance of almond (*Prunus amygdalus L.*) and its by-products. *Food Chemistry* 120, 349–360
- [15] Moure, A.; Pazos, M.; Medina, I.; Domínguez, H. e Parajó, J.C. (2007). Antioxidant activity of extracts produced by solvent extraction of almond shells acid hydrolysates. *Food Chemistry*. 101, 193–201.
- [16] Balange AK, Benjakul S. (2009). Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. *LWT - Food Science and Technology*, 42:1059-1064.
- [17] Neves, P. D. O. (2015). Importância dos Compostos Fenólicos dos Frutos na Promoção da Saúde. Tese Final, Faculdade de Ciências da Saúde Universidade Fernando Pessoa.
- [18] Efraim, P., Alves, A, B., & Jardim, D. C. P. (2011). Review: Polyphenols in Cocoa and Derivatives: Factors of Variation and Health effects. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14, 1981-6723.
- [19] <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-polyphenols-market> (Acedido em 20 de Fevereiro de 2020).
- [20] Milbury, P.E., Chen, C., Dolnikowski, G.G., Blumberg, J.B. (2006). Determination of Flavonoids and Phenolics and Theirs Distribution in Almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14, 5027-5033.
- [21] Song, X., Li, J., Wang, J., & Chen, L. (2009). Quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction. *Talanta*, 80, 694-702
- [22] Becho, J. R. M., Machado, H., & Guerra M. D. O. (2009)., Rutina - Estrutura, Metabolismo e Potencial Farmacológico. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais – Animais e Humanos*. 1, 21-25.

- [23] <https://www.fciencias.com/2015/01/15/soxhlet-laboratorio-online/> (Acedido em 17 de Fevereiro de 2020).
- [24] Khoddami, Ali, Meredith A. Wilkes, and Thomas H. Roberts. 2013. "Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds." *Molecules* 18(2):2328–75.
- [25] Luz, L, P.D. (1998). Estudo do ultra-som como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos. Dissertação, Universidade Federal do Rio do Sul.
- [26] Ferreira, B. L., Chaves, E. S., Vialich, J., & Sauer, E. (2014). Ultrasound-assisted extraction from chocolate powder samples for the determination of Fe, K and Na. *Brazilian Journal of Food Technology* 17, 236-242.
- [27] Nascimento, R. F. D., Lima, A. C. A. D., Vidal, C. B., Melo, D. D. Q., & Raulino, G. S. C. (2014). Adsorção: Aspectos Teóricos e Aplicações Ambientais. Estudos da Pós-Graduação. Fortaleza: Imprensa Universitárias.
- [28] Alves, N.V. (2013). Desenvolvimento de Métodos de Extração em Fase Sólida para Especificação de Cromo e Arsênio Empregando Sementes de Moringa Oleífa como Bioadsorvente, Tese de Doutorado, Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.
- [29] <https://pt.slideshare.net/fernandacordeiro127648/spe-62791872> (Acedido em 13 de Fevereiro de 2020).
- [30] Oliveira, D., Freitas, A., Kadhivel, P., Dias, R.C.S., & Costa, M. R. P. F. N. (2016). Development of high performance and facile to pack molecularly imprinted particles for aqueous applications, 111, 87-99.
- [31] Cacho, C., Schweitz, L., Turiel, E., & Pérez-Conde, C. (2008). Molecularly imprinted capillary electrochromatography for selective determination of thibendazole in citrus samples. *Biochemical Engineering Journal*, 216-223.
- [32] 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*. *Reactive and Functional Polymers*, 107, 35–45.
- [33] 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. *Process*, 5(4).

- [34] <https://betaeq.com.br/index.php/2020/07/16/cromatografia-liquida-de-alta-eficienciahplc/>
(Acedido em 13 de Novembro de 2020)
- [35] <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2015/04/hplc-cromatografia-liquida-de-alta.html>
(Acedido em 13 de Novembro de 2020)
- [36] Rocha, F.R.P., Teixeira, L.S.G. (2004) Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*, 27, 1678-7064.
- [37] Morais, C.S., Leme, L. M., Valderrama, P., Março, P.H. (2015) Aplicação de calibração multivariada em dados de espectroscopia UV-Visível para previsão da acidez total em vinhos. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, 6, 70-79.
- [38] Gomes CP, Franco V, Dias RCS, Costa MRPFN. (2020) Processing of Onion Skin Extracts with Quercetin-Molecularly Imprinted Adsorbents Working at a Wide Range of Water Content. *Chromatographia* ;83(12):1539-1551.
- [39] Franco V, (2019) Supercritical Extraction of Polyphenols from different Vegetable Matrices and their Retention and Recovery using Molecularly Imprinted Polymers, Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Politécnico de Bragança,
- [40] V. Hellwig, J. Gasser, (2020) Polyphenols from waste streams of food industry: valorisation of blanch water from marzipan production, *Phytochem.*
- [41] P.E. Milbury, C-Y. Chen, G.G. Dolnikowski, J.B. Blumberg. (2006) Determination of Flavonoids and Phenolics and Their Distribution in Almonds, *J. Agric. Food Chem.* 54, 5027-5033.
- [42] A. Smeriglio, G. Mandalara, C. Bisignano, A. Filocamo, D. Barreca, E. Bellocco, D. Trombetta, (2016) Polyphenolic content and biological properties of Avola almond (*Prunus dulcis* Mill. D.A. Webb) skin and its industrial byproducts, *Industrial Crops and Products* 83,283–293.

Apêndice

Apêndice A

Análises por HPLC-DAD de extratos de casca exterior de amêndoa (*shell*) em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais

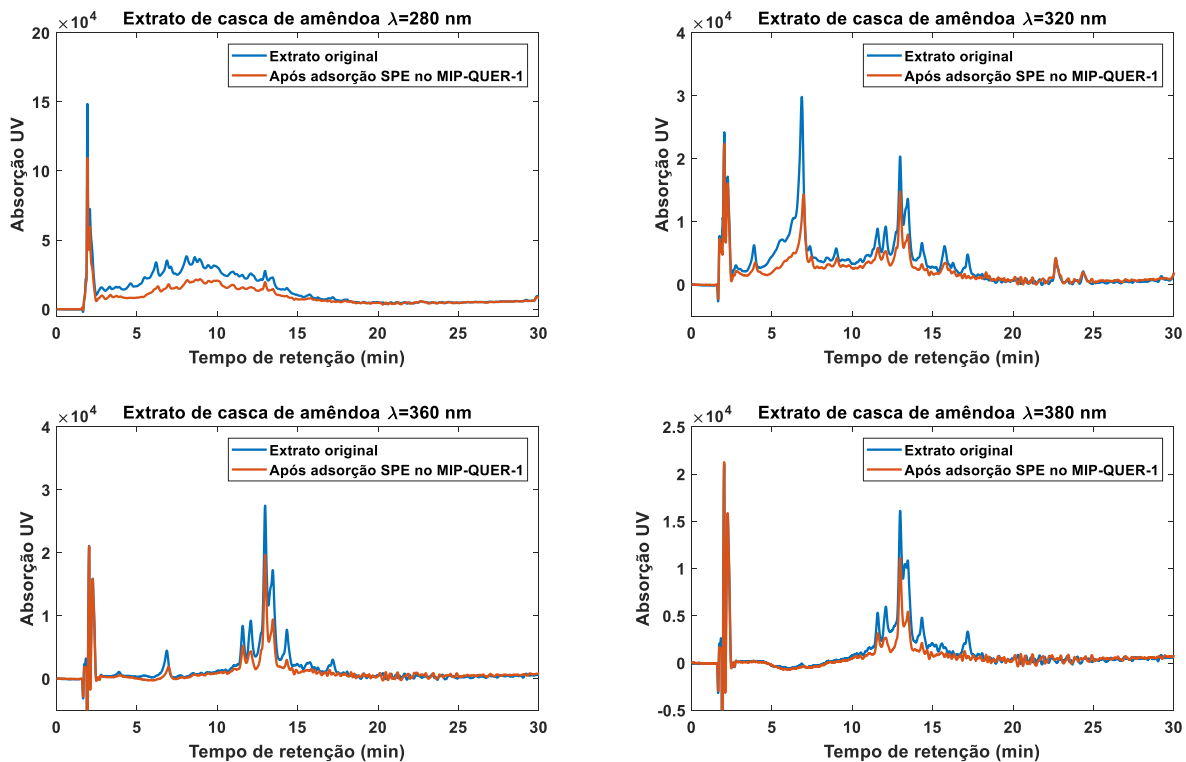


Figura A1: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-QUER-1.

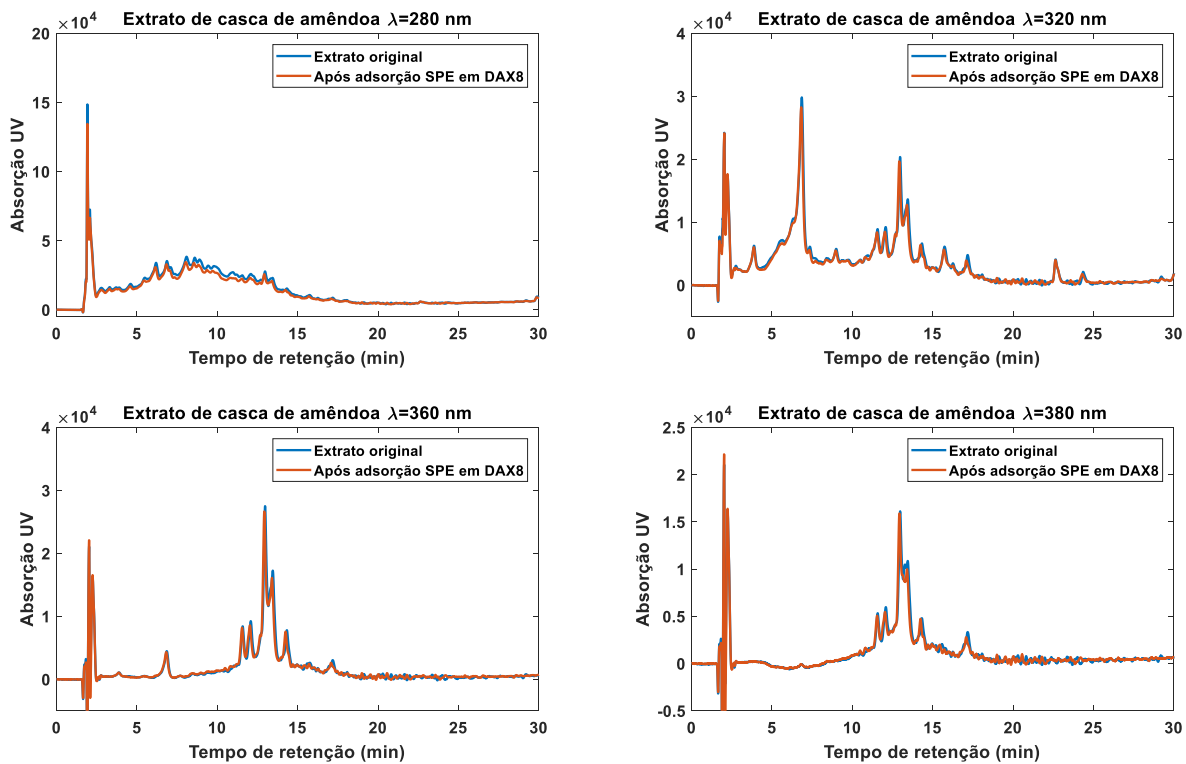


Figura A2: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em DAX8.

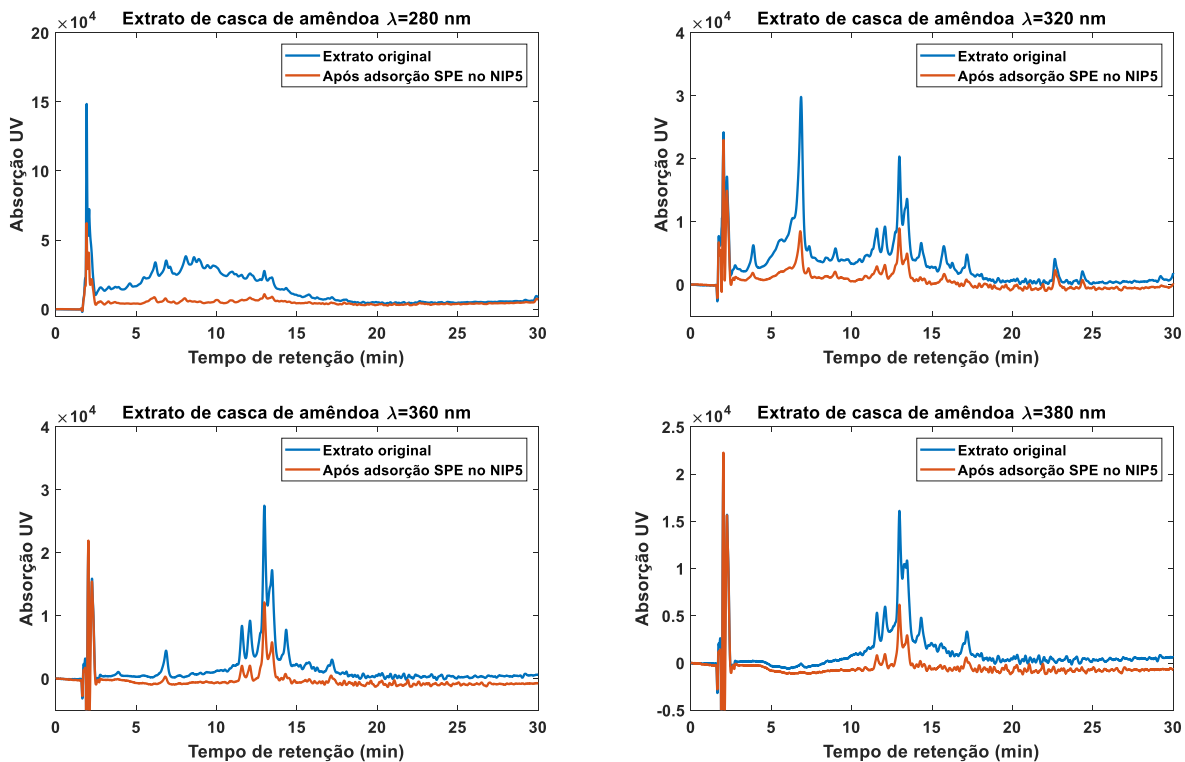


Figura A3: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no NIP5.

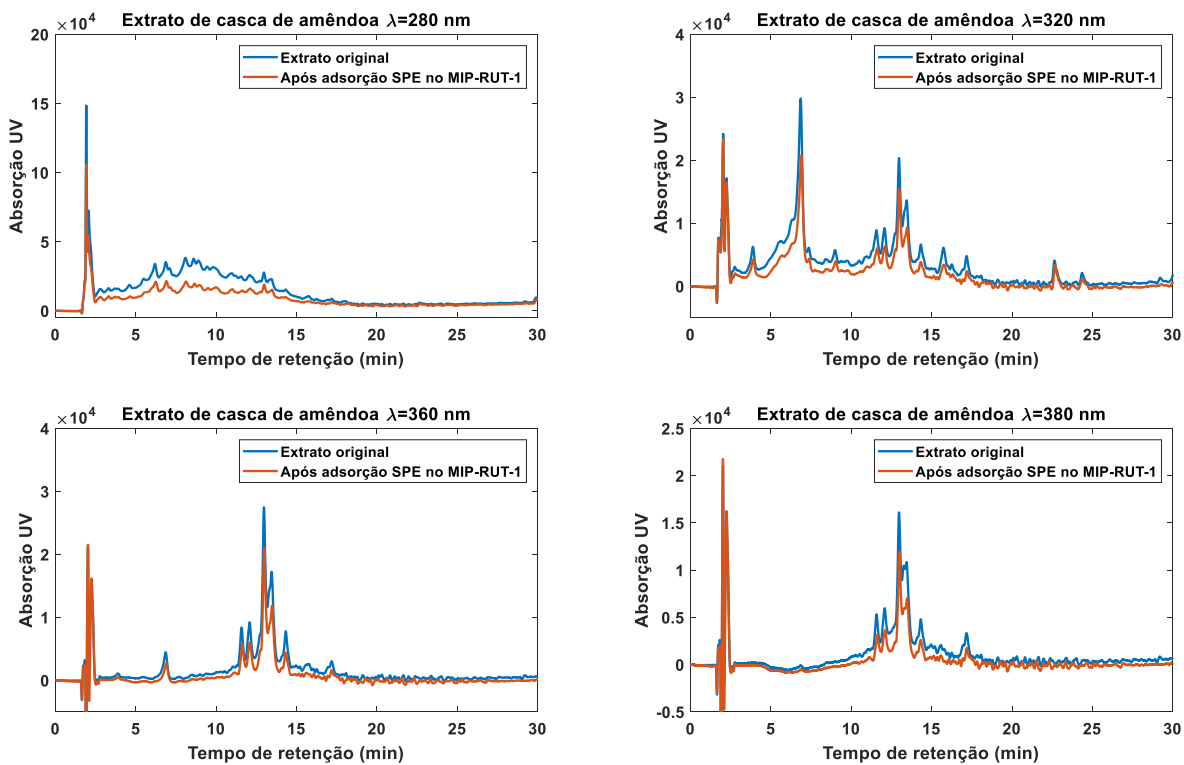


Figura A4: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-1.

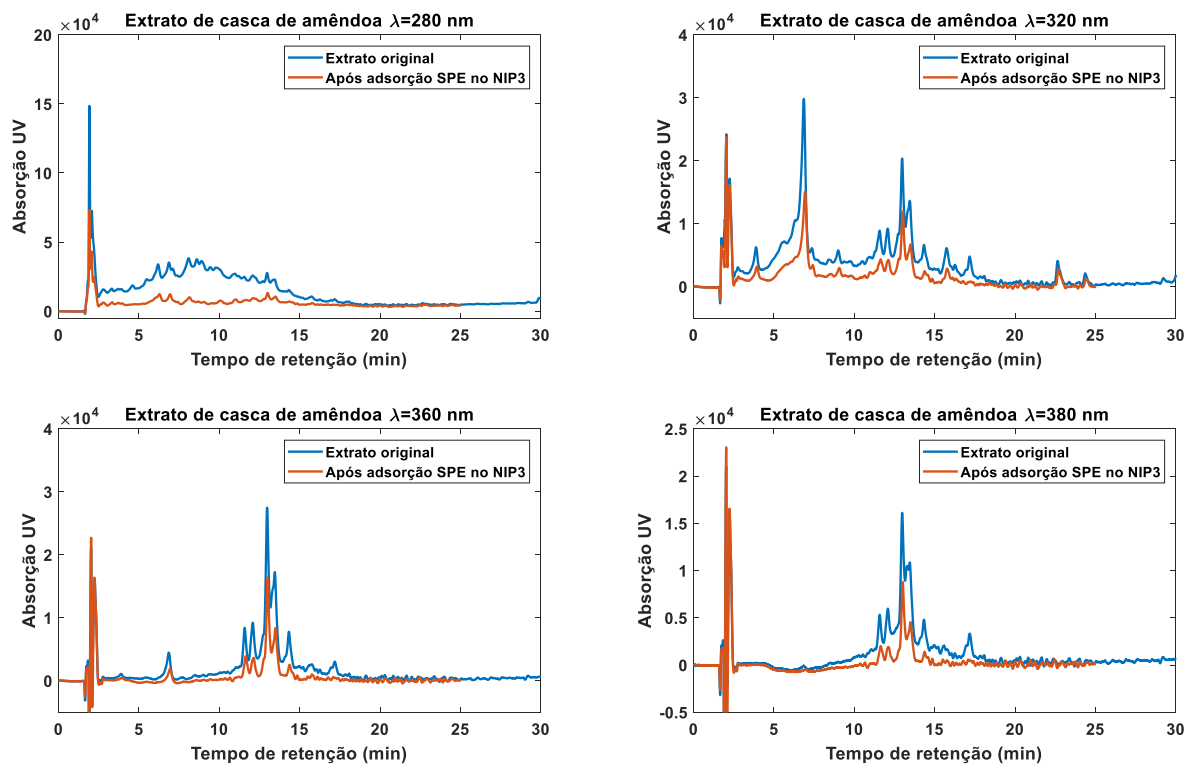


Figura A5: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no NIP3.

