



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DO EFEITO ANTI TUMORAL E ANTIOXIDANTE DE
DIFERENTES FRACÇÕES RECUPERADAS DO EFLUENTE DA
CORTIÇA ATRAVÉS DO PROCESSO DE MEMBRANAS**

LUÍS MIGUEL LOPES GOMES

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professor Doutor Luís Miguel Minhalma

Professora Doutora Rita Pacheco

Júri:

Presidente: Professor Doutor João Pereira Gomes

Vogais: Professora Doutora Marília Mateus

Professor Doutor Luís Miguel Minhalma

Lisboa

Dezembro de 2016



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DO EFEITO ANTI TUMORAL E ANTIOXIDANTE DE
DIFERENTES FRACÇÕES RECUPERADAS DO EFLUENTE DA
CORTIÇA ATRAVÉS DO PROCESSO DE MEMBRANAS**

LUÍS MIGUEL LOPES GOMES

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professor Doutor Luís Miguel Minhalma

Professora Doutora Rita Pacheco

Júri:

Presidente: Professor Doutor João Pereira Gomes

Vogais: Professora Doutora Marília Mateus

Professor Doutor Luís Miguel Minhalma

Lisboa

Dezembro de 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer, aos Professores Doutores Miguel Minhalma e Rita Pacheco pela orientação desta tese, pela disponibilidade e entrega que sempre demonstraram na orientação do meu trabalho, quer com ideias inovadoras, quer com sugestões e melhorias ao meu desempenho.

Ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), a todos os seus docentes e funcionários, quero agradecer pelo conhecimento que me foi dado ao longo destes 5 anos e que me permitiu atingir esta etapa da minha vida profissional. Quero agradecer em especial à engenheira Carla, à Graça e à Cristina pelo auxílio e companhia que sempre me deram enquanto estive no Laboratório de Ambiente.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), em especial à Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro por me ter acolhido no seu grupo de trabalho e ter sempre demonstrado disponibilidade em me ajudar no que fosse necessário. Ao Professor Carlos Borges pela ajuda nas análises de Espectrometria de Massa e pela disponibilidade e simpatia.

A todos os meus colegas do ISEL, em especial ao Jerson, à Marta e ao Miguel, por me terem acompanhado desde o início, por todas as experiências que passámos juntos, pelo incentivo e momentos bem passados e principalmente pela amizade que desenvolvemos.

Aos colegas de laboratório da FCUL, em especial à Ana, ao André, à Elsa, à Joana e à Laura, pela forma como me acolheram e me ajudaram a adaptar ao laboratório, quero agradecer também pela simpatia e boa disposição de todos e pela disponibilidade que sempre demonstraram em ajudar-me.

À lo, que sempre me acompanhou ao longo do meu percurso académico e pessoal, por todos os momentos que vivemos juntos, pelo apoio, pelo incentivo, pelas gargalhadas e brincadeiras, por tudo.

À minha família, em especial aos meus pais, irmão, avós e sobrinha, pela educação e valores que me transmitiram, pelos conselhos e boa disposição, pelo apoio incondicional, pelo incentivo e pelo carinho e amor que todos os dias me fizeram chegar e que sem isso nada seria possível.

Resumo

Este trabalho teve como objectivo o estudo do potencial antioxidante e anticancerígeno dos compostos presentes no efluente do processamento da cortiça. Recorrendo à tecnologia de membranas o efluente foi fraccionado em três fracções, enriquecidas em compostos com diferentes massas molares (designadas como fracção Pequena, Média e Grande).

Utilizaram-se dois lotes de membranas de ultrafiltração compostas por acetato de celulose, o CA₁ e o CA₄, com um limite de exclusão molecular de 3 e 74 kDa, respectivamente. Para a recuperação da fracção Média e Grande foi necessário recorrer a uma técnica de diafiltração. No final do processo de separação mediu-se a condutividade e a carga orgânica total das correntes de alimentação e permeado, onde se observou uma redução da carga orgânica comprovando a utilidade deste método no tratamento de efluentes industriais.

O efluente e as fracções recuperadas foram caracterizados em termos de Fenóis totais, Taninos e Açúcares redutores, tendo-se determinado que a fracção Grande é a mais rica nestes tipos de compostos, com 0,156 mg fenóis/mg extracto, 0,074 mg taninos/mg extracto e 0,278 mg glucose/mg extracto. Para além disso, foi utilizada a cromatografia líquida de fase reversa acoplada a espectrometria de massa na identificação dos compostos presentes no efluente e nas fracções, sendo que são maioritariamente compostos fenólicos, tais como, o ácido Quínico, Gálico, Protocatecuico, Elágico, entre outros. Para os compostos maioritários fez-se ainda o seu doseamento para cada fracção, tendo-se obtido para a fracção Grande 9 µg ácido Elágico/mg extracto.

Em termos de ensaios de actividade biológica foram realizados estudos de actividade antioxidante através do método do DPPH, em que o efluente e a fracção Grande demonstraram os melhores valores de EC₅₀ de 23,48 e 23,79 µg/mL, respectivamente, e ensaios de citotoxicidade e inibição da proliferação celular em linhas celulares de cancro da mama MCF-7, onde mais uma vez a fracção Grande apresentou os valores mais promissores, tendo-se obtido um IC₅₀ de 0,78 mg/mL para a citotoxicidade e 0,20 mg/mL para a inibição da proliferação celular. Os resultados obtidos permitiram concluir que nenhuma fracção é citotóxica, no entanto a fracção Grande apresenta potencial como agente citoestático das células de MCF-7.

Neste trabalho são ainda apresentados os resultados de um estudo preliminar sobre o efeito da fracção Grande sobre a linha celular tumoral em causa, nomeadamente nas suas proteínas e a permeação dos compostos.

Palavras-chave: Efluente da cortiça, Membranas, Ultrafiltração, Actividades antioxidante e anticancerígena, compostos fenólicos, linha celular do cancro da mama MCF-7.

Abstract

This work aimed to study the antioxidant and anticancer potential of the compounds present in the cork processing wastewater. Using membrane technology the effluent was divided into three fractions, enriched in solutes of small, medium and large molecular weight.

Two batches of cellulose acetate ultrafiltration membranes were used, the CA₁ and CA₄, with a molecular cut-off of 3 and 74 kDa, respectively. For the recovery of Medium and Large fractions it was used the diafiltration mode. At the end of the separation process, the conductivity and the total organic carbon were measured in the feed and in the permeate streams, where there was a reduction of the organic load demonstrating the utility of this method in the treatment of industrial effluents.

The effluent and recovered fractions were characterized in terms of total phenols, tannins and reducing sugars, and it was found that the Large fraction is richer in these types of compounds with 0.156 mg phenol/mg extract, 0.074 mg tannin/mg extract and 0.278 mg glucose/mg extract. In addition, the liquid reverse phase chromatography coupled to mass spectrometry was used to identify the compounds present in the effluent and in the fractions, and they are mainly phenolic compounds, such as the Quinic acid, Gallic, Protocatechuic, Ellagic acid among others. The compounds present in higher quantity were quantified in the different fractions, and it was found that for the Large fraction there are 9 µg/mg extract of Ellagic acid.

In terms of biological activity assays, the antioxidant activity was measured by DPPH method in which the effluent and the Large fraction showed the lowest EC₅₀ values of 23.48 and 23.79 µg/mL, respectively. The cytotoxicity test and inhibition of cell proliferation in cell lines of breast cancer MCF-7 were also carried out, where again the Large fraction showed the most promising values, achieving an IC₅₀ of 0.78 mg/ml for cytotoxicity and 0.20 mg/ml for inhibition of cell proliferation. The results showed that no fraction is cytotoxic, however the Large fraction has potential as a cytostatic agent of MCF-7 cells.