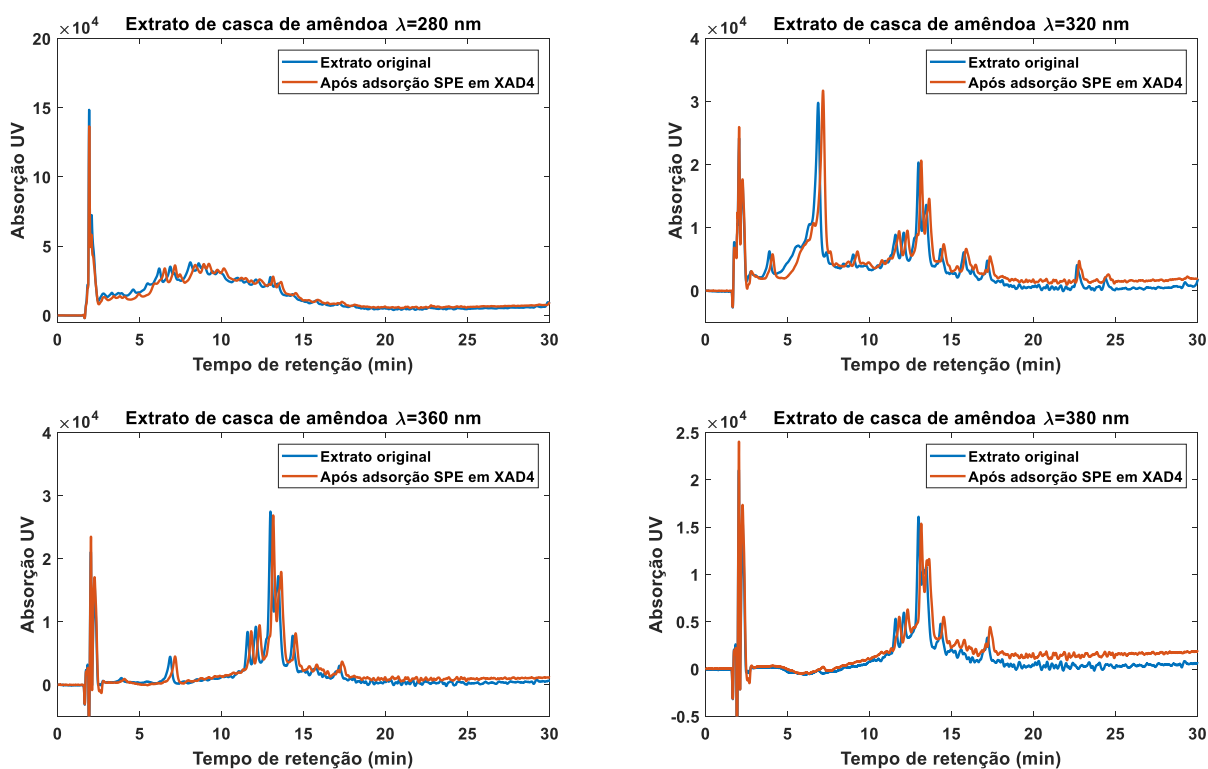


Figura A6: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em XAD4.

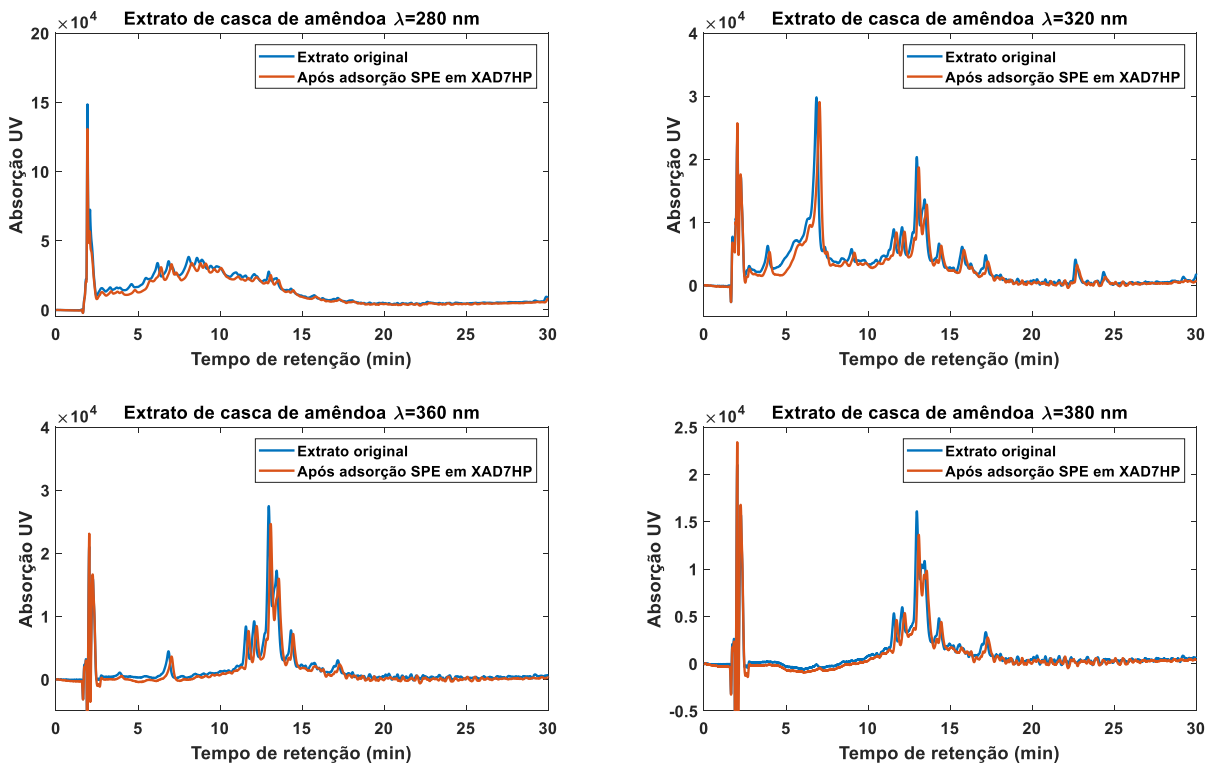


Figura A7: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em XAD7HP.

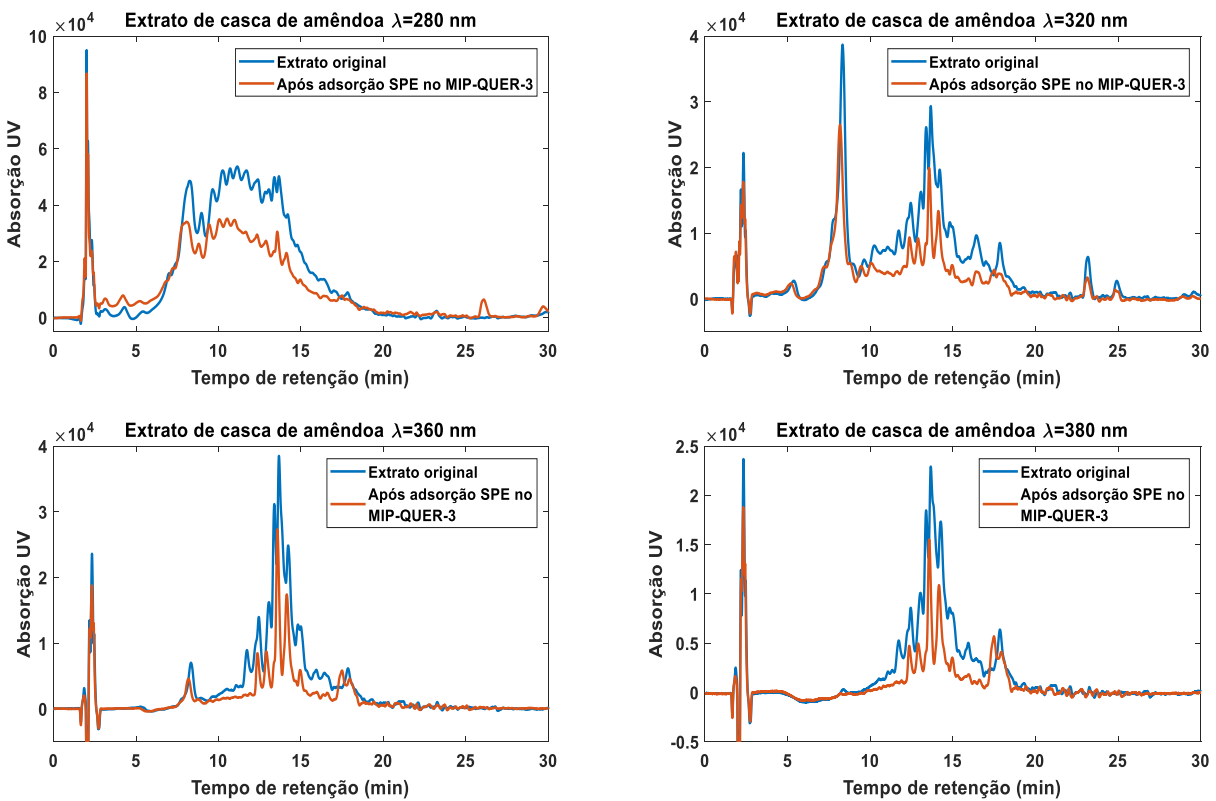


Figura A8: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-QUER-3.

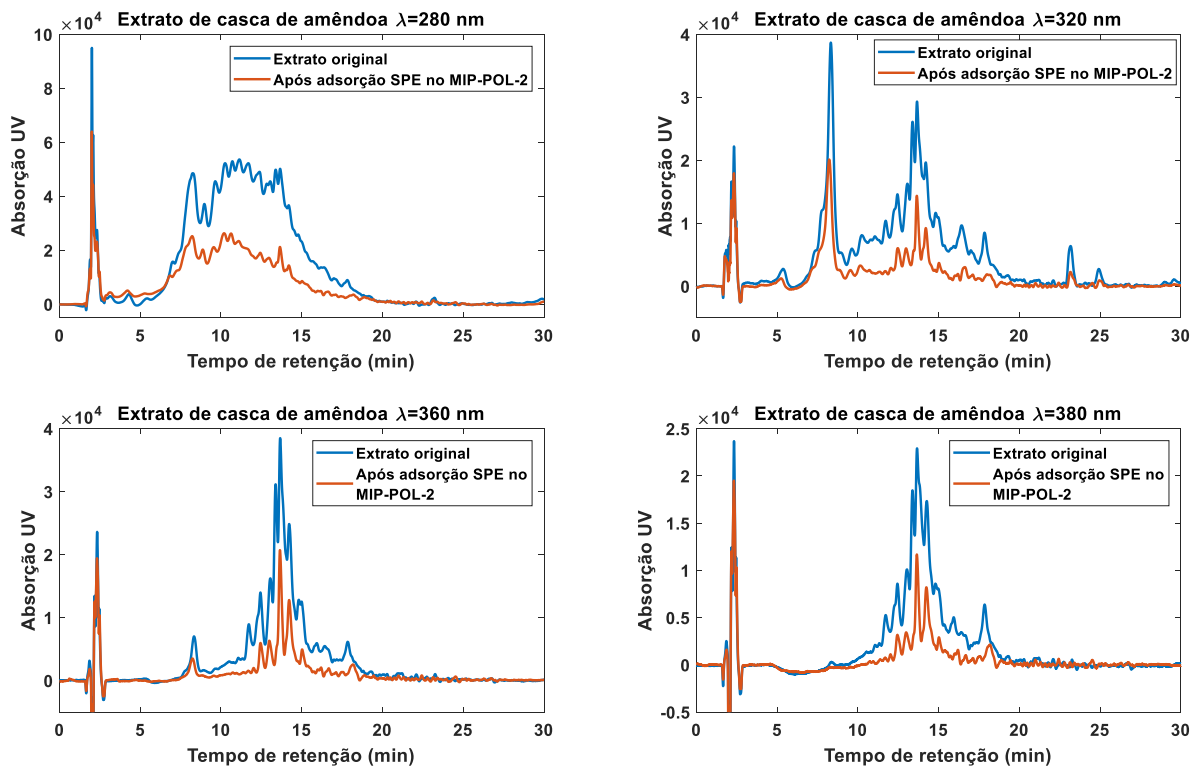


Figura A9: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-POL-2.

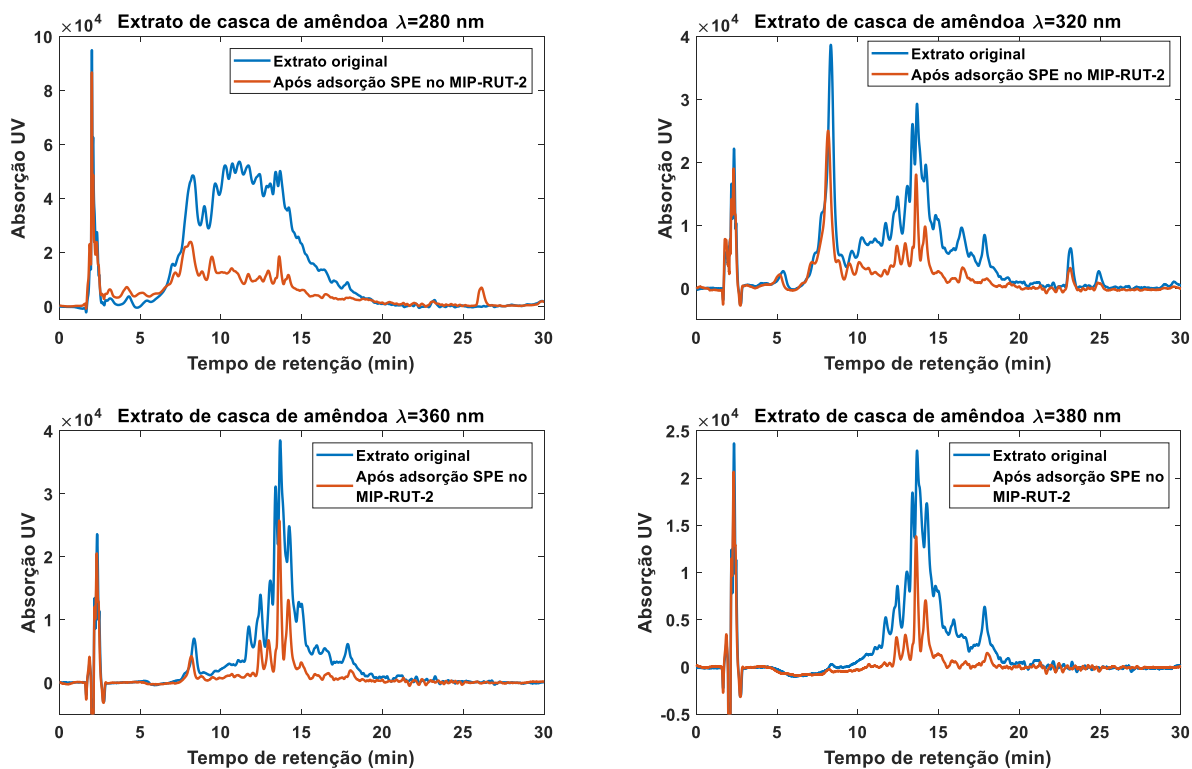


Figura A10: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-2.

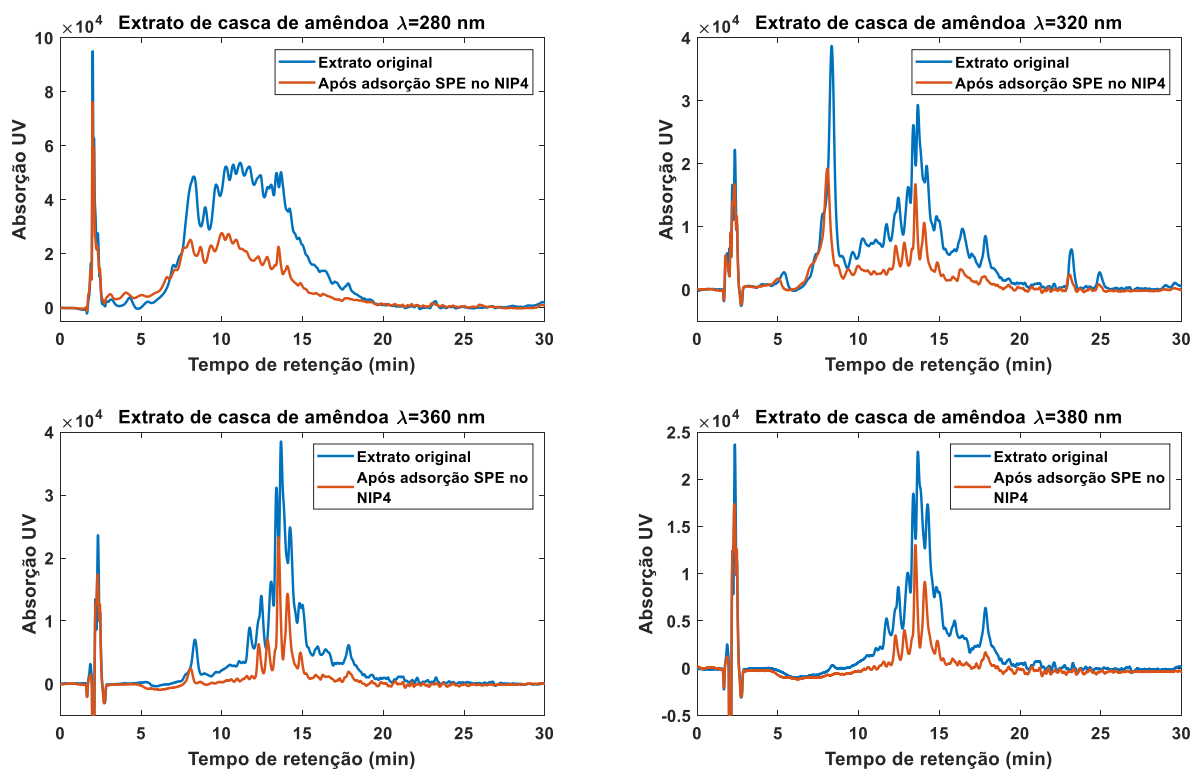


Figura A11: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no NIP4.

Apêndice B

Análises por HPLC-DAD de extratos de casca verde de amêndoa (*hull*) em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais

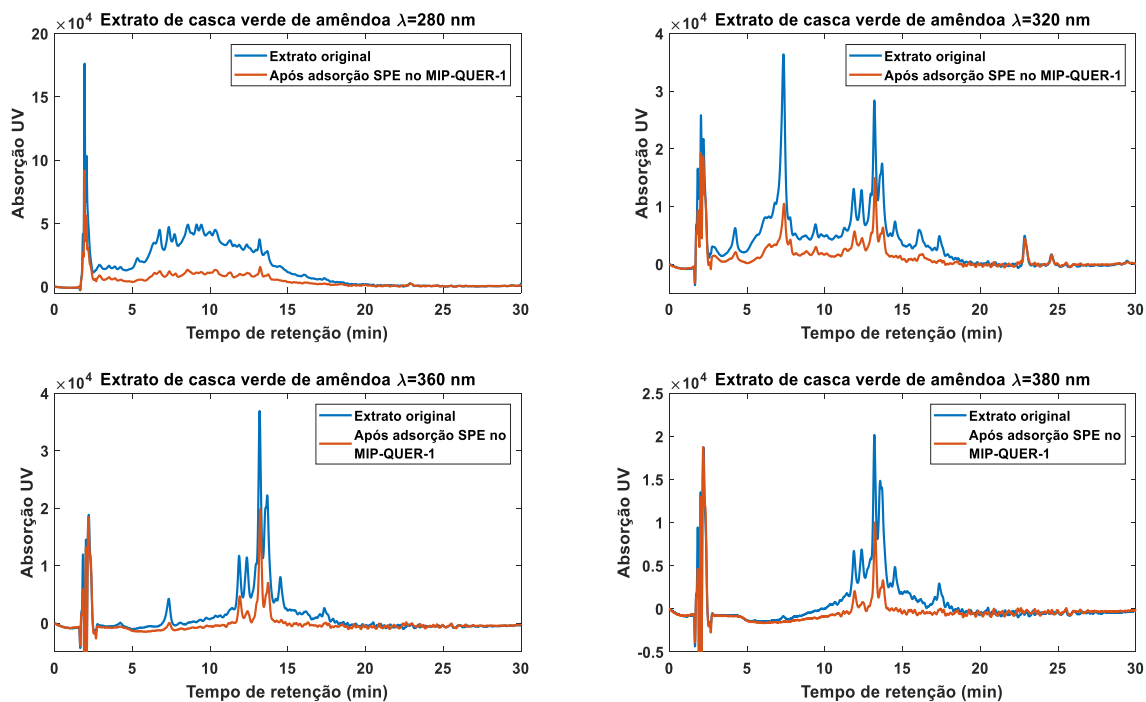


Figura B1: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-QUER-1.

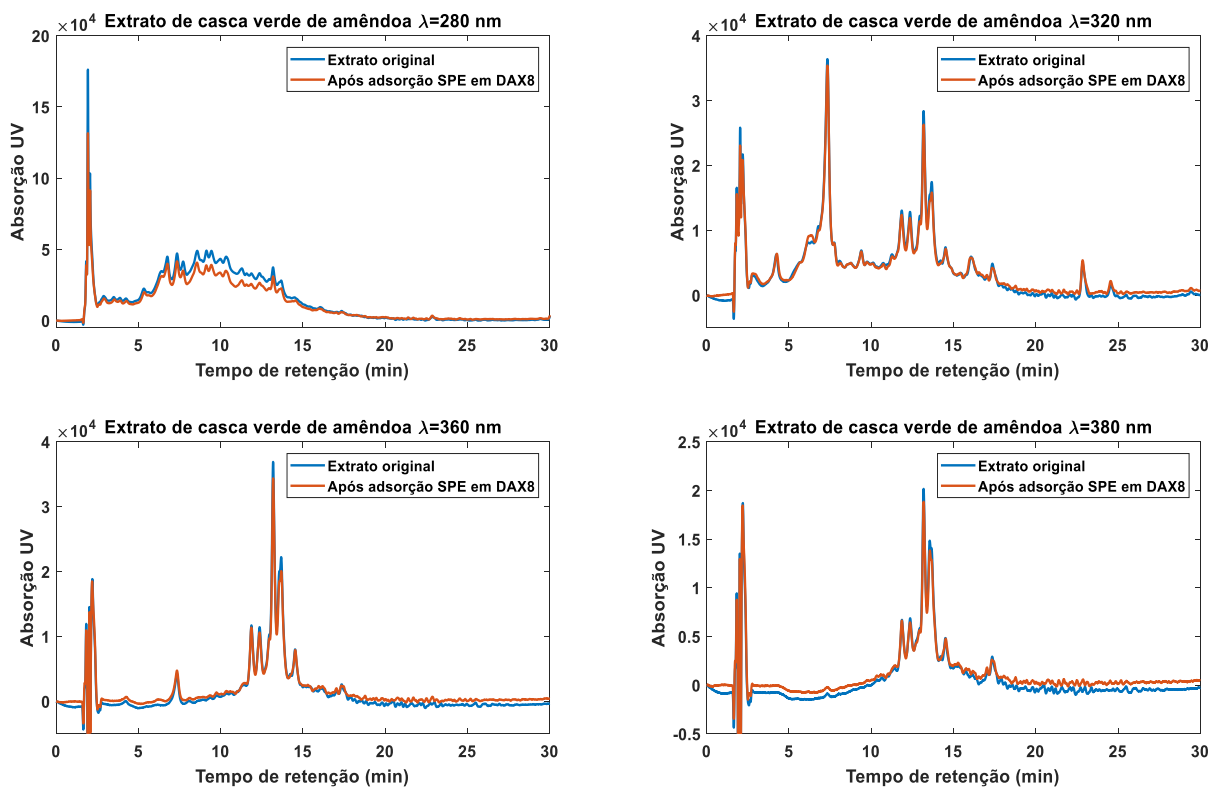


Figura B2: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em DAX8.

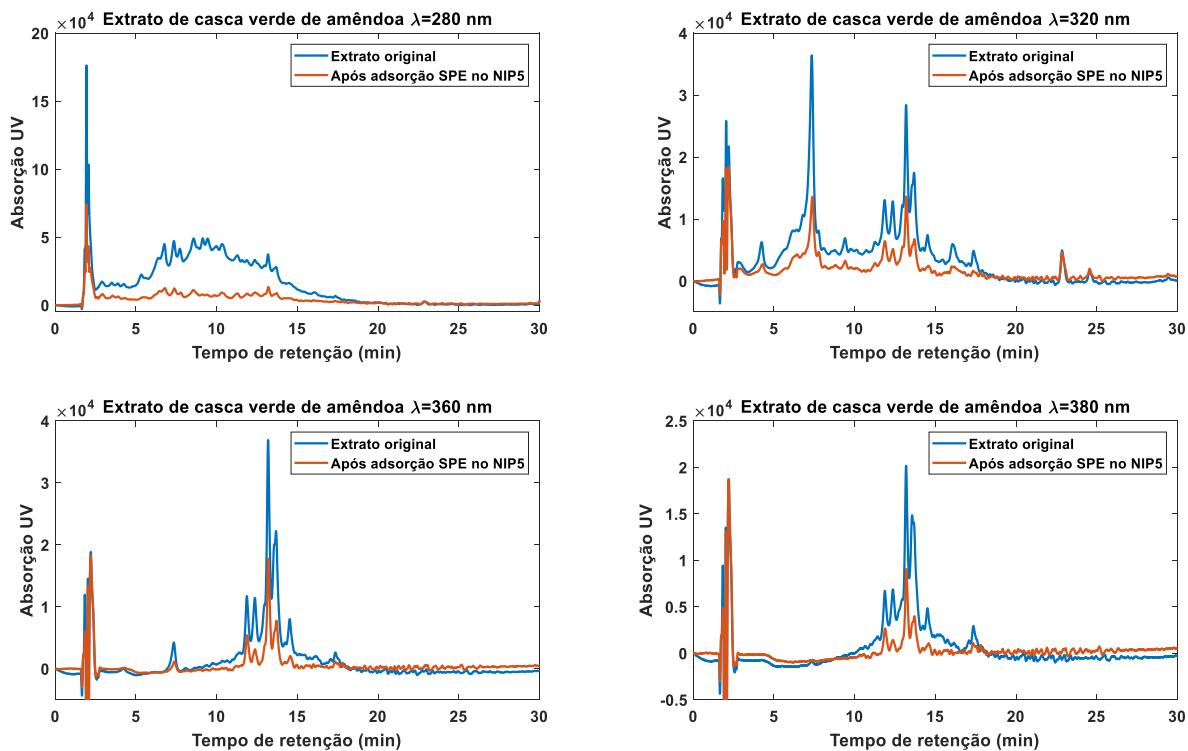


Figura B3: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no NIP5.

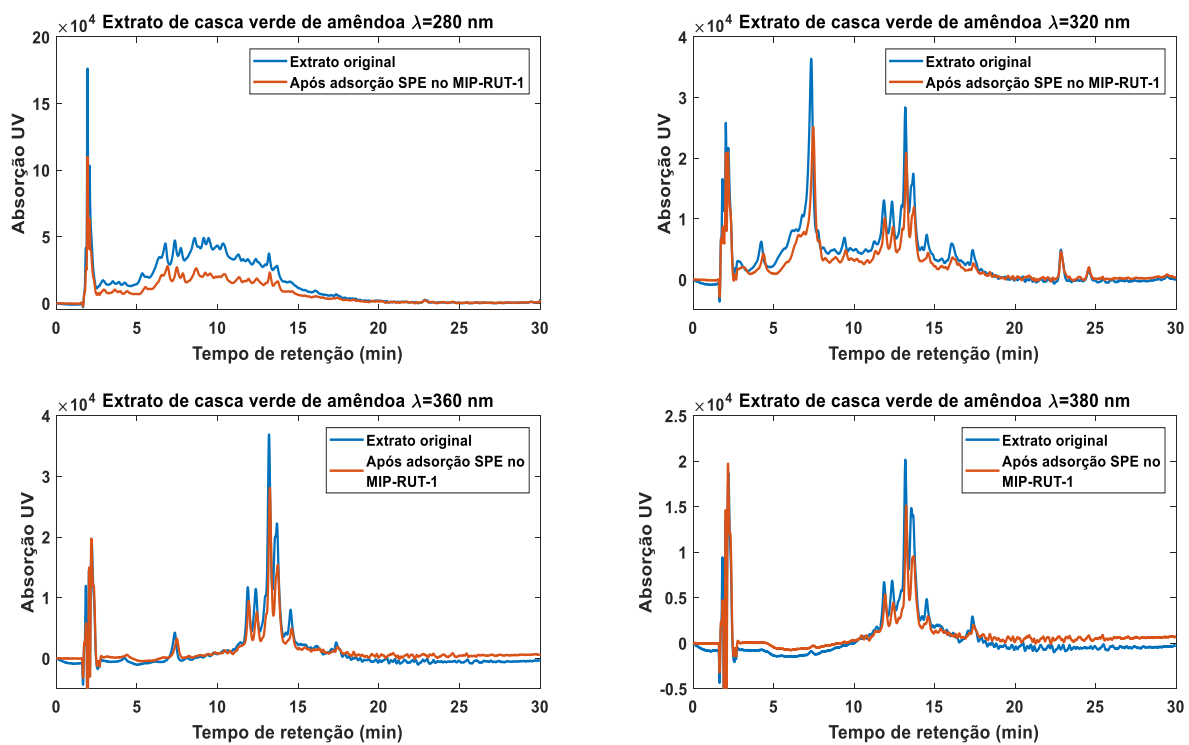


Figura B4: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-1.

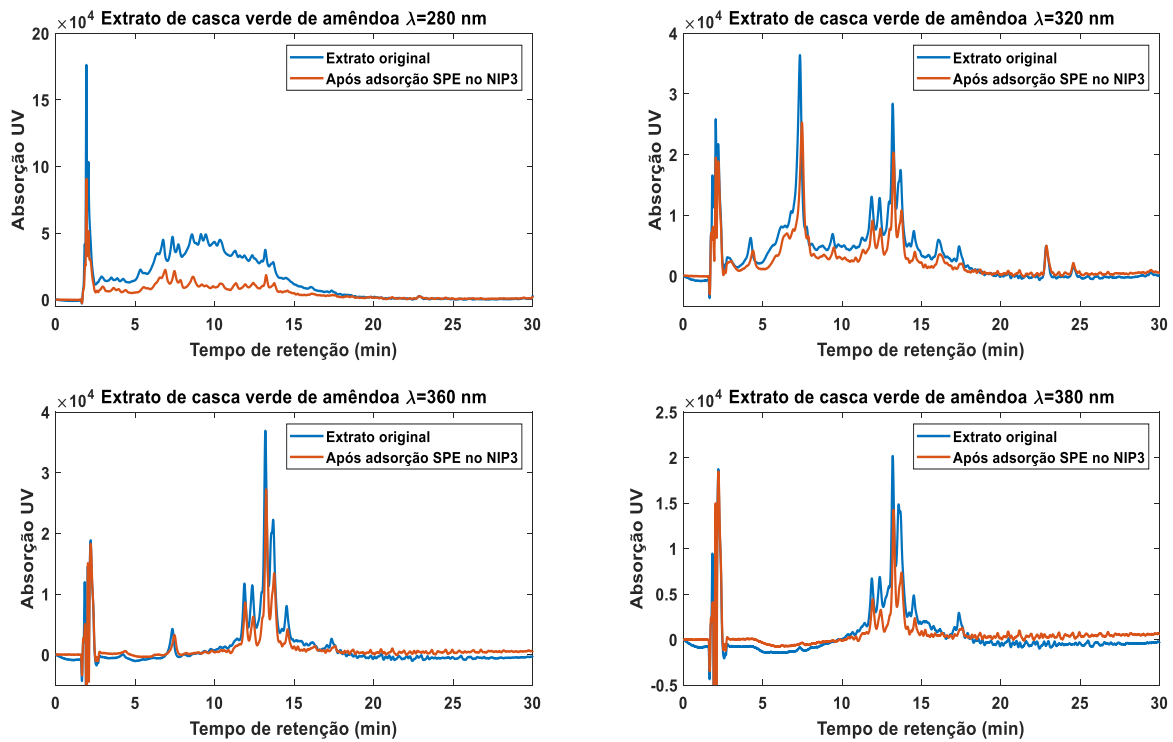


Figura B5: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no NIP3.

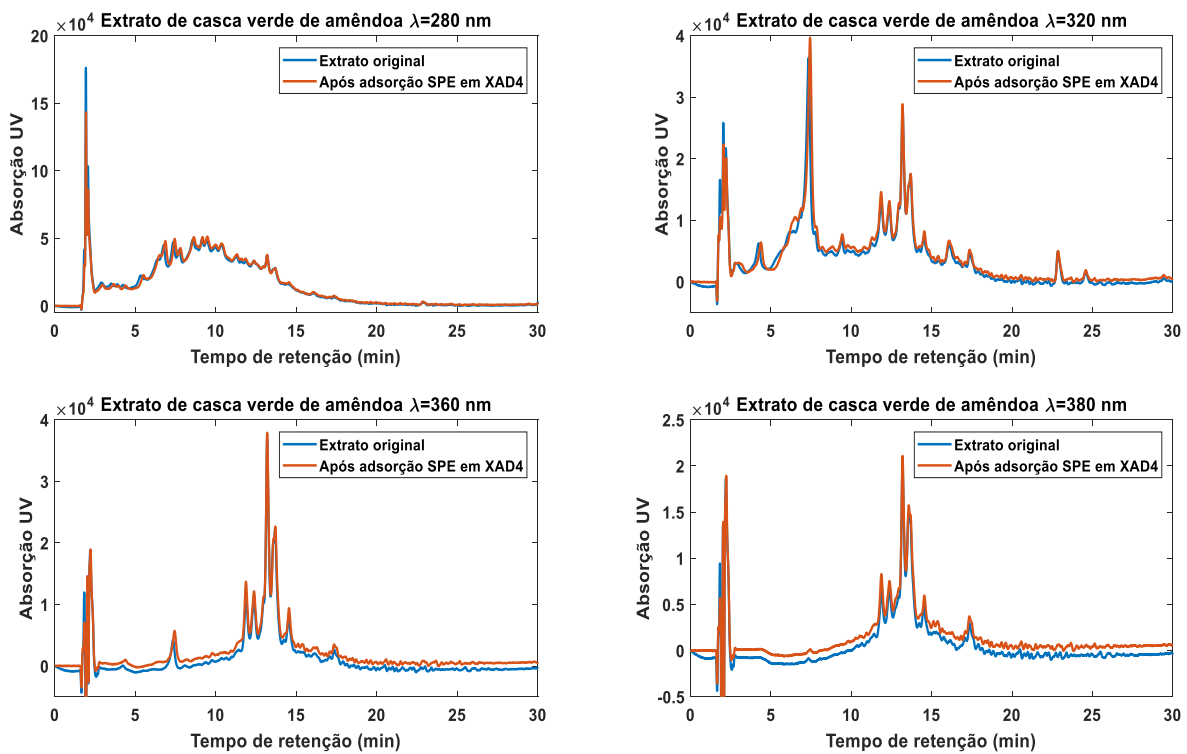


Figura B6: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em XAD4.