In this work the results of a preliminary study on the effects of the Large fraction in the tumoral cell line are additionally presented, namely in the proteins and in the compounds permeation.

Keywords: Cork wastewater, Membranes, Ultrafiltration, Antioxidant and anti-cancer activities, phenolic compounds, breast cancer cell line MCF-7.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. A Cortiça como matéria-prima	2
1.1.1. Composição	2
1.1.1.1. Suberina	2
1.1.1.2. Lenhina.....	3
1.1.1.3. Polissacáridos	4
1.1.1.4. Compostos Fenólicos	5
1.1.1.5. Taninos.....	6
1.1.2. A Cortiça e o seu potencial	8
1.1.2.1. Potencial Antioxidante	8
1.1.2.2. Potencial Anticancerígeno	9
1.1.3. Processo Industrial do Processamento da Cortiça.....	14
1.1.3.1. Efluente da Cortiça	14
1.2. Processos de Filtração com Membranas	16
1.2.1. Classificação	16
1.2.2. Diafiltração	19
1.2.3. Caracterização das Membranas	20
1.3. Objectivos do trabalho	23
2. Materiais e Métodos	25
2.1. Reagentes	25
2.2. Preparação das Membranas.....	25
2.3. Caracterização das Membranas	26
2.4. Permeação do Efluente da cortiça – Recuperação das fracções pequena, média e grande	27
2.5. Caracterização do Efluente da cortiça e das fracções	29
2.5.1. Quantificação de Fenóis Totais (FT).....	29
2.5.2. Quantificação de Fenóis não Taninos (FNT).....	30
2.5.3. Quantificação de Glúcidos	30
2.5.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .	31
2.5.5. Cromatografia Líquida de elevada resolução (HPLC-DAD).....	31
2.5.6. Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS) ..	31
2.5.7. Actividade Antioxidante	32
2.5.8. Inibição da Peroxidação Lipídica (TBARS)	33
2.6. Ensaio em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7	33

2.6.1.	Determinação da Citotoxicidade	34
2.6.2.	Inibição da Proliferação Celular	35
2.6.3.	Análise preliminar do efeito da fracção Grande sobre as proteínas celulares por SDS-PAGE e a permeação dos compostos.....	36
2.7.	Análise Estatística	37
3.	Resultados e Discussão	39
3.1.	Caracterização das Membranas	39
3.1.1.	Determinação da Permeabilidade Hidráulica	39
3.1.2.	Determinação da rejeição das membranas a sais mono e bivalentes	41
3.1.3.	Determinação da rejeição das membranas a solutos orgânicos	42
3.2.	Ensaio com o Efluente da Cortiça	44
3.2.1.	Fracção Pequena	44
3.2.2.	Fracções Média e Grande	46
3.3.	Caracterização do Efluente da cortiça e das fracções	49
3.3.1.	Quantificação das Fracções do Efluente.....	49
3.3.2.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .	51
3.3.3.	Cromatografia Líquida de elevada resolução (HPLC-DAD).....	53
3.3.4.	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS) ..	57
3.3.5.	Actividades Biológicas do efluente da cortiça e fracções	60
3.3.5.1.	Actividade Antioxidante	60
3.3.5.2.	Inibição da Peroxidação Lipídica	63
3.3.6.	Ensaio em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7	65
3.3.6.1.	Determinação da Citotoxicidade	65
3.3.6.2.	Inibição da Proliferação Celular	69
3.3.6.3.	Análise preliminar do efeito da fracção Grande sobre as células por HPLC-DAD e SDS-PAGE.....	72
4.	Conclusões e Perspectivas Futuras.....	81
5.	Referências Bibliográficas	83
6.	Anexos	91
6.1.	Caracterização das Membranas	91
6.1.1.	Determinação da rejeição a sais mono e bivalentes	91
6.1.2.	Determinação da rejeição das membranas a solutos orgânicos	92
6.2.	Caracterização do Efluente.....	94
6.2.1.	Doseamento das Fracções do Efluente	94
6.2.2.	Espectrometria de Massa	95
6.2.3.	Doseamento dos Padrões	98

6.3. Actividades Biológicas	100
6.3.1. Análise preliminar por Electroforese das proteínas celulares.....	100

Lista de Abreviaturas

COT	Carbono Orgânico Total
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC ₅₀	Concentração de amostra que representa 50% de actividade antioxidante
F-C	Folin Ciocalteu
FNT	Fenóis não Taninos
FOH	Compostos Fenólicos
FT	Fenóis Totais
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de elevada resolução com detector de fotodíodos
IC ₅₀	Concentração de amostra que representa 50% de Citotoxicidade
J _p	Fluxo de Permeação
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada com Espectrometria de Massa
L _p	Permeabilidade Hidráulica
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
MWCO	Limite de Exclusão Molecular
PC	Polarização de Concentração
PEG	Polietilenoglicol
PL	Peroxidação Lipídica
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Q	Caudal mássico
RS	Espécies Radicalares
RSO	Espécies Radicalares de Oxigénio
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reactivas ao Ácido Tiobarbitúrico
SDS-PAGE	Electroforese em Gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes SDS (dodecilossulfato)
UV-vis	Espectroscopia de Ultravioleta-visível

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Distribuição mundial do montado de sobre	1
Figura 1.2 – Modelo estrutural da Suberina proposto por Bernards em 2002.....	3
Figura 1.3 – Modelo estrutural da lenhina no <i>Quercus Suber L</i>	4
Figura 1.4 – a. Estrutura molecular da celulose. b. Estrutura molecular da hemicelulose.....	5
Figura 1.5 – Exemplos de compostos fenólicos que podem ser encontrados na cortiça.	6
Figura 1.6 – Estrutura molecular do Galotanino (esquerda) e Elagitanino (direita).....	7
Figura 1.7 – Modelo de estrutura dos Taninos Condensados.	7
Figura 1.8 – Potenciais mecanismos anticancerígenos de compostos fenólicos de plantas durante o desenvolvimento do cancro as fases 1 e 2 representam as fases do ciclo celular.	11
Figura 1.9 – Estrutura molecular do ácido Elágico	12
Figura 1.10 – Linha celular MCF-7 do cancro da mama.	13
Figura 1.11 – Tanque de cozedura das pranchas de Cortiça.	14
Figura 1.12 – Esquema de um processo de membrana.	16
Figura 1.13 – Esquema de uma Membrana Assimétrica (a) e Simétrica (b).....	17
Figura 1.14 – Processo de polarização da concentração à superfície de uma membrana.	18
Figura 1.15 – Esquema de um processo de Diafiltração.	19
Figura 1.16 – Representação gráfica para a determinação da Permeabilidade Hidráulica.....	20
Figura 1.17 – Representação gráfica para a determinação do MWCO.....	21
Figura 2.1 – Instalação de Ultrafiltração, modelo Ray-Flow, Tech Sep.....	26
Figura 2.2 – Esquema de recolha da fracção Pequena do Efluente da Cortiça.....	28
Figura 2.3 – Esquema de recolha das fracções Média e Grande do Efluente.	29
Figura 3.1 – Determinação da Permeabilidade Hidráulica para a membrana CA ₁ (esquerda) e CA ₄ (direita).	40
Figura 3.2 – Determinação gráfica do MWCO para as membranas CA ₁ (esquerda) e CA ₄ (direita).	42
Figura 3.3 – Representação gráfica da variação do TOC no Permeado em função do Diavolume para ambas as membranas CA ₁ e CA ₄	46
Figura 3.4 – Representação gráfica da variação do TOC na Alimentação em função do Diavolume, para ambas as membranas CA ₁ e CA ₄	47
Figura 3.5 – Representação gráfica da variação do Fluxo em função do Diavolume para ambas as membranas CA ₁ e CA ₄	47
Figura 3.6 – Representação gráfica da variação do coeficiente de rejeição em função do Diavolume para ambas as membranas CA ₁ e CA ₄	48
Figura 3.7 – Comparação dos espectros de infravermelhos obtidos das fracções recolhidas e do efluente, em KBr (1 mg).	51
Figura 3.8 – Cromatograma do efluente da cortiça para uma concentração de 1mg/mL.....	53
Figura 3.9 – Sobreposição dos cromatogramas do Efluente com a fracção Pequena	54