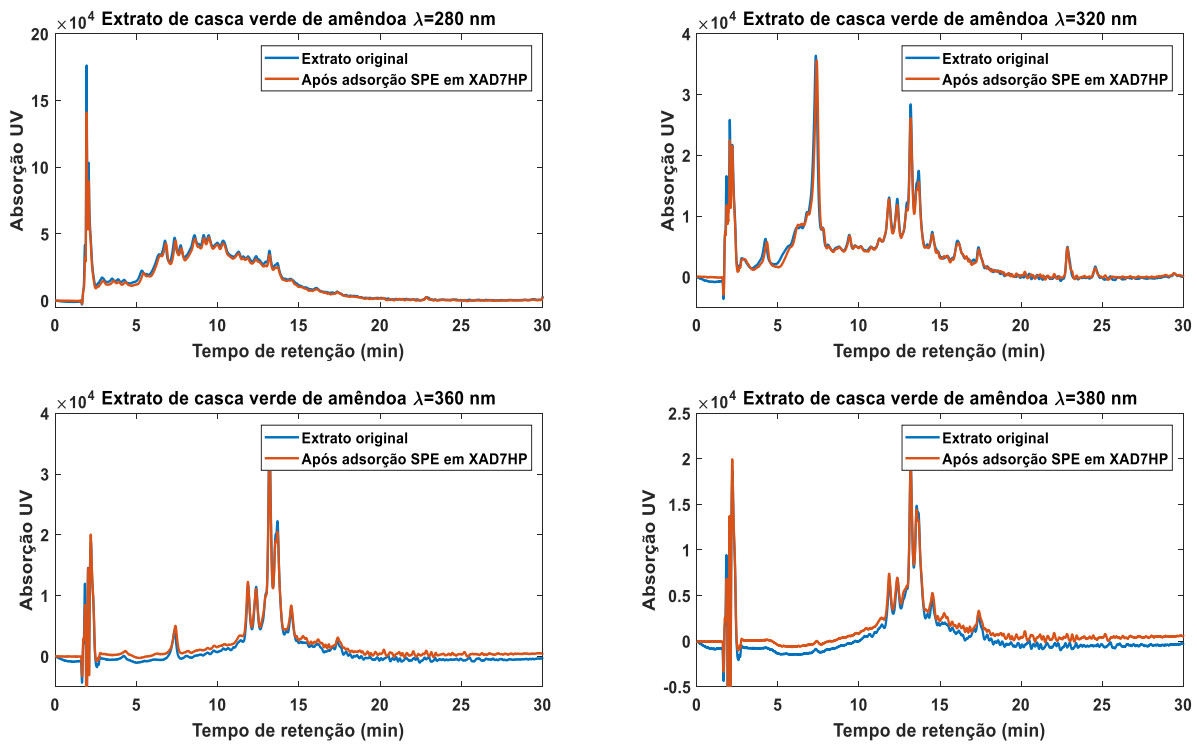


Figura B7: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE em XAD7HP.

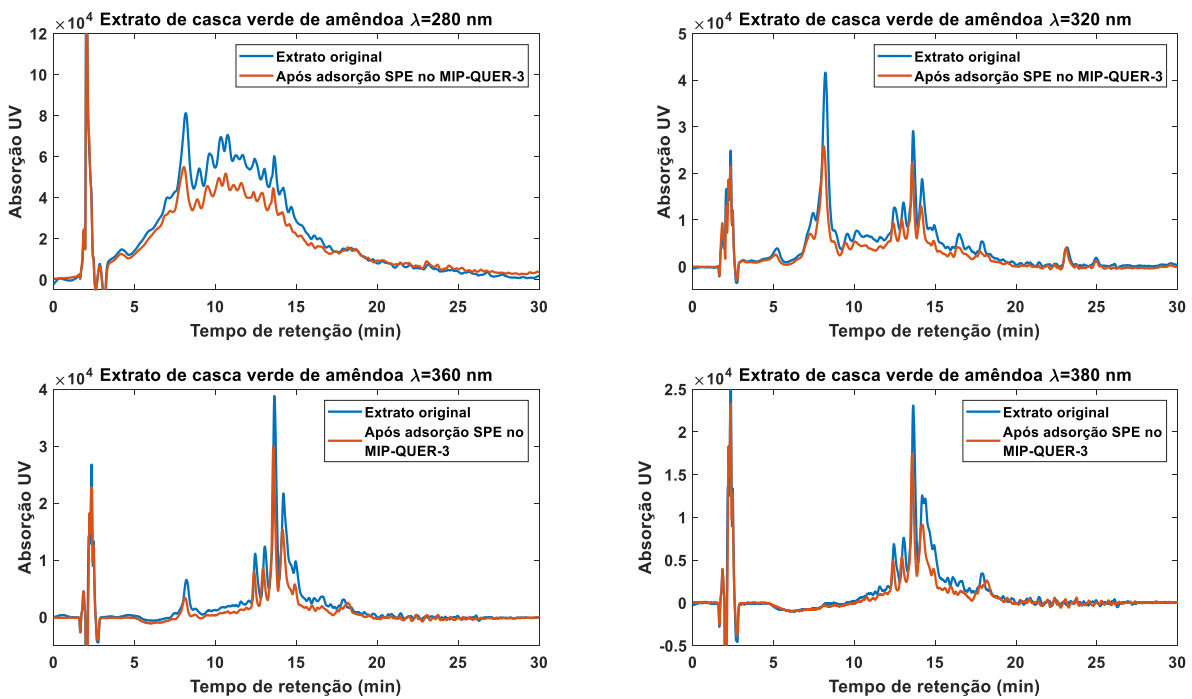


Figura B8: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-QUER-3.

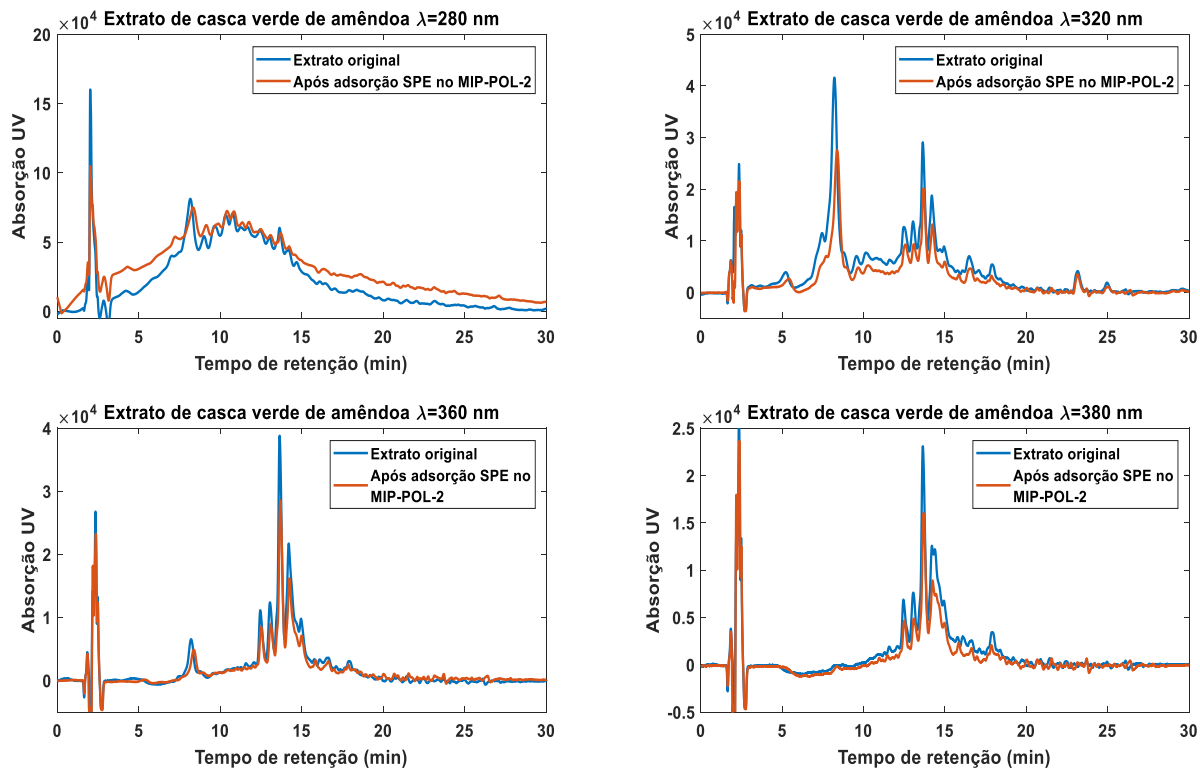


Figura B9: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-POL-2.

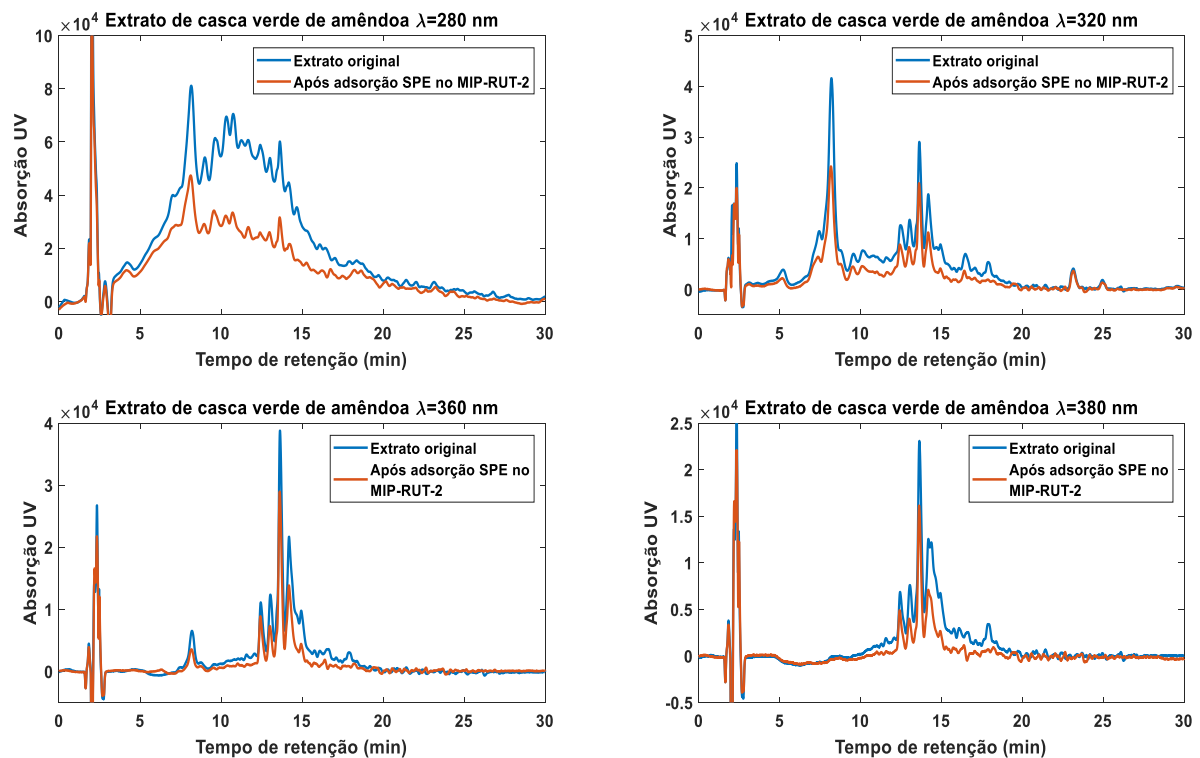


Figura B10: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-2.

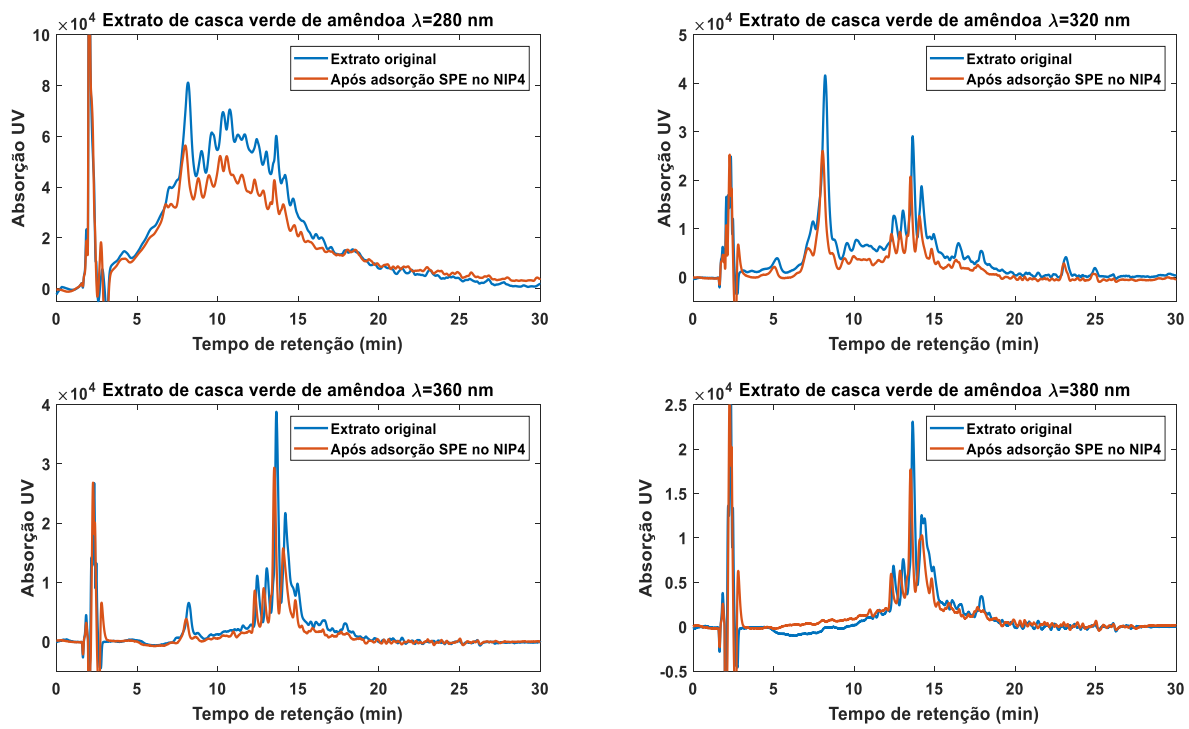


Figura B11: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca verde de amêndoa em etanol/água 80/20 antes e após a sua adsorção SPE no NIP4.

Apêndice C

Análises por HPLC-DAD de extratos aquosos do branqueamento da amêndoa (*blanching*) antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais

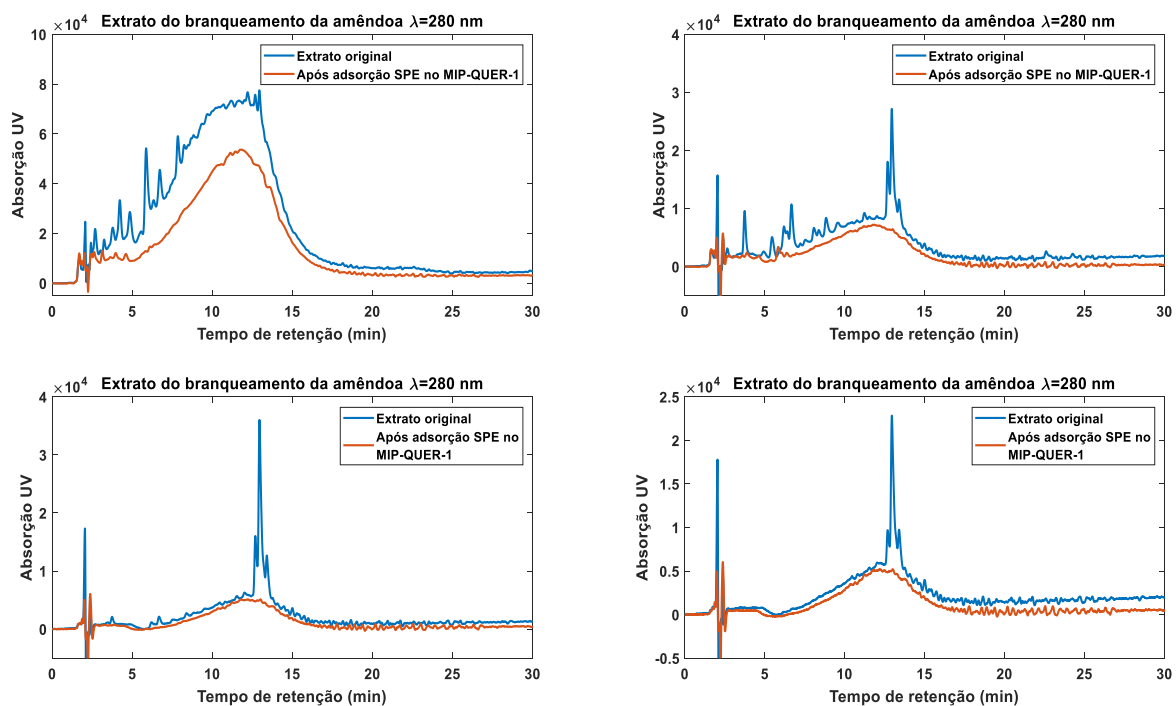


Figura C1: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE no MIP-QUER-1.

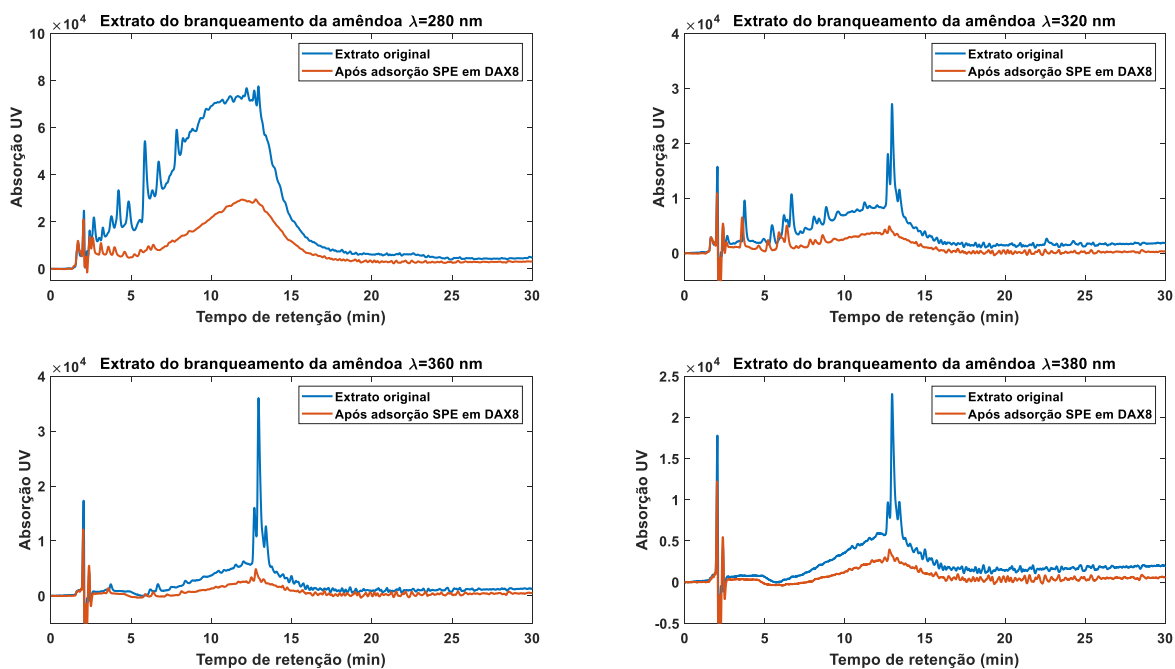


Figura C2: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE em DAX8.

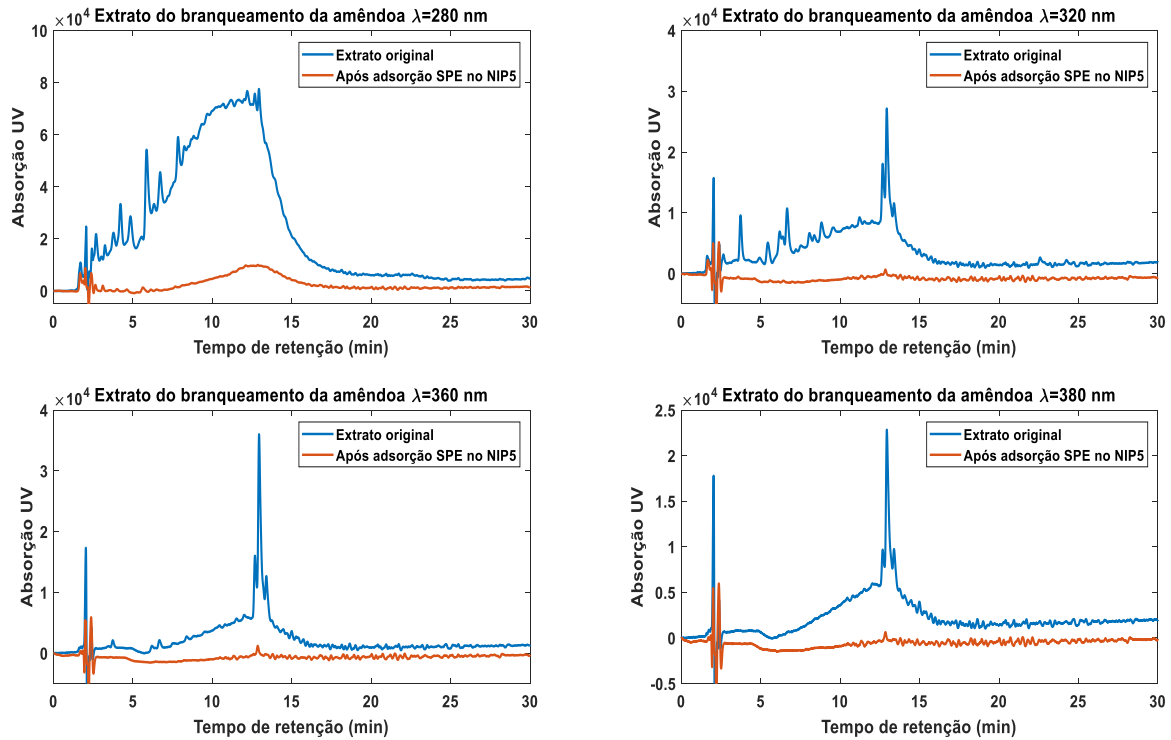


Figura C3: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE no NIP5.

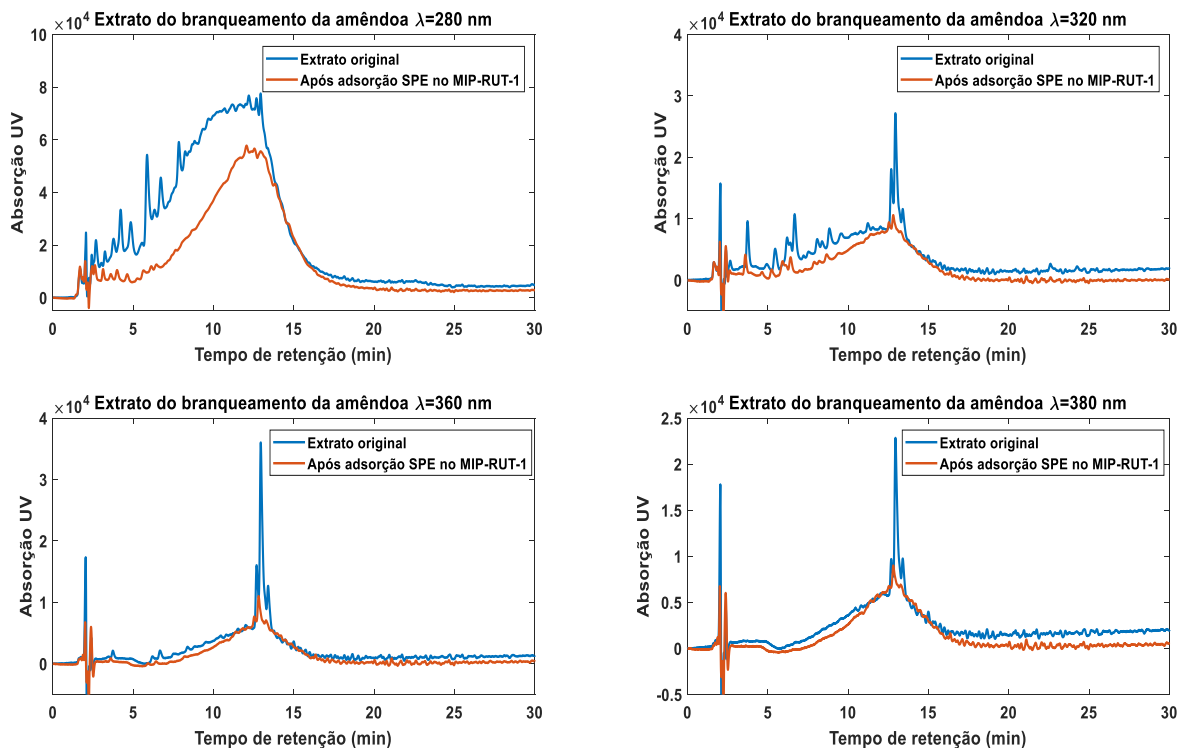


Figura C4: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-1.

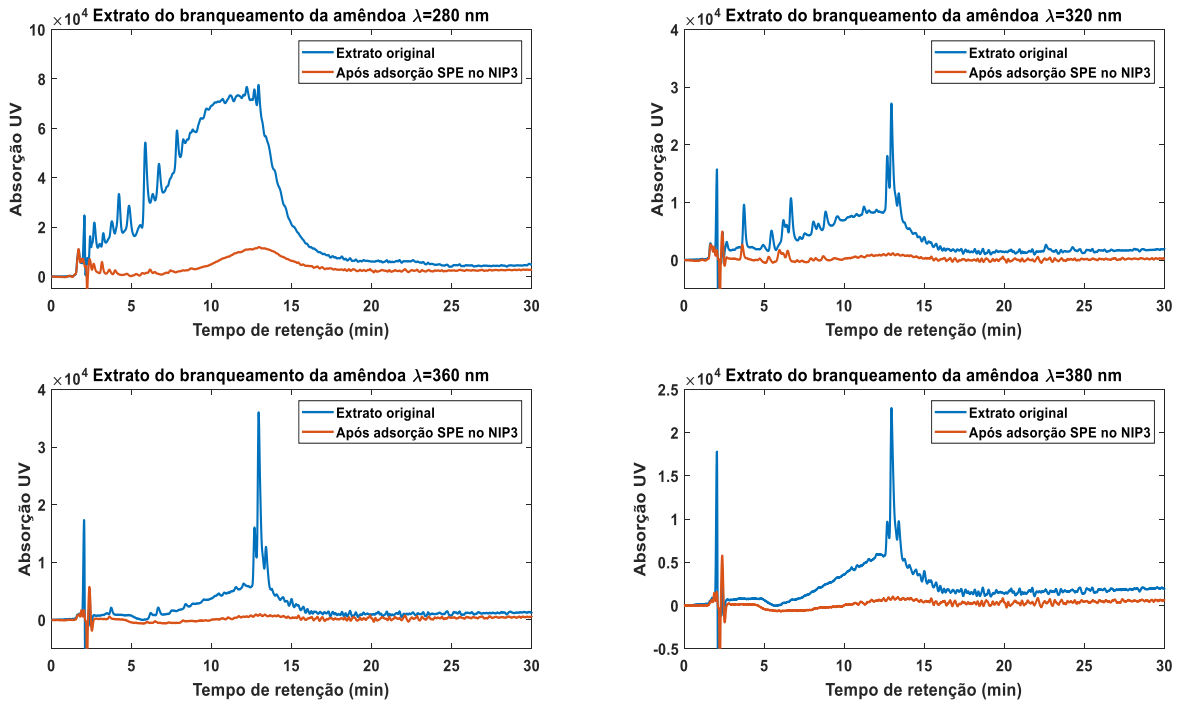


Figura C5: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE no NIP3.

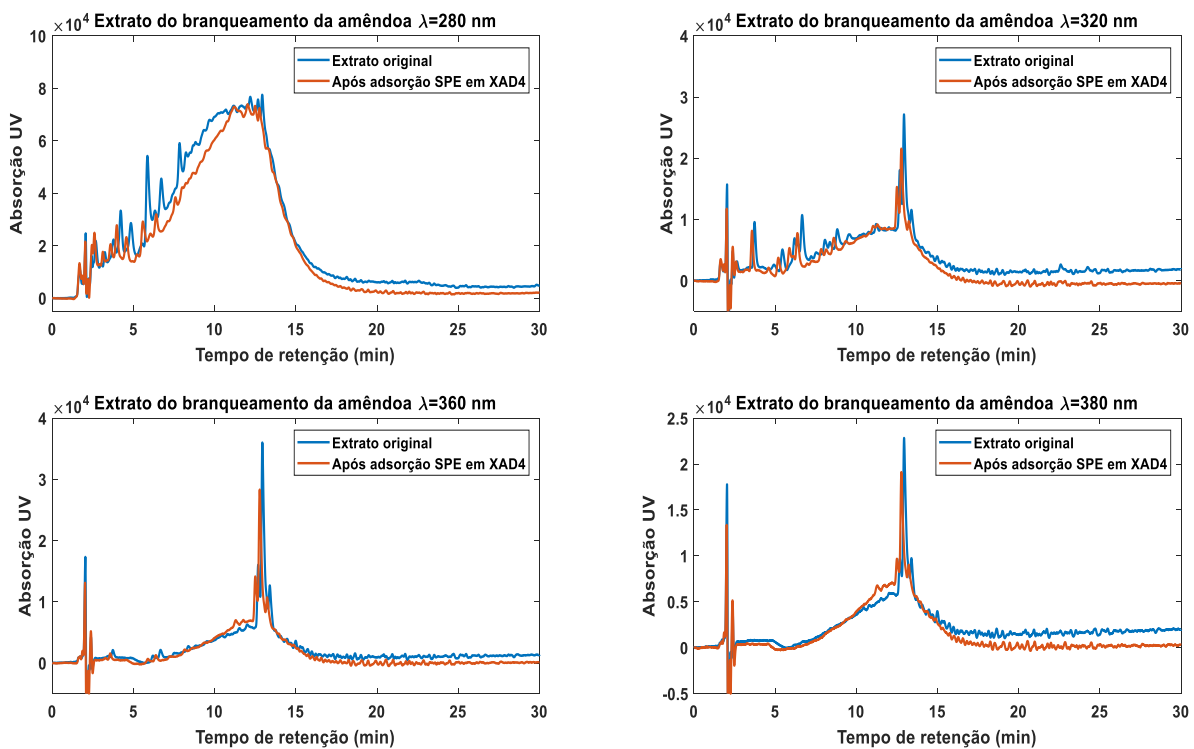


Figura C6: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE em XAD4.

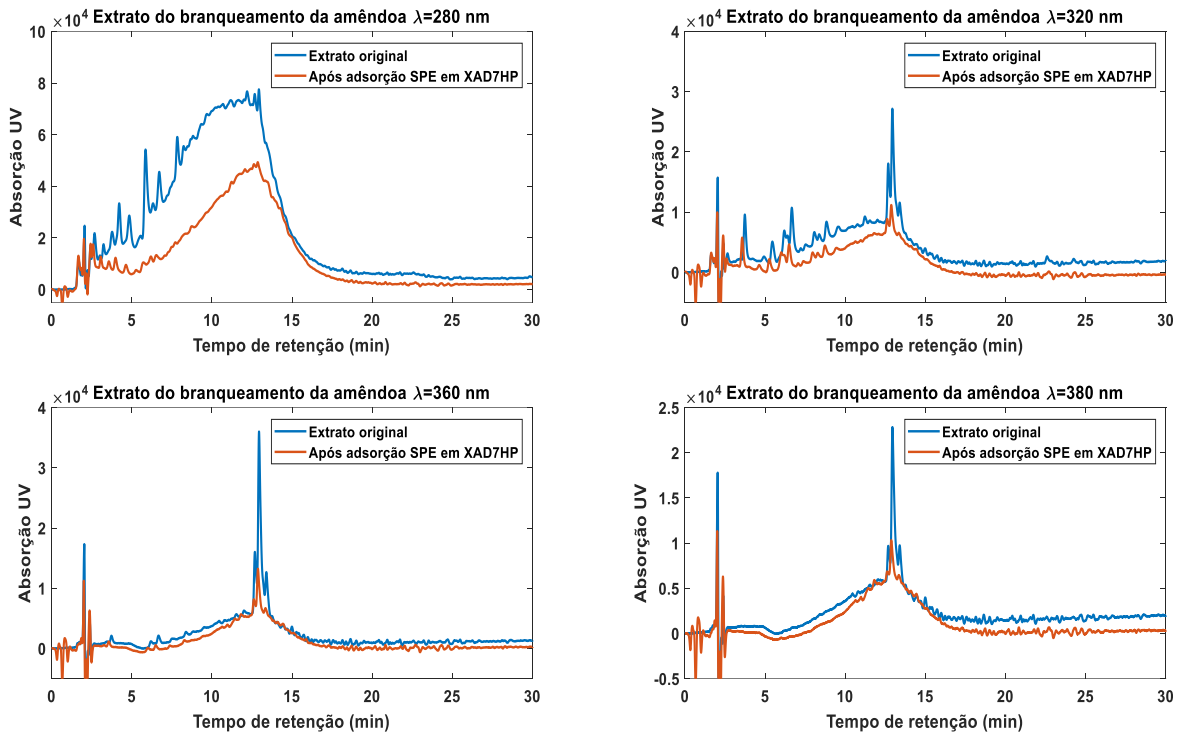


Figura C7: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE em XAD7HP.

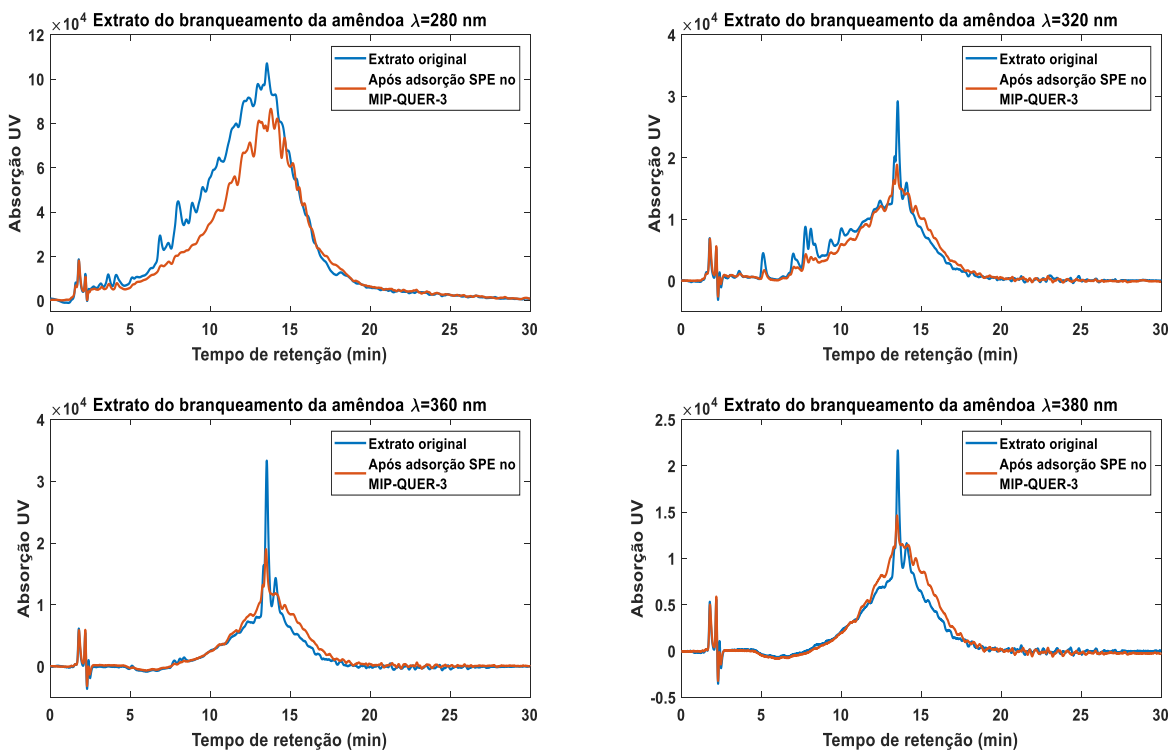


Figura C8: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE no MIP-QUER-3.

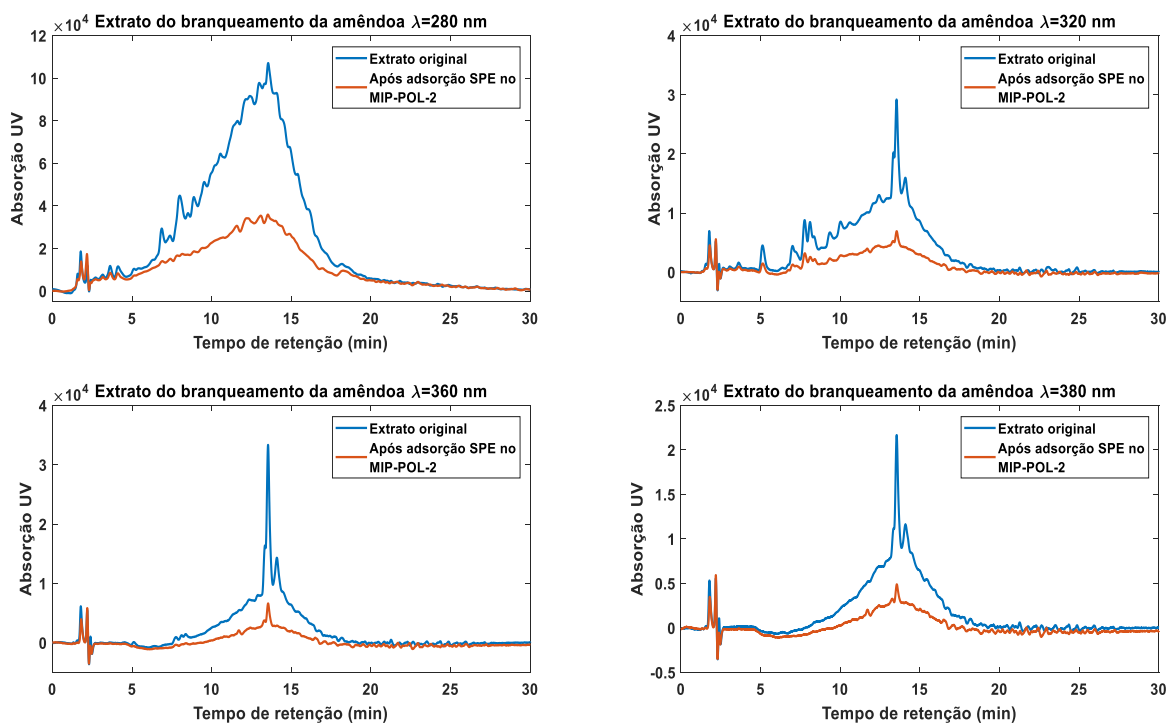


Figura C9: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE no MIP-POL-2.