Figura 3.10 – Sobreposição dos cromatogramas do Efluente com a fracção Média ..	54
Figura 3.11 – Espectros de UV-vis dos picos 2a. (esquerda) e 4a. (direita).	55
Figura 3.12 – Estrutura molecular do HHDP.	55
Figura 3.13 – Sobreposição dos cromatogramas do Efluente com a fracção Grande.	56
Figura 3.14 – Estruturas químicas de compostos identificados no Efluente da cortiça.	58
Figura 3.15 – Perfis antioxidantes para as fracções recolhidas e para o efluente, onde C representa a concentração em $\mu\text{g/mL}$ e AA representa a actividade antioxidante em %.	60
Figura 3.16 – Influência da quantidade de Fenóis e Taninos na Actividade Antioxidante de cada fracção e do efluente.	61
Figura 3.17 – Representação gráfica da Inibição da Oxidação Lipídica do ácido Gálico, Quínico e Elágico, em função da concentração, onde C representa a concentração em $\mu\text{g/mL}$ e Ini. representa a inibição da peroxidação lipídica em %.	63
Figura 3.18 – Perfis citotóxicos em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7, para o efluente e para as fracções recolhidas, onde C representa a concentração em mg/mL e Cit. representa a citotoxicidade em %.	65
Figura 3.19 – Perfis citotóxicos em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7 para os padrões em estudo, onde C representa a concentração em mg/mL e Cit. representa a citotoxicidade em %.	67
Figura 3.20 – Perfis da inibição da proliferação celular em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7 para as fracções recolhidas e para o efluente, onde C representa a concentração em mg/mL e Via. representa a viabilidade celular em %.	69
Figura 3.21 – Comparação dos cromatogramas das células removidas, de cada concentração da fracção Grande.	72
Figura 3.22 – Comparação dos cromatogramas das células removidas, de cada concentração da fracção Grande com a mesma, nos primeiros 5 minutos da cromatografia.	73
Figura 3.23 – Comparação dos espectros de UV-vis do pico 1 para a fracção Grande e para as células do controlo e do IC ₁₀ com o padrão de ácido Quínico.	74
Figura 3.24 – Comparação dos cromatogramas dos sobrenadantes retirados de cada concentração da fracção Grande.	75
Figura 3.25 – Electroforese desnaturante SDS-Page, Gel 1: S80 – Sobrenadante do IC80; S50 – Sobrenadante do IC50; S10 – Sobrenadante do IC10; SC – Sobrenadante do controlo; M – Marcador de peso molecular NZY Blue Protein Marker; Gel 2: Meio – Meio de cultura. 20 μg de todas as amostras.	76
Figura 3. 26 – Comparação das intensidades das bandas obtidas no gel de electroforese para os sobrenadantes dos poços do controlo e das concentrações de IC10, IC50, IC80 da fracção Grande.	78
Figura 6.1 – Curva de calibração para a quantificação dos Fenóis totais e Taninos. .	94
Figura 6.2 – Curva de calibração para a quantificação dos Açúcares redutores.	94
Figura 6.3 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 191 correspondente à molécula desprotonada de ácido Quínico.	95
Figura 6.4 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 169 correspondente à molécula desprotonada de ácido Gálico.	95
Figura 6.5 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 153 correspondente à molécula desprotonada de ácido Protocatecuico.	96

Figura 6.6 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 291 correspondente à molécula desprotonada de ácido carboxílico de Brevifolina.....	96
Figura 6.7 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 301 correspondente à molécula desprotonada de ácido Elágico.....	97
Figura 6.8 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 183 correspondente à molécula desprotonada de Galato de Metilo.	97
Figura 6.9 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 711 correspondente à molécula desprotonada de Ácido-o-hexósido acetil triterpeno.	98
Figura 6.10 – Curva de calibração do ácido Quínico obtida por HPLC.	98
Figura 6.11 – Curva de calibração do ácido Gálico obtida por HPLC.	99
Figura 6.12 – Curva de calibração do ácido Elágico obtida por HPLC.	99
Figura 6.13 – Curva de calibração de BSA para o doseamento de proteína.	100
Figura 6.14 - Curva de Calibração do logaritmo do peso molecular (kDa) em função da mobilidade relativa do marcador.	101

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Constituição química da Cortiça do <i>Quercus Suber L</i>	2
Tabela 1.2 – Classificação de Processos com Membranas.....	18
Tabela 2.1 – Reagentes utilizados na preparação das Membranas.....	25
Tabela 3.1 – Valores registados experimentalmente para a massa de água recolhida, o tempo do ensaio e a temperatura da água para as membranas CA ₁ e CA ₄	39
Tabela 3.2 – Caudais mássicos (Q), fluxo de permeação (Jp) e fluxo a 25 °C para as membranas CA ₁ e CA ₄	40
Tabela 3.3 – Permeabilidade Hidráulica para as membranas CA ₁ e CA ₄	41
Tabela 3.4 – Coeficientes de rejeição a sais monovalentes e bivalentes, para as membranas CA ₁ e CA ₄	41
Tabela 3.5 – Coeficiente de rejeição aos solutos orgânicos para a membrana CA ₁	42
Tabela 3.6 – Coeficiente de rejeição aos solutos orgânicos para a membrana CA ₄	42
Tabela 3.7 – Limite de exclusão molecular para as membranas CA ₁ e CA ₄	43
Tabela 3.8 – Valores experimentais para os ensaios com o efluente da cortiça utilizando as membranas CA ₁	45
Tabela 3.9 – Condutividade, cor e carbono orgânico total (COT) das soluções de Alimentação (A) e Permeado (P), e respectivos coeficientes de rejeição.....	45
Tabela 3.10 – Caracterização das diferentes fracções relativamente a Fenóis Totais, Taninos e Açúcares.....	49
Tabela 3.11 – Intensidade relativa dos sinais dos picos maioritários obtidos por HPLC para o Efluente da cortiça e suas fracções.....	56
Tabela 3.12 - Compostos fenólicos identificados no efluente da cortiça e respectivas fracções, perfis de fragmentação MS ⁿ e de absorção no UV.....	57
Tabela 3.13 - Compostos fenólicos identificados no efluente da cortiça e perfis de fragmentação MS ⁿ	57
Tabela 3.14 – Doseamento do Ácido Quínico, Gálico e Elágico nas diferentes fracções recuperadas e no Efluente para uma concentração de 1 mg/mL.....	59
Tabela 3.15 – Determinação do EC ₅₀ da Actividade Antioxidante de cada fracção.....	61
Tabela 3.16 – Determinação do EC ₅₀ da Actividade Antioxidante de cada padrão.....	62
Tabela 3.17 – Determinação do EC ₅₀ da inibição da oxidação lipídica de cada padrão.....	64
Tabela 3.18 – Determinação do IC ₅₀ da Actividade Citotóxica de cada fracção a 24h.....	66
Tabela 3.19 – Determinação do IC ₅₀ da Actividade Citotóxica em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7 de cada padrão.....	67
Tabela 3.20 – Determinação da Citotoxicidade em linhas celulares humanas de cancro da mama MCF-7 de cada fracção a 48 e 72h.....	68
Tabela 3.21 – Determinação do IC ₅₀ da Inibição da Proliferação Celular em linhas celulares humanas de cancro da mama MCF-7 de cada fracção.....	70
Tabela 3.22 – Peso molecular e respectivas intensidades das bandas presentes no gel de electroforese para os sobrenadantes recolhidos e meio de cultura.....	77