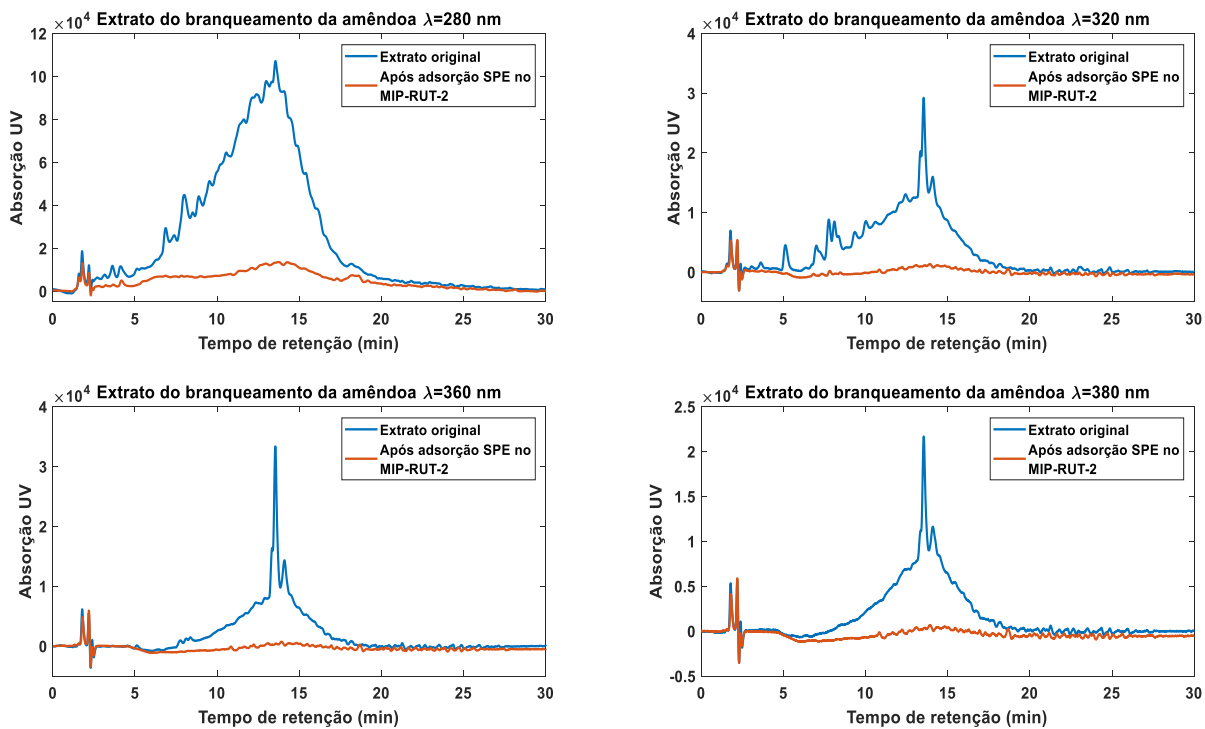


Figura C10: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-2.

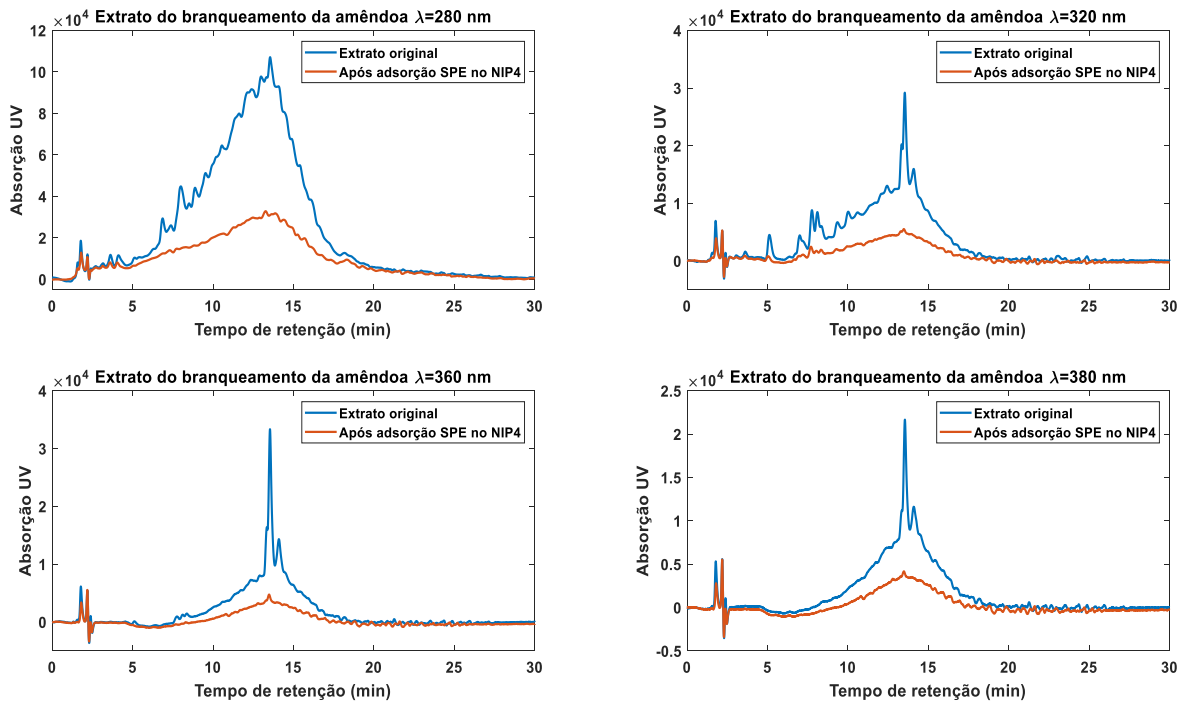


Figura C11: Análise por HPLC-DAD de um extrato aquoso do branqueamento da amêndoa antes e após a sua adsorção SPE no NIP4.

Apêndice D

Análises por HPLC-DAD de extratos de casca exterior de amêndoa (*shell*) em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais

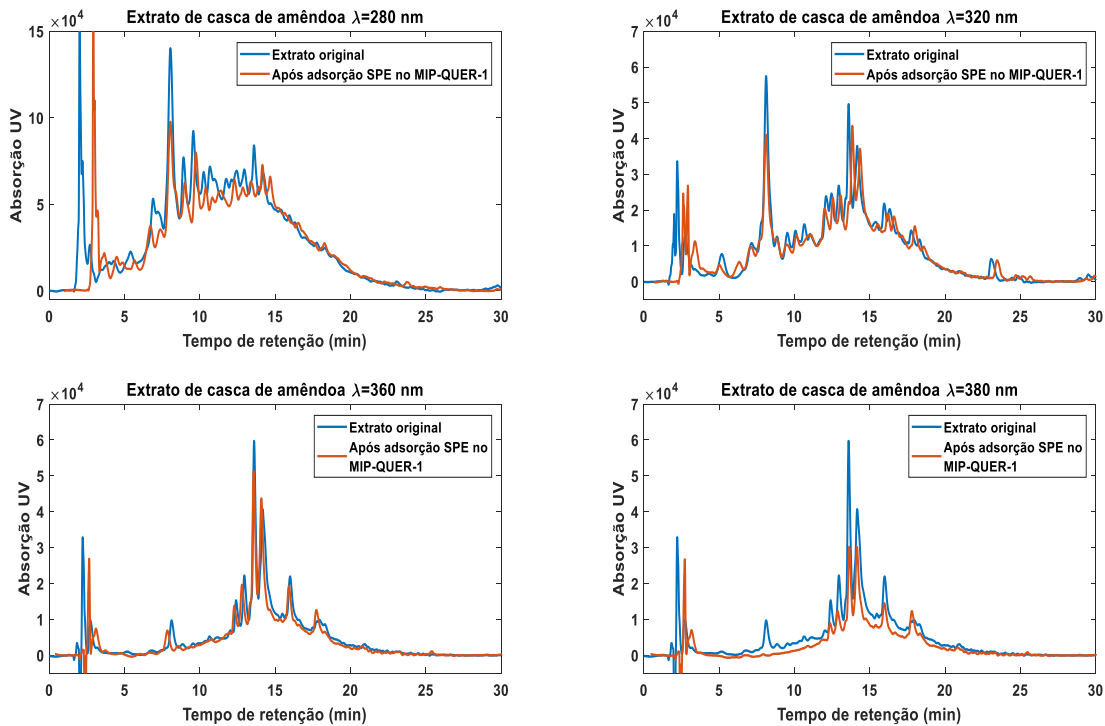


Figura D1: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-QUER-1.

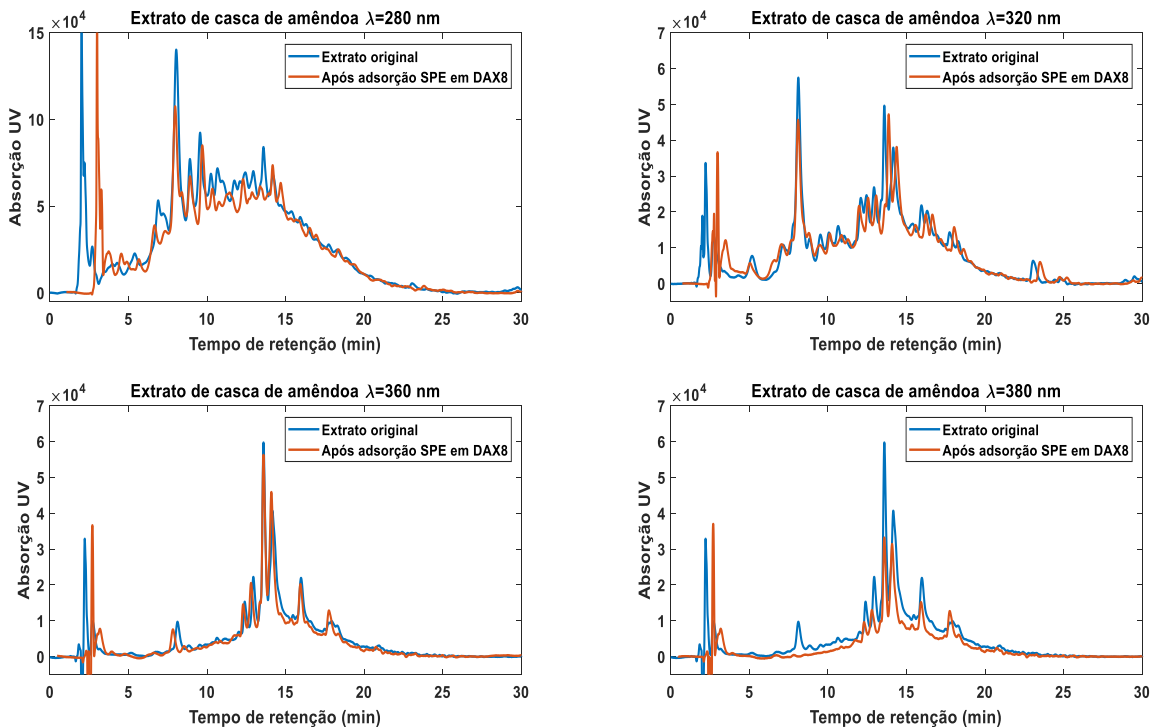


Figura D2: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em DAX8.

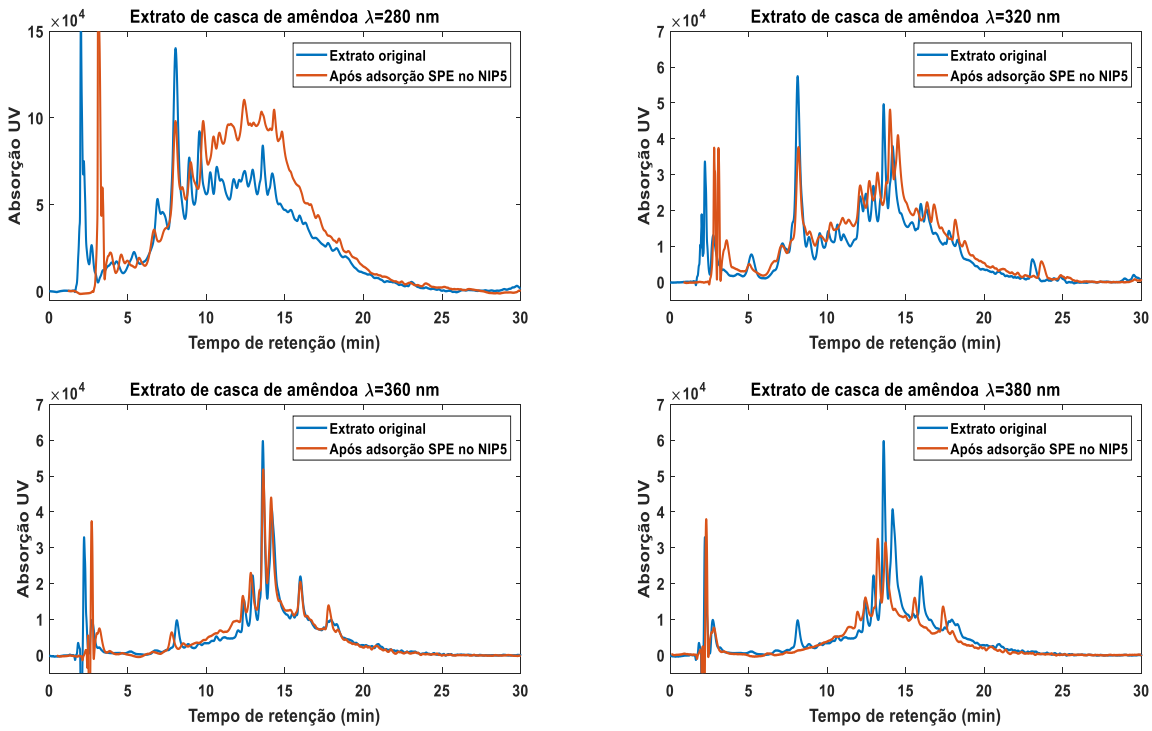


Figura D3: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no NIP5.

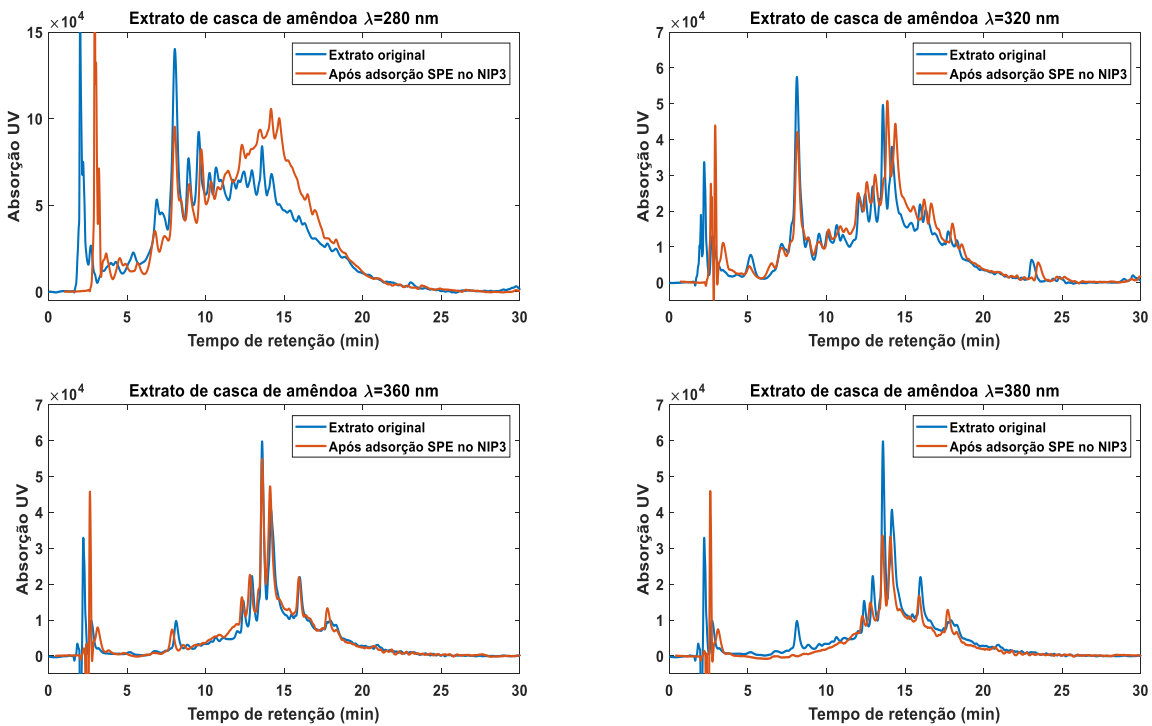


Figura D4: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no NIP3.