Tabela 6.1 – Valores experimentais de massa de água recolhida, tempo de ensaio e temperatura. Caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para a membrana CA ₁ .	91
Tabela 6.2 – Valores experimentais de massa de água recolhida, tempo de ensaio e temperatura. Caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para a membrana CA ₄ .	91
Tabela 6.3 – Condutividade e concentrações das soluções de Alimentação (A) e Permeado (P) para as membranas CA ₁ e CA ₄ .	92
Tabela 6.4 – Valores experimentais de massa de água recolhida, tempo de ensaio e temperatura. Caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para a membrana CA ₁ .	92
Tabela 6.5 – Valores experimentais de massa de água recolhida, tempo de ensaio e temperatura. Caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para a membrana CA ₄ .	93
Tabela 6.6 – Carga Orgânica Total (COT) das soluções de Alimentação (A) e Permeado (P) para as membranas CA ₁ .	93
Tabela 6.7 – Carga Orgânica Total (COT) das soluções de Alimentação (A) e Permeado (P) para as membranas CA ₄ .	93
Tabela 6.8 – Peso molecular do marcador e respectiva determinação da mobilidade relativa.	100

1. Introdução

O Sobreiro é a única árvore capaz de produzir cortiça de uma forma sustentável, uma vez que apresenta uma grande longevidade e uma enorme capacidade de regeneração. Esta árvore requer uma grande quantidade de luz solar e uma combinação pouco comum de baixa precipitação e elevada humidade. [1,2]

O seu nome científico é *Quercus Suber L.* e é uma espécie característica da região mediterrânica ocidental, capaz de viver, em média, 200 anos. O Sobreiro é património nacional em Portugal e o seu abate é expressamente proibido, exceptuando em casos de doença ou morte. Em Portugal existem cerca de 740 000 hectares de montado de sobro, o que representa 34% da área mundial, tornando assim o país no líder mundial da plantação de Sobreiro, Figura 1.1. [1,2,3]

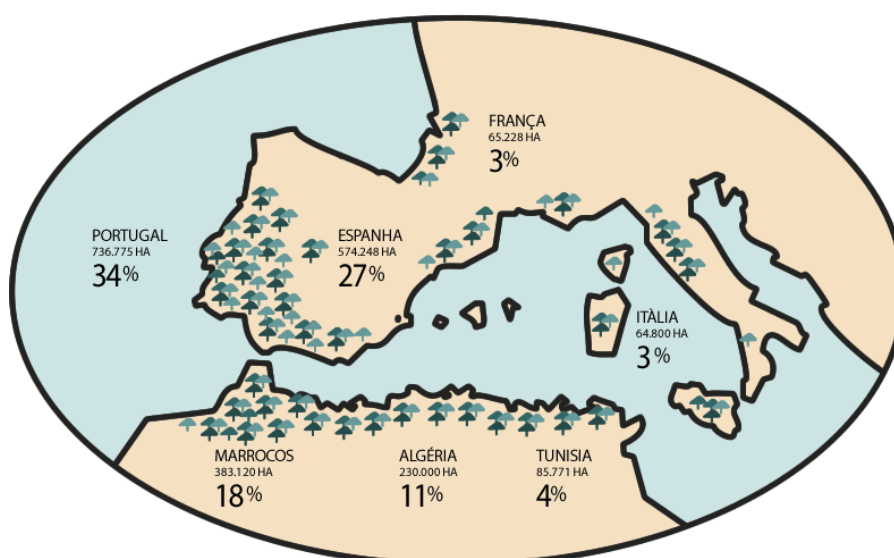


Figura 1.1 - Distribuição mundial do montado de sobro. [2]

A cortiça é a casca do Sobreiro, é um tecido vegetal que reveste o tronco da árvore. Pode ser removida do Sobreiro de 9 em 9 anos, sendo que o primeiro descortiçamento apenas pode ocorrer 25 anos depois da sua plantação. No entanto, essa cortiça não pode ser utilizada na indústria, uma vez que não apresenta as características ideais para tal efeito. Somente após o 3º descortiçamento, cerca de 40 anos após a plantação da árvore, a cortiça tem qualidade suficiente para ser utilizada na indústria corticeira. A produção mundial de cortiça ultrapassa as 200 mil toneladas por ano, sendo que Portugal é líder com cerca de 50%, seguido pela Espanha com 30%. [3]

1.1. A Cortiça como matéria-prima

1.1.1. Composição

A cortiça proveniente do *Quercus suber L.* tem excelentes características, como a sua alta elasticidade, baixa densidade, baixa condutividade térmica e impermeabilidade, que a tornam um material de excelência para isolamentos e revestimentos. A sua constituição química tem sido muito estudada, tendo-se chegado á conclusão de que a mesma depende de factores como a origem geográfica, o clima, as condições do solo, a idade da árvore e a sua origem genética. ^[4,5] No entanto a composição química da cortiça apresenta, genericamente, a distribuição que consta na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Constituição química da Cortiça do *Quercus Suber L.*^[4]

Composto	Distribuição
Suberina	40 %
Lenhina	22 %
Polissacáridos	18 %
Extractáveis	15 %

Suberina e Lenhina são, portanto, os principais constituintes da cortiça, que em combinação com uma morfologia celular confere propriedades únicas à cortiça. Entre os extractáveis, podemos encontrar os compostos fenólicos e taninos. ^[5,6]

1.1.1.1. Suberina

A **Suberina**, Figura 1.2, é um biopolímero natural, tipicamente encontrado nas paredes celulares das plantas. É a principal componente da cortiça, e caracteriza-se por ser uma macromolécula de estrutura complexa com ligações éster entre os monómeros, que inclui uma parte aromática e outra alifática (Figura 1.2) A suberina presente na cortiça é constituída por uma estrutura de poliéster de ácidos gordos de cadeia longa, hidroxilo e ácidos fenólicos, ligadas através de grupos éster, com o ácido ferúlico actuando como uma ponte entre o aromático e os domínios alifáticos. Se o domínio aromático é parte da molécula de suberina é ainda matéria de alguma discussão. ^[4,7]

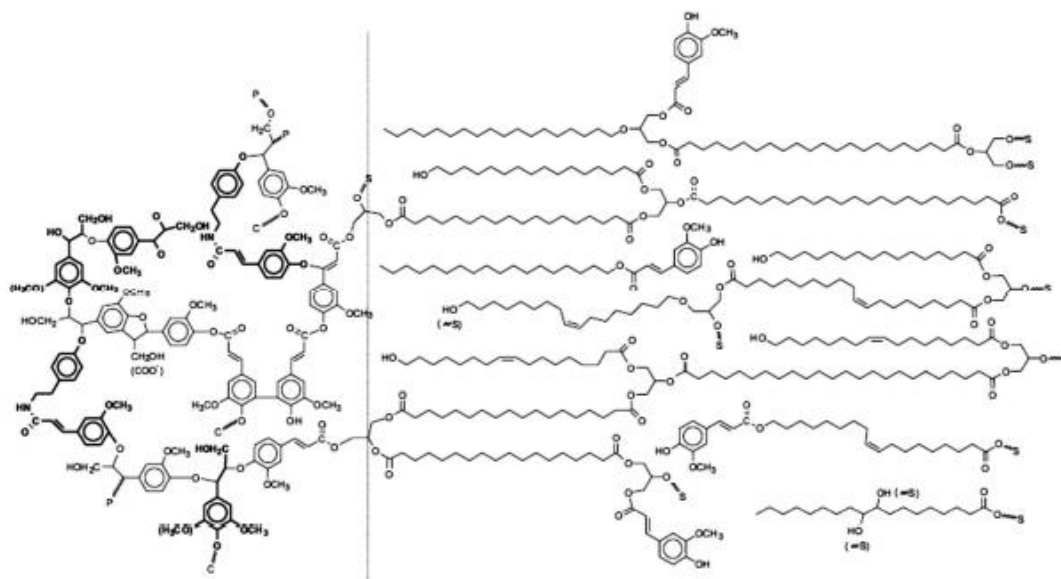


Figura 1.2 – Modelo estrutural da Suberina proposto por Bernards em 2002. [7]

As propriedades da suberina são notáveis, pois é praticamente infundível e insolúvel em todos os solventes orgânicos comuns (álcool, éter, clorofórmio, ácido sulfúrico e ácido clorídrico), conferindo à cortiça a sua impermeabilidade. [4]

1.1.1.2. Lenhina

A **lenhina**, Figura 1.3, é o polímero natural mais abundante na natureza a seguir à celulose. É um polímero de massa molecular elevada, constituída por três unidades monoméricas precursoras, que são os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. A caracterização completa da lenhina na cortiça está ainda incompleta devido à complexa relação entre a lenhina e a fracção aromática da suberina. No entanto, Marques *et al.* descobriram que a cortiça é composta de um tipo G de lenhina, com 94-96% guaiacilo, menos do que 3-5% de siringilo e 2-3% de unidades hidroxifenilo. [8,9,10]

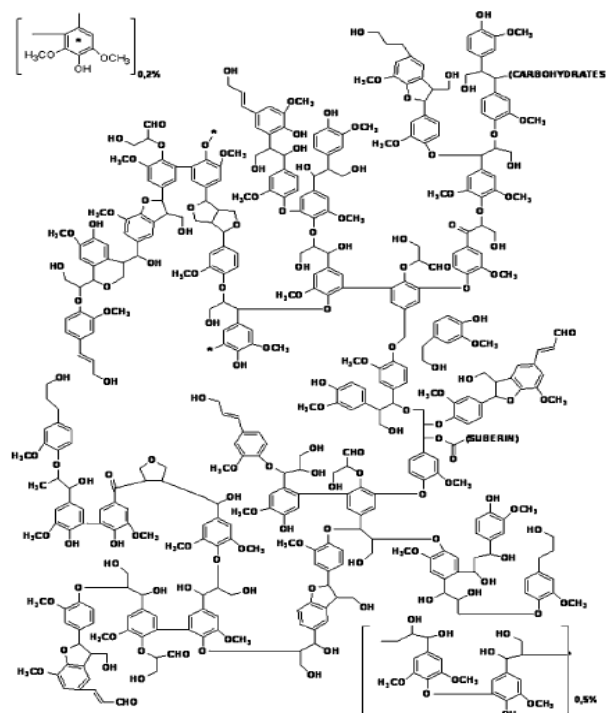


Figura 1.3 – Modelo estrutural da lenhina no *Quercus suber* L.^[4]

Na cortiça, a lenhina é quantificada como resíduo, ou seja, após a extracção dos polifenóis e taninos com solventes, após a despolimerização da suberina e a hidrólise dos polissacáridos, admite-se que o restante é lenhina. Esta molécula confere à cortiça a sua rigidez e resistência a ataques biológicos.^[4]

1.1.1.3. Polissacáridos

Para além dos componentes maioritários da cortiça, a suberina e a lenhina, os outros componentes presentes em menores percentagens tem uma elevada influência nas propriedades químicas e físicas da cortiça. Os **polissacáridos**, em conjunto com a lenhina, são responsáveis por conferir rigidez à parede das células da Cortiça. Estes podem ser constituídos por dois tipos de polímeros, a celulose (Figura 1.4a) e a hemicelulose (Figura 1.4b), que são, parcialmente solúveis em água e em soluções alcalinas.^[4]

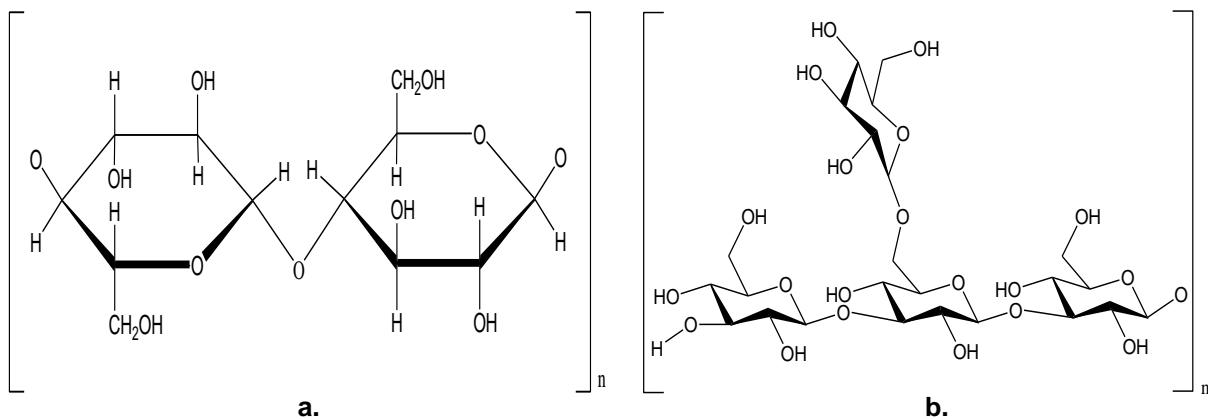


Figura 1.4 – a. Estrutura molecular da celulose. b. Estrutura molecular da hemicelulose.