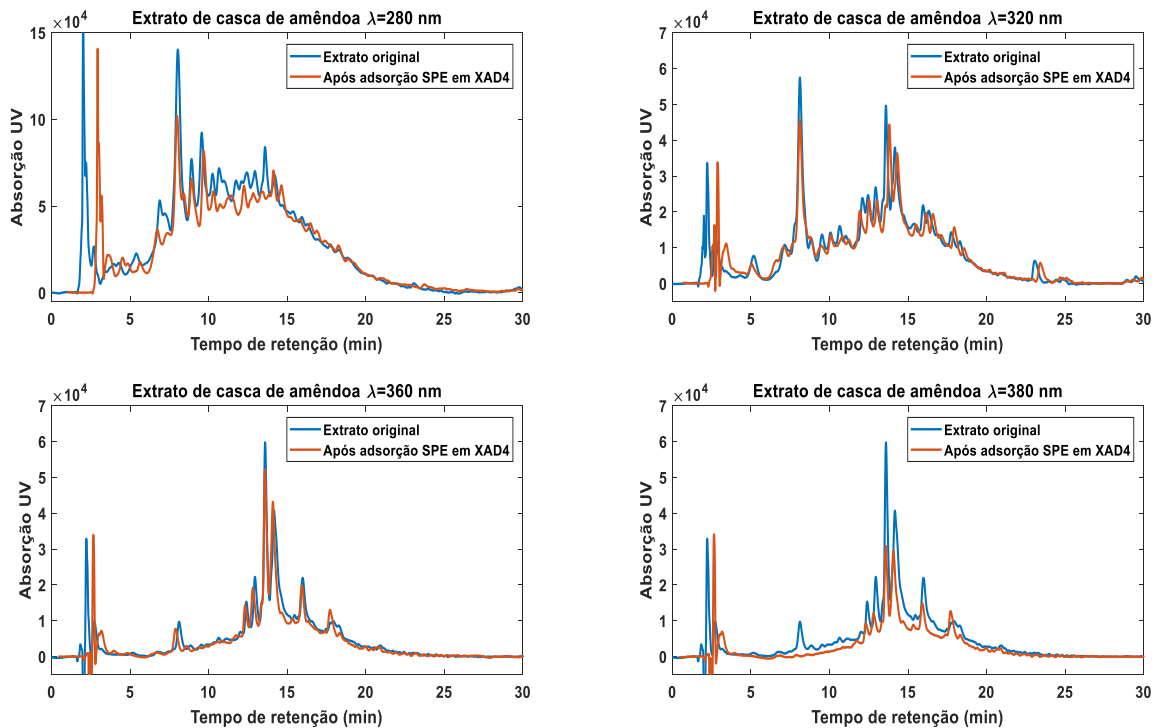


Figura D5: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em XAD4.

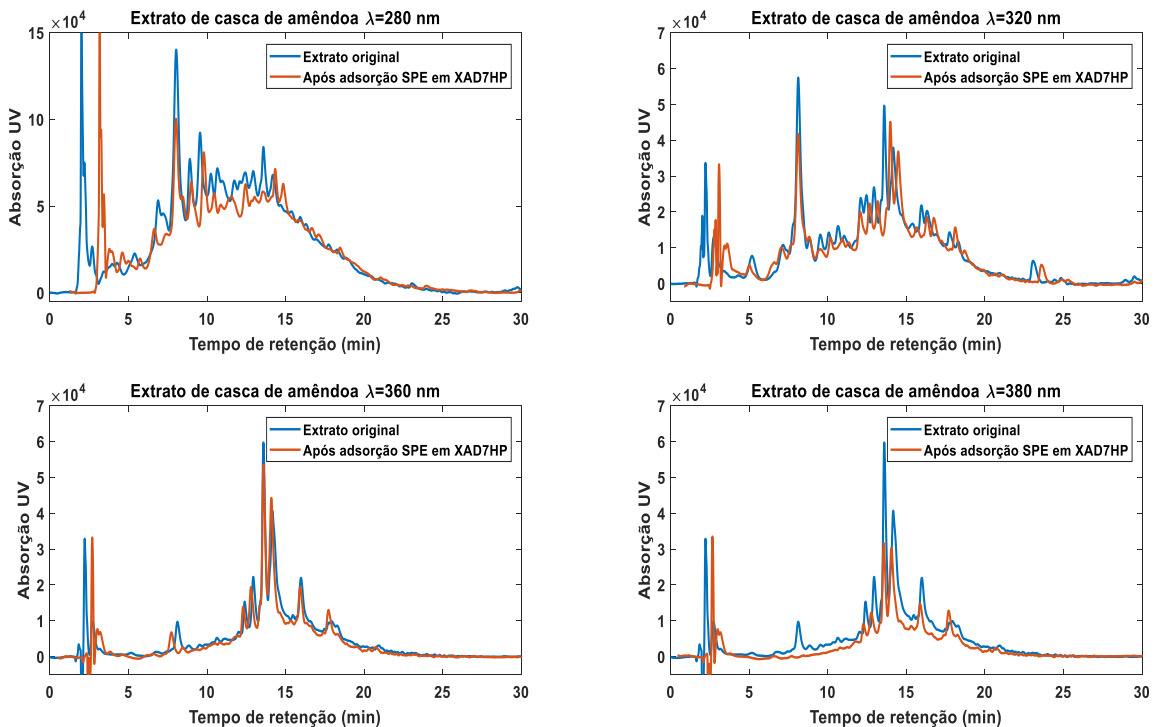


Figura D6: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em XAD7HP.

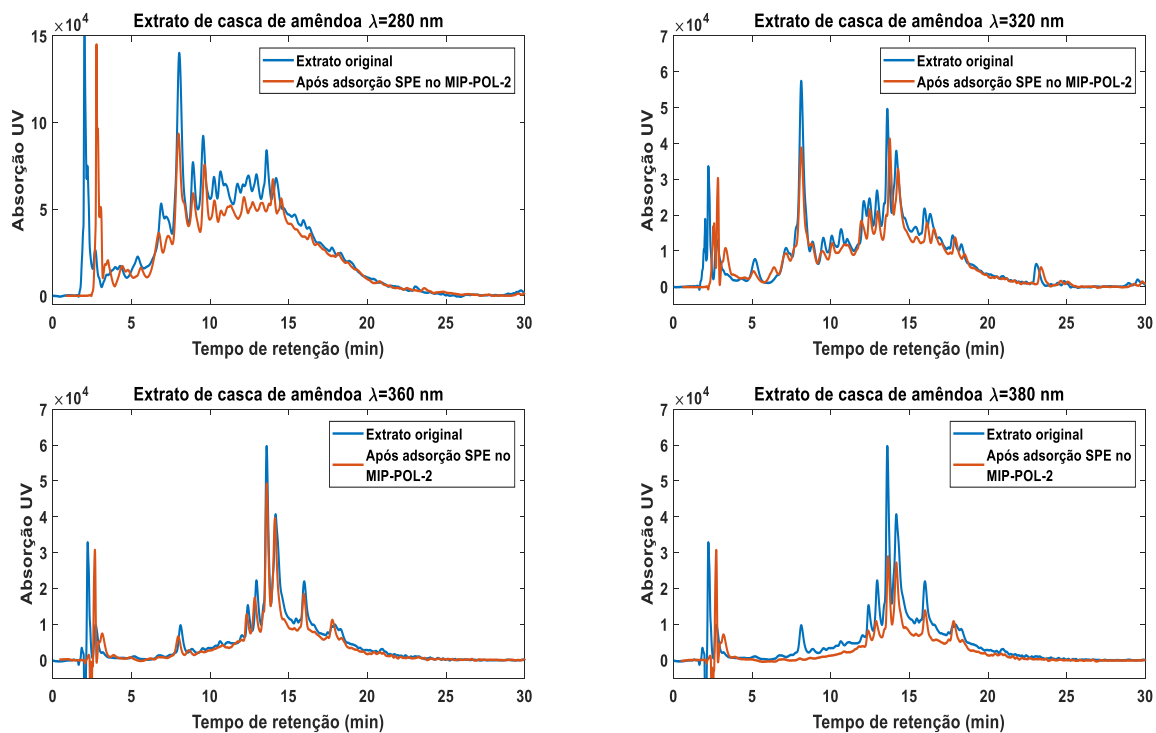


Figura D7: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-POL-2.

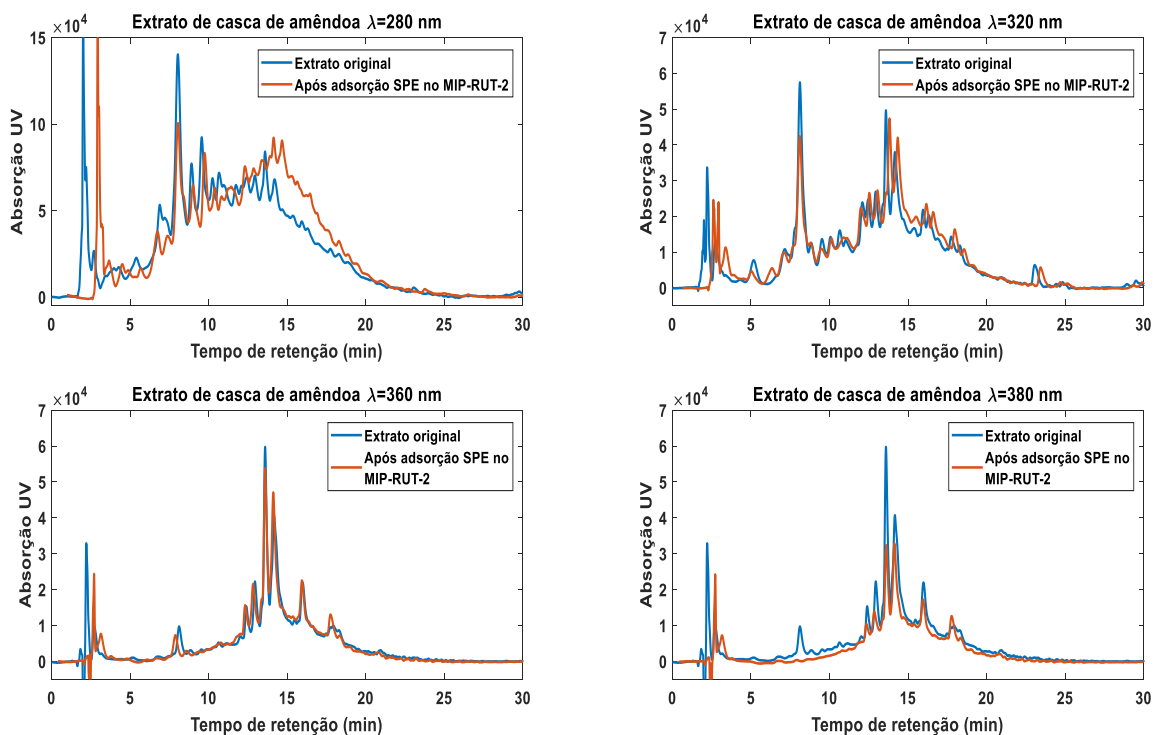


Figura D8: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-2.

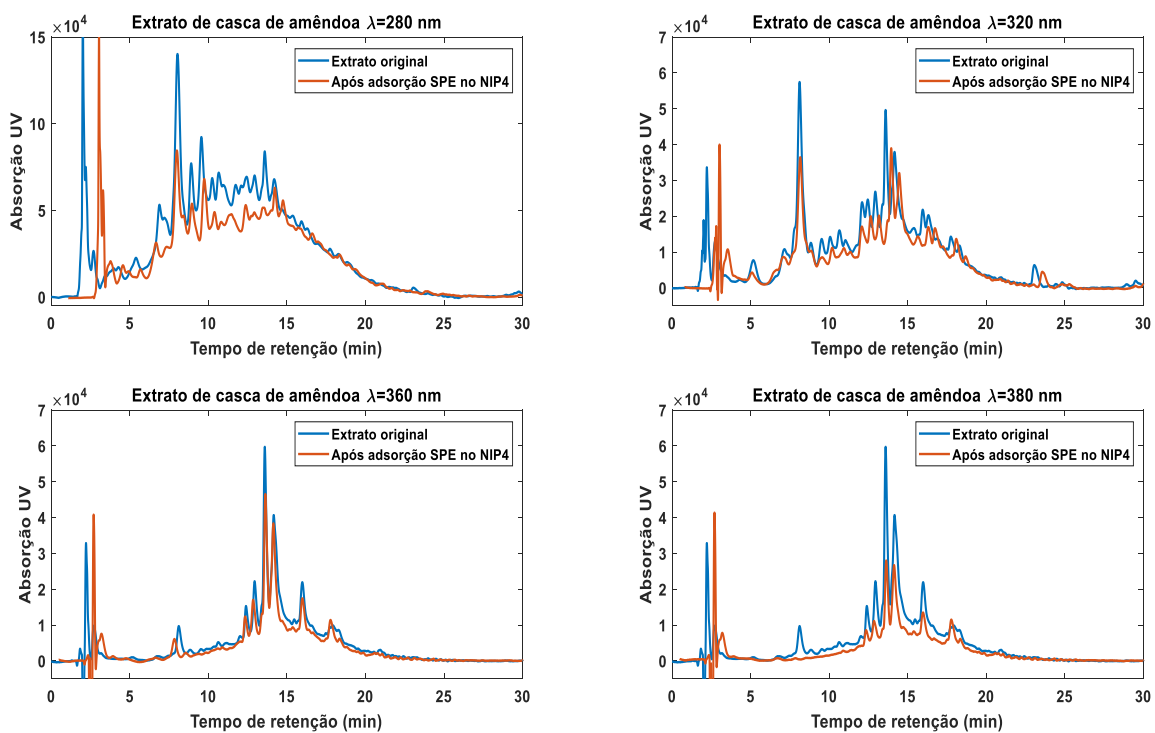


Figura D9: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetonitrilo/dimetilformamida 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no NIP4.

Apêndice E

Análises por HPLC-DAD de extratos de casca exterior de amêndoa (*shell*) em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em diferentes materiais

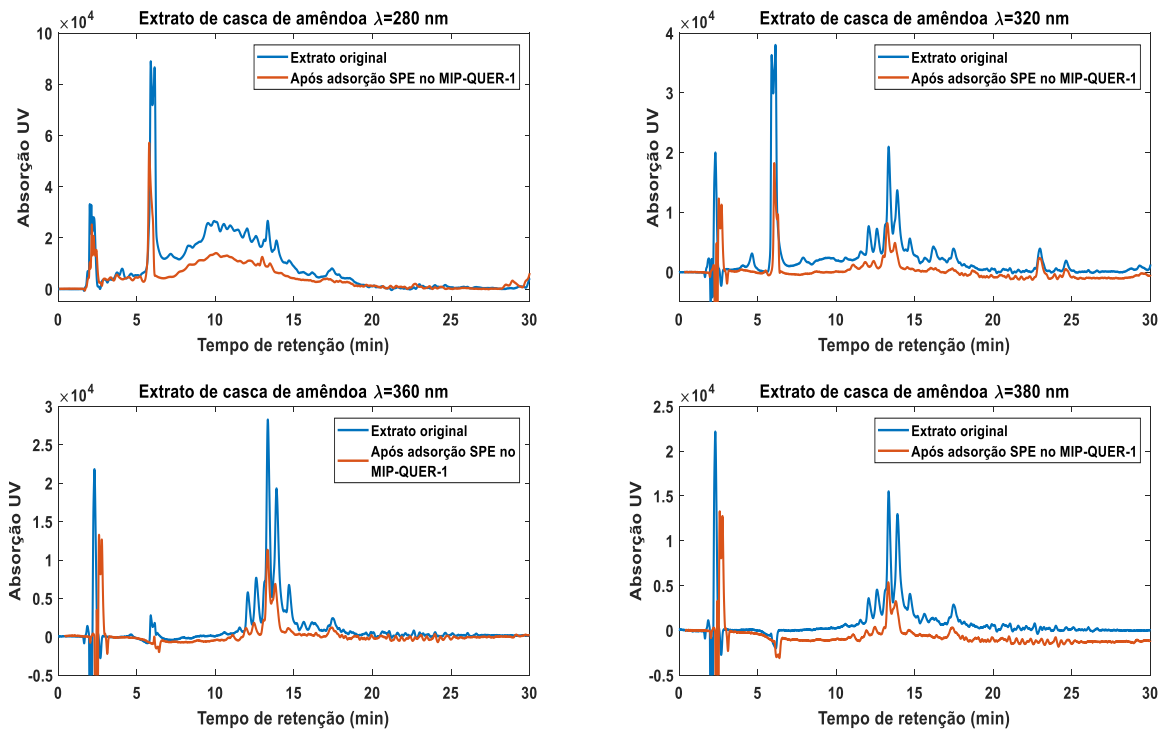


Figura E1: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-QUER-1.

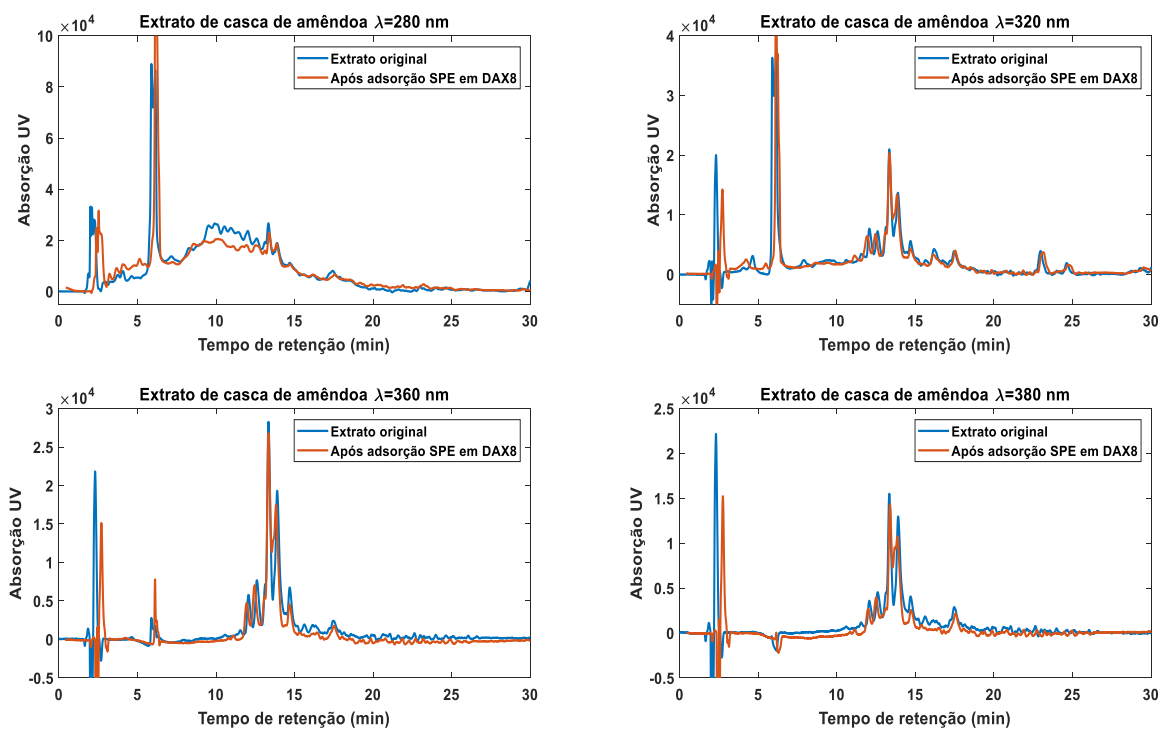


Figura E2: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em DAX8.