1.1.1.4. Compostos Fenólicos

Os componentes que se encontram em menor quantidade na Cortiça são os **compostos fenólicos**, estes compostos são também conhecidos como extractáveis, uma vez que ao contrário dos restantes componentes da cortiça, estes podem ser facilmente removidos com recurso a solventes. ^[3]

Uma célula de cortiça produz dois tipos de metabolitos: metabolitos primários, envolvidos directamente no crescimento e metabolismo (hidratos de carbono, lipídios e proteínas), e metabolitos secundários, considerados como produtos finais do metabolismo primário e que não estão envolvidos na actividade metabólica (alcalóides, compostos fenólicos, esteróis, esteróides, óleos essenciais, lenhinas e taninos). ^[11]

Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos de constituintes secundários sintetizados, não só pela cortiça, como por frutas, vegetais e outras plantas, e que possuem determinados benefícios para a saúde. Eles são caracterizados pelas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, e podem proteger contra o stress oxidativo e determinadas doenças. ^[12]

Os fenóis podem ser moléculas simples, de baixo peso molecular e anéis individuais, ou grandes e complexos taninos/polifenóis derivados. Eles são classificados com base no número e arranjo dos seus átomos de carbono e geralmente são encontrados conjugados com açúcares e ácidos orgânicos. Os compostos fenólicos são caracterizados por terem, pelo menos, um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo ligados e a sua acção antioxidante pode ser devido à sua elevada tendência para quelar metais através dos grupos referidos. ^[12,13]

Na cortiça já foram identificados diversos compostos fenólicos (Figura 1.5), dentro os quais os ácidos Gálico, Quínico, Elágico, Vanílico, Siríntrico, Protocatecuico e Ferúlico. ^[14]

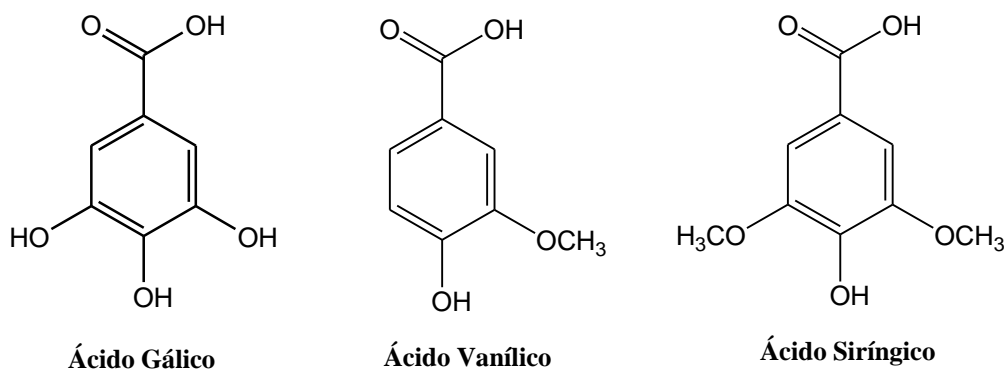


Figura 1.5 – Exemplos de compostos fenólicos que podem ser encontrados na cortiça.

1.1.1.5. Taninos

Outro tipo de compostos que se inserem na categoria de extractáveis da cortiça são os **Taninos**. Estes são polifenóis, por vezes chamados polifenóis vegetais com massa molecular compreendida entre 500 e 20000 g/mol, que podem ser encontrados em forma de polímeros. ^[4,15]

As características que distinguem os taninos dos polifenóis de plantas e de outros tipos de polifenóis são, basicamente, as propriedades de ligação a proteínas, a pigmentos, a compostos moleculares grandes e a iões metálicos. Estas propriedades que os taninos exibem são devido à sua estrutura química, uma vez que estas moléculas podem apresentar dois ou três grupos hidroxilo fenólicos num anel de fenilo, constituindo uma molécula de tamanho moderadamente grande. ^[15]

Os Taninos podem ser divididos em duas classes, os Taninos hidrolisáveis e os Taninos condensados. Os hidrolisáveis são aqueles que após a hidrólise originam um monómero de glucose e um ácido fenólico, podendo ser divididos ainda, em galotaninos ou elagitaninos (Figura 1.6), consoante o ácido fenólico presente (ácido Gálico ou Elágico). [4,15,16]

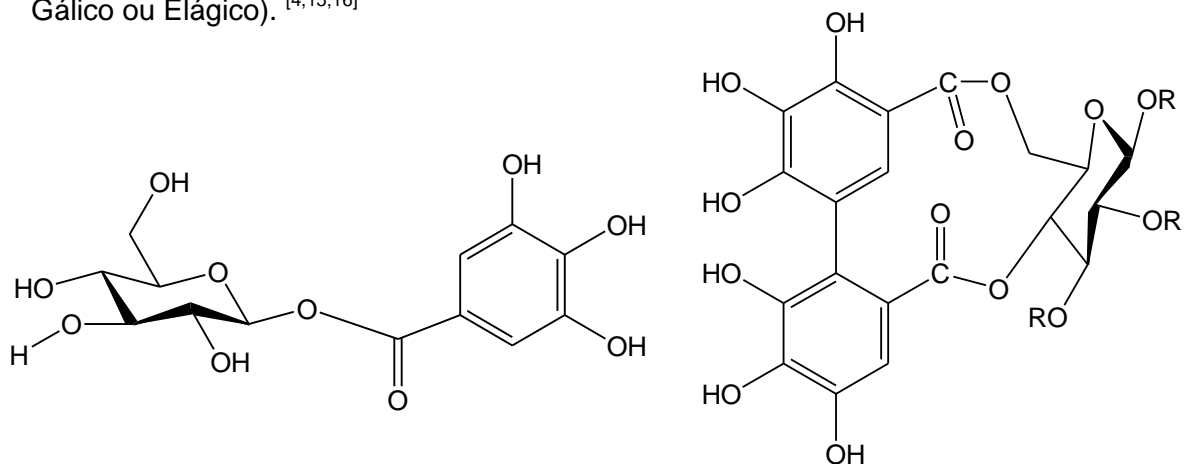


Figura 1.6 – Estrutura molecular do Galotanino (esquerda) e Elagitanino (direita).

Os Taninos condensados (Figura 1.7) podem encontrar-se na forma de oligómeros ou na forma de polímeros, ambos formados pela condensação de duas ou mais unidades, nomeadamente flavanol e flavandiol, constituindo polímeros de catequinas e leucoantocianidinas, respectivamente. Como os taninos condensados produzem pigmentos avermelhados, da classe das antocianidinas, após degradação com o ácido, esta classe de taninos também pode ser denominada como proantocianidina. [4,15,16]

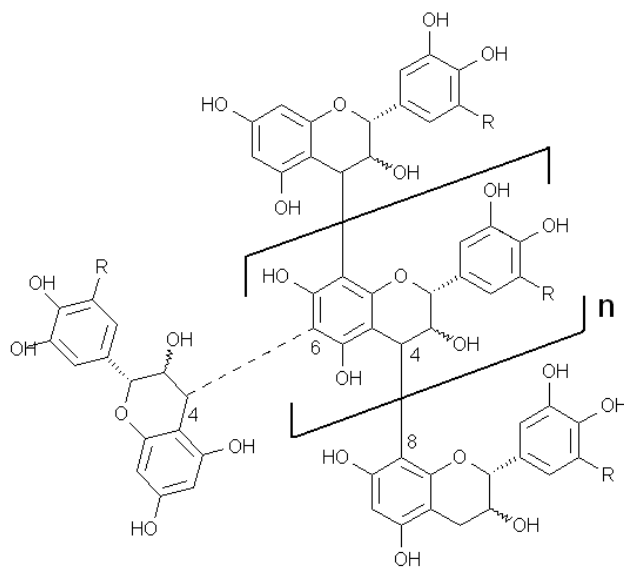


Figura 1.7 – Modelo de estrutura dos Taninos Condensados. [4]

1.1.2. A Cortiça e o seu potencial

O potencial da cortiça, para além do seu uso tradicional, reside nos seus componentes de baixo peso molecular, como é o caso dos taninos, e compostos fenólicos simples. Os taninos têm sido utilizados, ao longo do tempo, em diversas indústrias, como é o caso da indústria dos curtumes, para transformar a pele do animal em couro, a indústria cervejeira, ajudando na estabilização da cerveja, reduzindo a concentração proteica da mesma, e ainda na produção de resinas. ^[17-19]

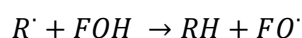
Para além disso, a actividade biológica destas famílias químicas é bem conhecida, sendo que a capacidade antioxidante de alguns componentes da cortiça parece atraente e de interesse para a indústria alimentar, cosmética, e farmacêutica. Estes mostram potencial em aplicações anticancerígenas, antimutagénicas, antialérgicas e antienvhecimento. ^[17] A vantagem dos antioxidantes provenientes de produtos naturais é o facto de serem menos dispendiosos do que as variantes sintéticas. ^[4]

1.1.2.1. Potencial Antioxidante

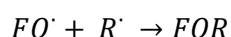
Os antioxidantes são definidos como compostos que podem retardar, inibir ou evitar a oxidação de materiais oxidáveis por eliminação de radicais livres e/ou diminuição do stress oxidativo. ^[18] O stress oxidativo é um estado de desequilíbrio em que quantidades excessivas de espécies reactivas ou radicais livres (RS) como por exemplo, ião superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidroxilo, superam a capacidade antioxidante endógena, levando a oxidação de uma variedade de biomoléculas, tais como, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. ^[16,17] O stress oxidativo pode potenciar o desenvolvimento de doenças degenerativas crónicas, incluindo doença cardíaca coronária, o cancro e o envelhecimento. ^[18]

Os compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes que podem ser mediadas por diferentes mecanismos, tais como, a eliminação de espécies radicalares (RS) como os RSO e RSN. ^[13,17,18] Este mecanismo ocorre porque estes compostos possuem uma estrutura química ideal para a eliminação de radicais livres, uma vez que eles têm grupos hidroxilo que são propensos a doar um átomo de hidrogénio ou um electrão a um radical livre, e um anel aromático com capacidade de deslocalizar e estabilizar por ressonância um electrão não emparelhado. ^[20-23]

Os compostos fenólicos (FOH) podem agir como aceitadores de radicais livres. Eles interferem com a oxidação de lípidos e outras moléculas por doação rápida de um átomo de hidrogénio para os radicais (R^\cdot).^[13,18,16]



Os intermediários de radicais fenóxi (FO) são relativamente estáveis devido à ressonância e, portanto, uma nova cadeia de reacção não é facilmente iniciada. Além disso, os intermediários de radicais fenóxi também actuam como terminadores de percurso de propagação reagindo com outros radicais livres.^[13,18,16]



Teoricamente, estas duas acções antioxidantes podem causar uma redução das concentrações de RS e espécies oxidantes. Como resultado, a subsequente oxidação de moléculas-alvo, tais como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos é diminuída.^[20-23]

1.1.2.2. Potencial Anticancerígeno

Os compostos fenólicos podem também ser úteis na prevenção e/ou tratamento de doenças tais como o cancro, não só devido às suas potentes propriedades antioxidantes,^[18] mas também aos seus efeitos na prevenção de várias doenças associadas ao stress oxidativo (como doenças cardiovasculares e neuro degenerativas).^[24-27] Outro aspecto importante é o facto destes compostos serem capazes de regular uma vasta gama de enzimas e receptores celulares.^[13,20]

O cancro é caracterizado por um crescimento indesejado e descontrolado de células que diferem estruturalmente e funcionalmente a partir de células normais, originando um tumor.^[28] Forma-se um tumor quando o controlo genético é danificado ou perdido em uma ou mais células, que em seguida, continuam a dividir-se produzindo mais células anormais. Estas células, que continuam em divisão podem causar danos a outras células e tecidos do corpo, uma vez que já não são controladas por genes normais.^[28,29]

Ao contrário de uma infecção, em que o organismo é atacado por invasores externos e que origina de imediato uma resposta do sistema imunitário, um tumor é causado por células anormais que se desenvolveram a partir de células saudáveis do

próprio organismo, e como tal as defesas naturais não actuam permitindo a divisão e proliferação das mesmas. ^[28] No entanto, à medida que estas células se vão dividindo, é possível visualizar determinadas características que as diferenciam das células saudáveis, por exemplo, o núcleo das células cancerígenas é maior e mais escuro comparativamente às das células saudáveis. Para além disso as células cancerígenas apresentam uma forma e um tamanho irregular, o que permite uma fácil identificação ao microscópio. ^[28,29]

Actualmente admite-se que todas as causas de cancro provêm de danos e alterações ao código genético das células, especificamente causando mutações em protooncogenes e genes supressores de tumores. As mutações nesses genes podem ser ligadas directamente a agentes que causam cancro designados carcinogénicos, como por exemplo, vírus, radiação ultravioleta e químicos carcinogénicos como o fumo do tabaco, mas há ainda muitos agentes carcinogénicos desconhecidos. ^[28,29]

A influência de espécies reactivas sobre o estado redox intracelular pode desempenhar um papel central na regulação da progressão nas fases do ciclo celular. A acumulação de RSO e o seu efeito sobre as biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causa efeitos graves e nocivos sobre as estruturas celulares vitais, tais como membranas, canais iónicos, enzimas e material genético. ^[18] Neste contexto, parece evidente que alterações significativas no estado redox podem levar à desregulação das moléculas e compostos que coordenam a proliferação celular e a morte celular, o que é particularmente crítico em doenças proliferativas como o cancro. ^[13,18,20]

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 8,2 milhões de pessoas morrem todos os anos devido ao cancro, e estima-se que nas próximas 2 décadas o número de pessoas afectadas por esta doença aumente 70%. Existem mais de 100 tipos de cancro, os quais requerem diagnóstico e tratamentos diferentes, sendo que neste momento os principais tipos de tratamento são a cirurgia, quando possível, a quimioterapia e a radioterapia, sendo que estes dois tipos de tratamento não são selectivos para o tipo de células, ou seja também provocam danos nas células saudáveis do organismo. Como tal é necessário a procura e descoberta de outros tipos de tratamento mais eficazes e menos prejudiciais à saúde dos pacientes. As terapias actuais têm vindo a assentar em terapias moleculares dirigidas que bloqueiam o crescimento e proliferação do cancro interferindo com algumas moléculas alvo que estão envolvidas no crescimento, progressão e disseminação do tumor. ^[30]

Os compostos fenólicos têm sido referidos como capazes de exercer efeitos anticancerígenos por meio de uma variedade de mecanismos (Figura 1.8), tais como a remoção de agentes carcinogénicos, a modulação de sinalização de células de cancro e actividades enzimáticas antioxidantes, e a indução de apoptose e consequente interrupção do ciclo celular. [12,13]

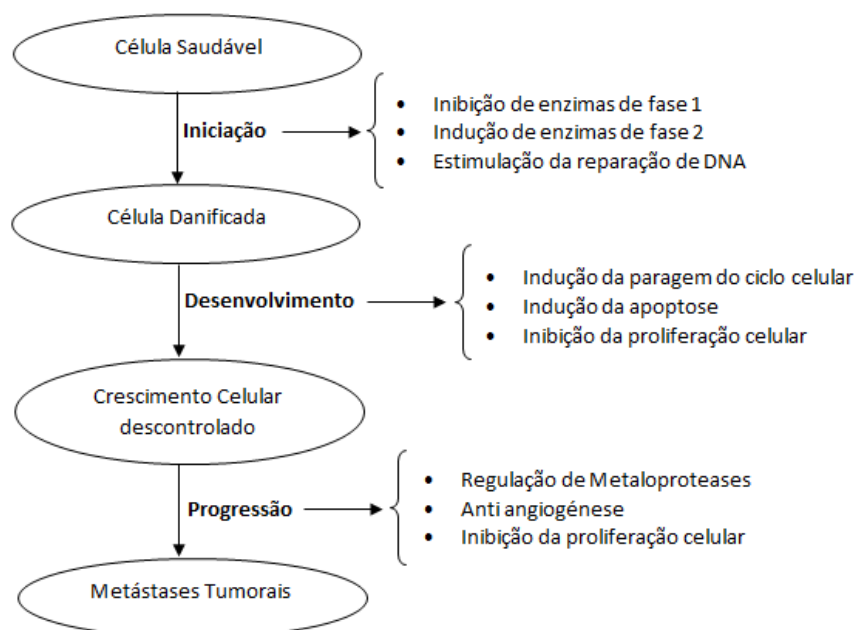


Figura 1.8 – Potenciais mecanismos anticancerígenos de compostos fenólicos de plantas durante o desenvolvimento do cancro, as fases 1 e 2 representam as fases do ciclo celular. [18]