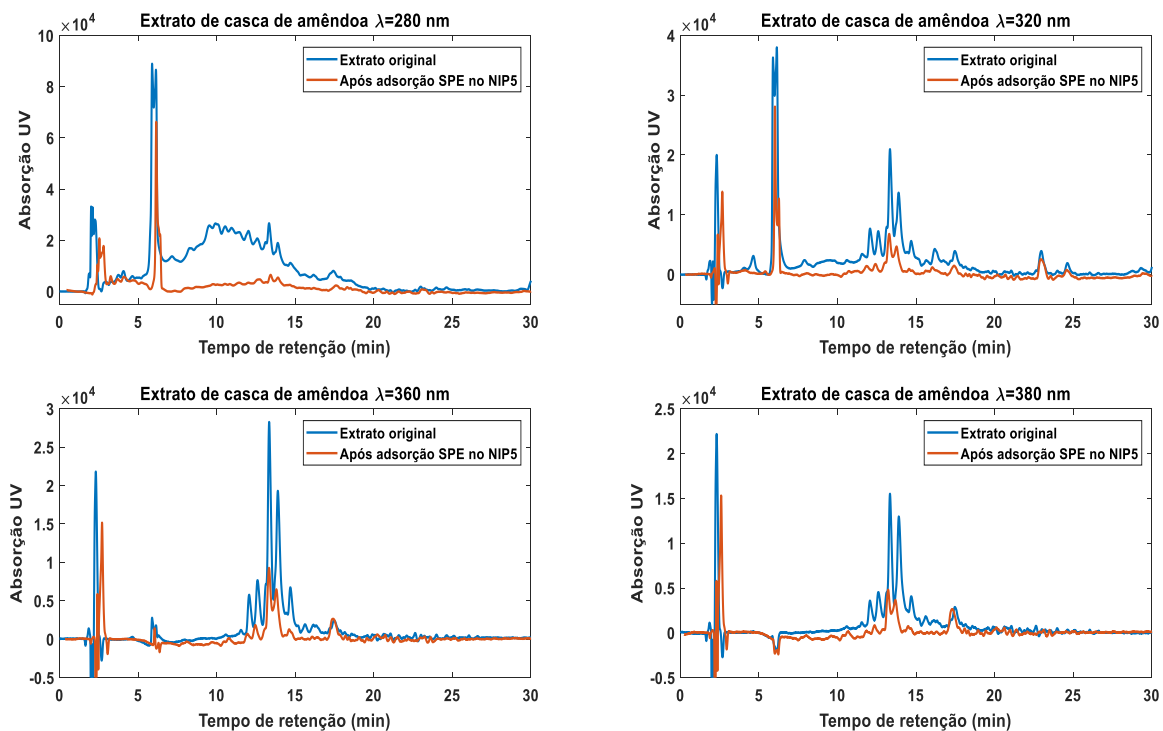


Figura E3: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no NIP5.

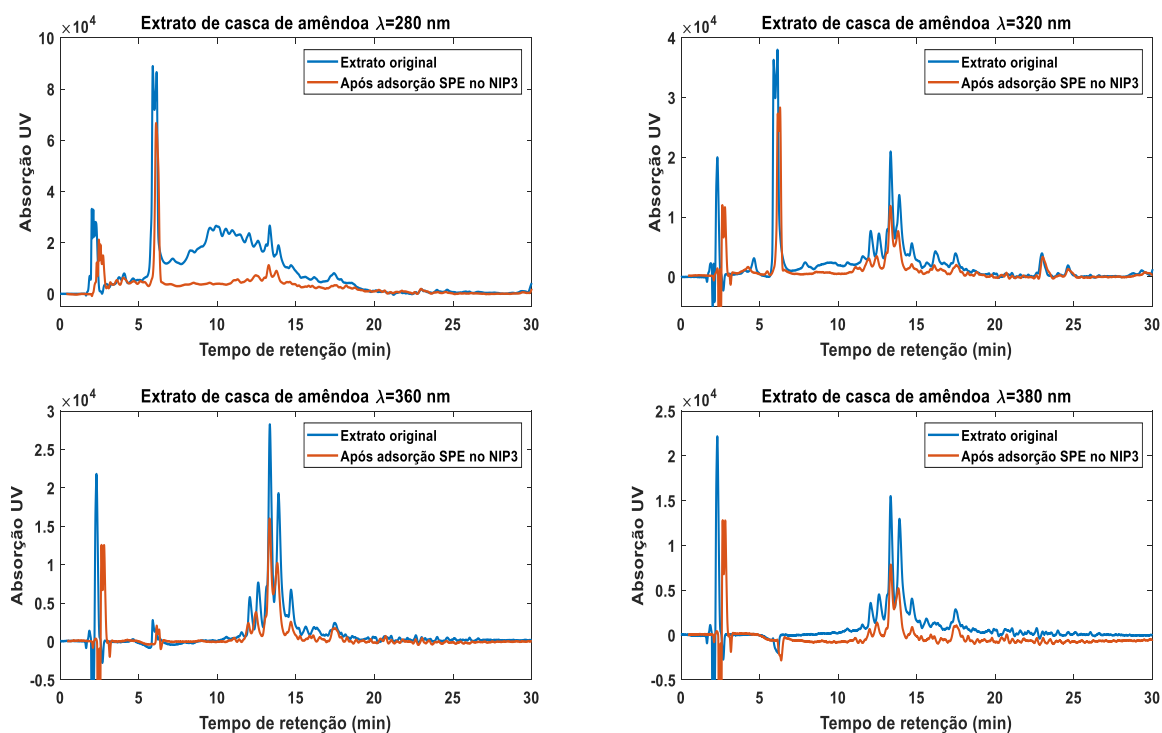


Figura E4: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no NIP3.

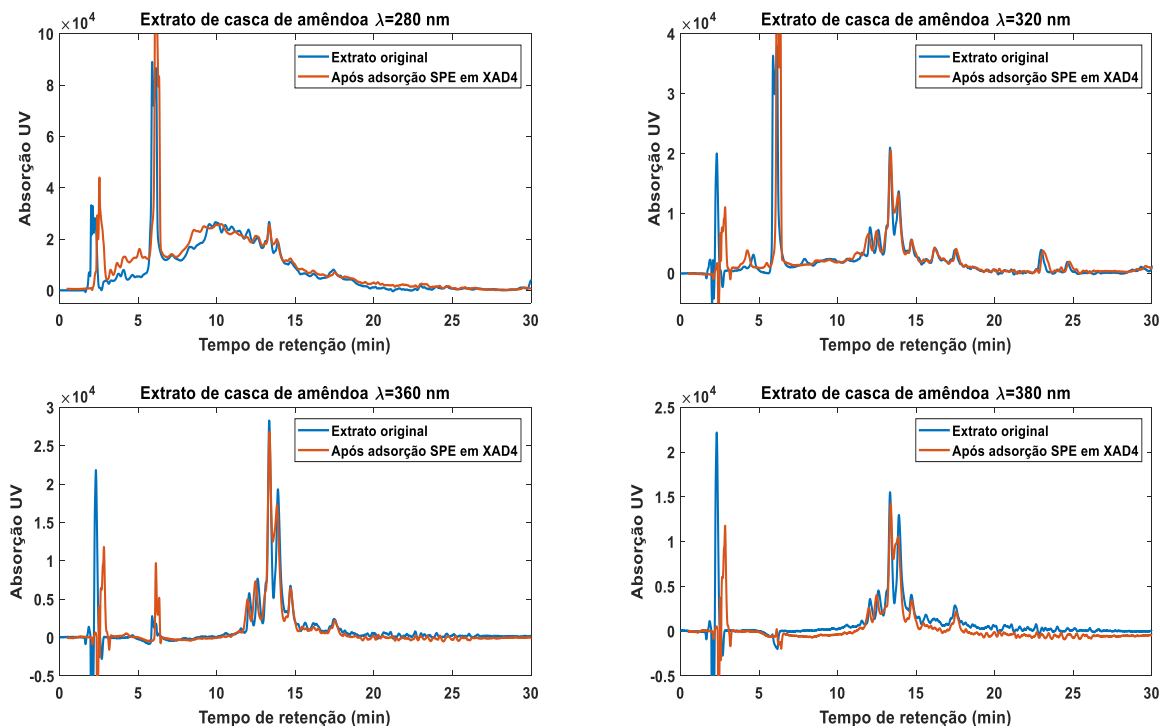


Figura E5: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em XAD4.

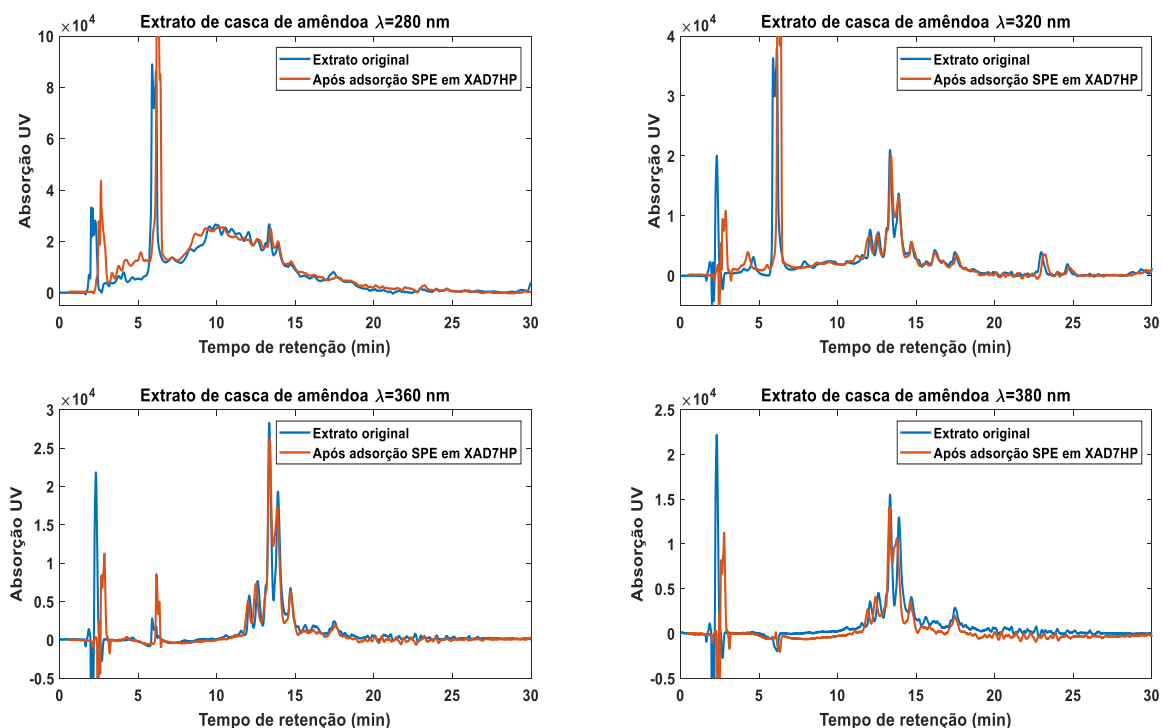


Figura E6: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE em XAD7HP.

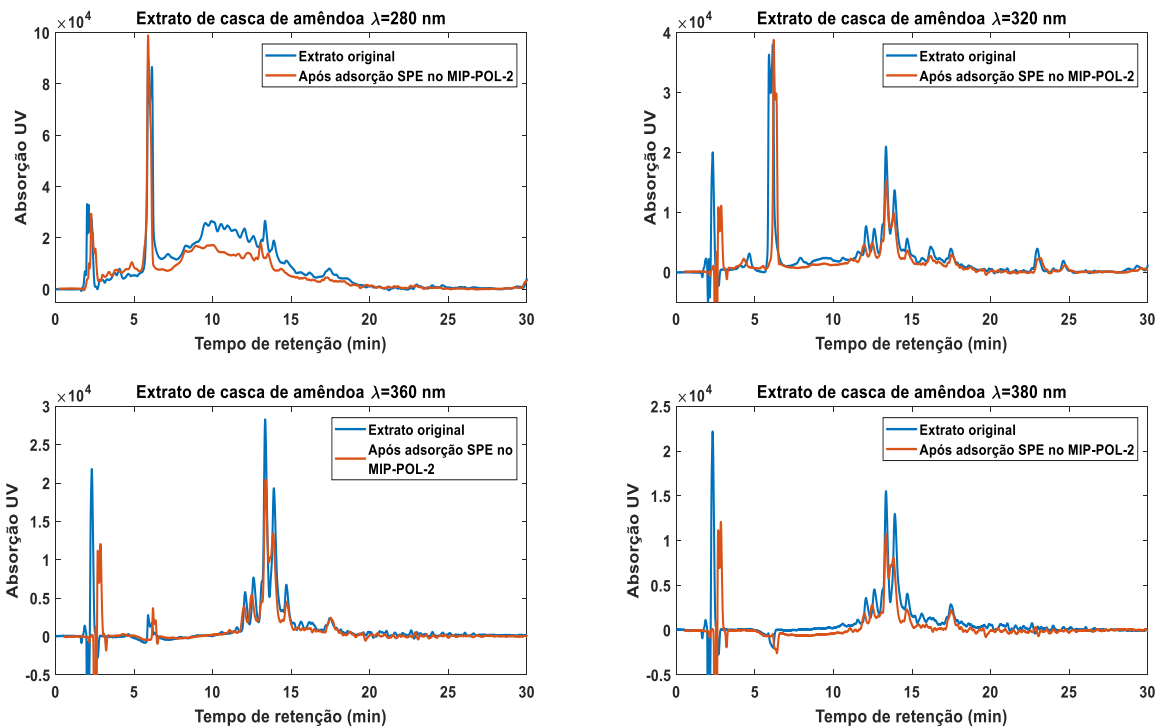


Figura E7: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-POL-2.

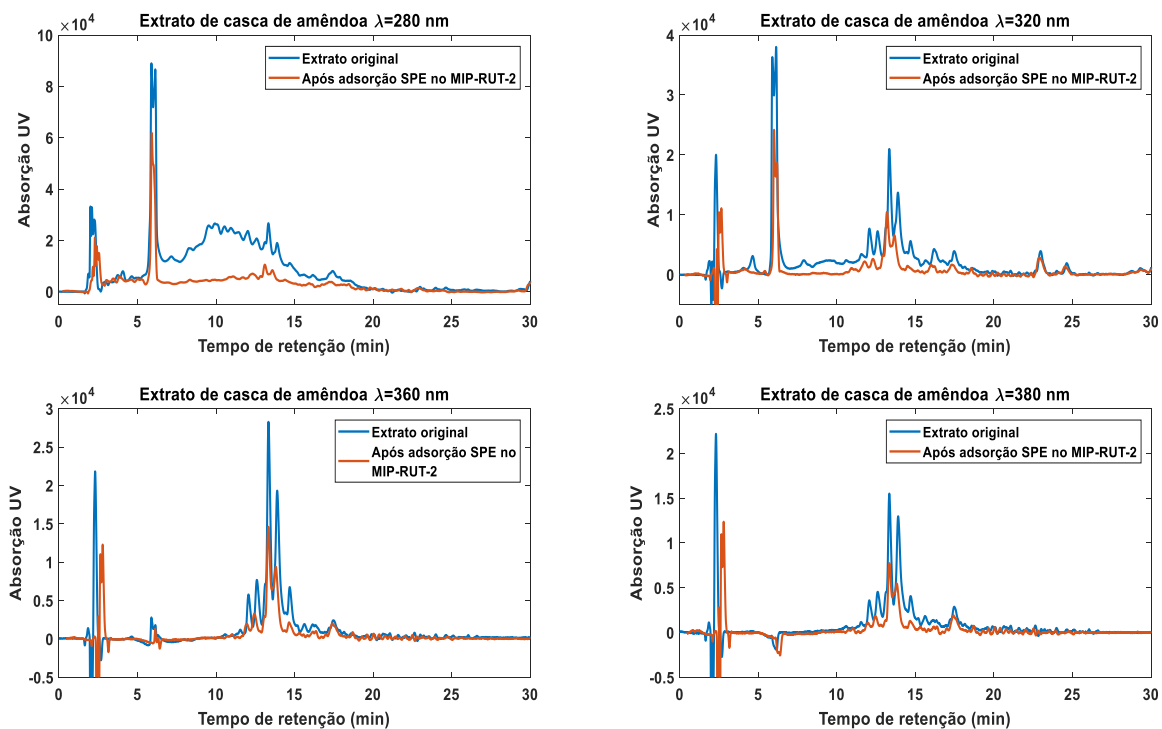


Figura E8: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no MIP-RUT-2.

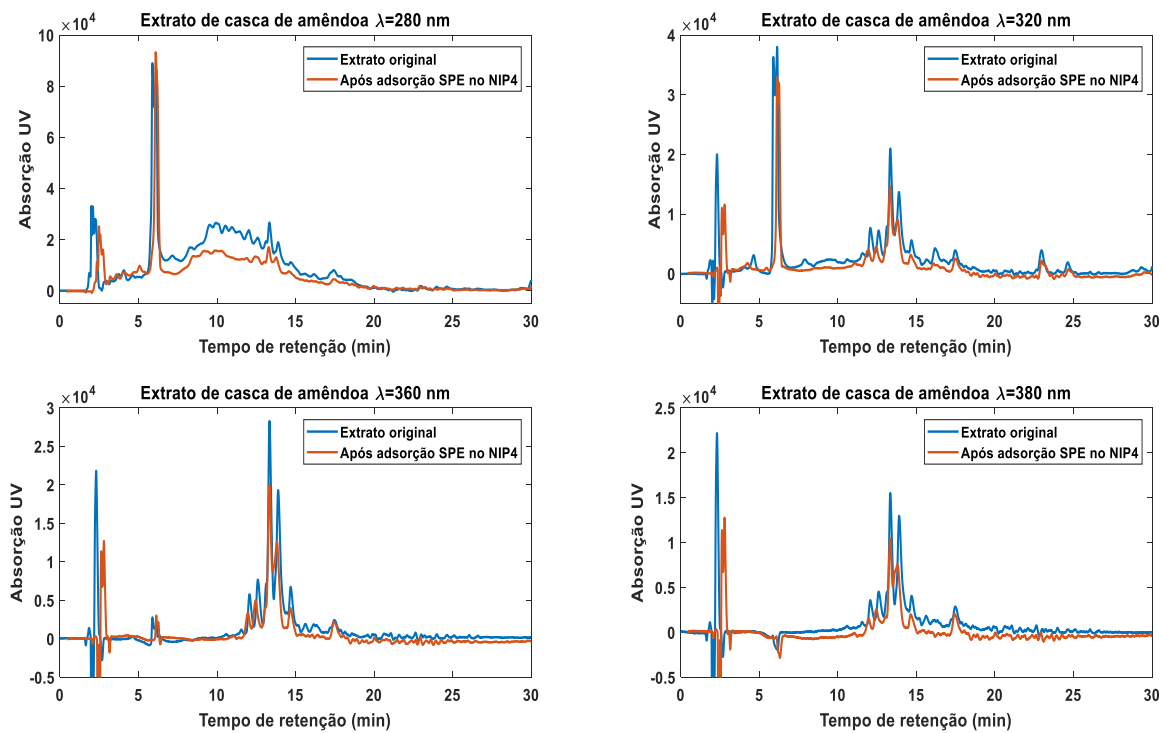


Figura E9: Análise por HPLC-DAD de um extrato de casca de amêndoa em acetato de etilo/etanol 50/50 antes e após a sua adsorção SPE no NIP4.