O ácido Elágico (Figura 1.9), um composto fenólico amplamente encontrado em frutas, vegetais e na cortiça, exerce efeitos anti angiogénese no cancro da mama e inibe significativamente o crescimento de células do cancro da mama. Quando isolado a partir de extractos de morango apresenta actividade anti proliferativa em células cancerígenas da cavidade bucal, do colo do útero, do cólon, da próstata, e actividade anti proliferativo contra as células de cancro da mama. [24,27]

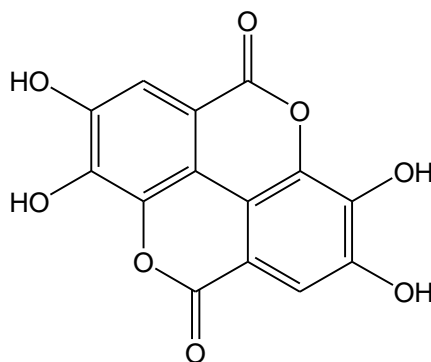


Figura 1.9 – Estrutura molecular do ácido Elágico

O cancro da mama é o tipo mais comum de cancro entre as mulheres nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, e é a principal causa de morte por cancro em mulheres. Em Portugal, anualmente são detectados cerca de 6000 novos casos de cancro da mama, e 1500 mulheres morrem com esta doença. ^[31]

Estudos realizados mostram que cerca de 10% do cancro da mama resultam da transmissão de um gene mutado de um progenitor, os restantes 90% são provavelmente o resultado de uma mutação genética. ^[31]

O cancro da mama é distinguido pelo facto do seu crescimento ser dependente de estrogénios em quase todos os casos, e como tal esta área despertou grande interesse e importância na investigação da doença e tem sido objecto de uma extensa pesquisa ao longo de muitos anos. ^[32,33,34]

O Michigan Cancer Foundation foi um dos responsáveis pelos avanços na luta contra o cancro, quando em 1970 se conseguiu isolar uma linha celular de cancro da mama humano (MCF-7), e que se tornou numa das mais estudadas no mundo. ^[32] Os resultados desta linha celular tiveram um impacto fundamental sobre a investigação do cancro da mama, sendo que uma das mais importantes contribuições da linha celular MCF-7 para a investigação tem sido a sua utilidade para o estudo do receptor de estrogénio (ER) alfa, uma vez que esta linha celular é uma das poucas capaz de expressar níveis substanciais de ER e assim mimetizar a maioria dos cancros da mama humanos que expressam ER. ^[32,33,34]

A linha celular de MCF-7 (Figura 1.10) mantém várias características do epitélio mamário, incluindo a capacidade para processar estradiol através de receptores de estrogénio citoplasmáticos. ^[33] Antes da MCF-7, não era possível aos investigadores

obter uma linha de células do cancro de mama humano capaz de manter a viabilidade mais do que alguns meses. [32,33,34]

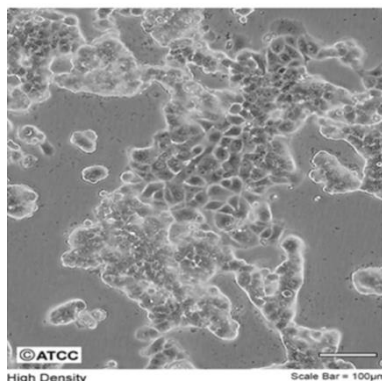


Figura 1.10 – Linha celular MCF-7 do cancro da mama. [35]

As células de MCF-7, como referido anteriormente, podem ser utilizadas no estudo do efeito de determinadas moléculas em células cancerígenas, e assim averiguar o potencial desses compostos na luta contra o cancro. Extractos fenólicos e polifenóis isolados de diferentes alimentos vegetais têm sido estudados numa série de linhas celulares de cancro. Por exemplo, extractos de bagas preparados a partir de diversos frutos silvestres (amora, framboesa, mirtilo, etc.) e os polifenóis isolados de morango, incluindo as antocianinas, campferol, quercetina, ésteres de ácido cumárico e ácido Elágico, têm mostrado capacidade para inibir o crescimento celular do cancro da mama em linhas celulares de MCF-7. [18]

1.1.3. Processo Industrial do Processamento da Cortiça

Tal como referido anteriormente foram identificados na cortiça alguns compostos de baixo peso molecular que apresentam potenciais antioxidantes e anticancerígenos. [18]

Os métodos convencionais de extracção dos compostos fenólicos a partir de plantas, como a maceração e a extracção com soxhlet, mostram uma baixa eficiência e um aumento da poluição ambiental devido ao grande volume de solvente orgânico utilizado, bem como ao elevado tempo de extracção exigido nesses métodos. [4] Como tal, no presente trabalho, utilizou-se uma tecnologia de separação por membranas para a recuperação deste tipo de compostos a partir do efluente produzido nas indústrias de processamento da cortiça. Este processo já foi utilizado em trabalhos anteriores, para a redução da carga orgânica e para o estudo da biodegradabilidade do efluente. [36]

1.1.3.1. Efluente da Cortiça

As pranchas de Cortiça, após terem sido removidas da árvore, são empilhadas ao ar livre onde permanecem durante 6 meses, numa etapa que é considerada a maturação da matéria-prima. De seguida as pranchas são cozidas em tanques de cozedura (Figura 1.11), com o objectivo de expandir, esterilizar e remover os sólidos orgânicos alojados nos poros das pranchas e permitir que a cortiça atinja o teor de humidade correto para ser processada. [3]



Figura 1.11 – Tanque de cozedura das pranchas de Cortiça. [2]

Cada lote de cortiça (600-2000 kg) é cozido durante cerca de uma hora num tanque de cozedura. Este processo provoca a expansão do ar no interior das células da cortiça, melhora a estrutura interna e contribui para a redução da microflora. Após o processo, as pranchas aumentam cerca de 20% o seu volume, ficando mais espessas, mais regulares e fáceis de manusear. Depois são colocadas a repousar numa área

estéril e com boa ventilação para retirar o excesso de humidade, e ao fim de dois dias estão prontas para serem processadas. [2,3]

A água de cozedura apresenta uma elevada carga orgânica e uma elevada concentração de compostos fenólicos e açúcares, e como tal deve ser tratada antes de proceder à sua descarga, uma vez que não cumpre os limites legalmente estabelecidos para a descarga de efluentes. [36-38]

O efluente da cortiça caracteriza-se por ter um pH moderadamente ácido (cerca de 5), uma elevada carga orgânica (Carbono Orgânico Total entre os 1220 e 2000 mg C/L) e um elevado conteúdo em compostos fenólicos (0,6 – 0,9 g/L). Alguns compostos fenólicos identificados foram os ácidos Gálico, Protocatecuico, Vanílico, Siringico, Ferúlico e Elágico. O efluente da cortiça apresenta baixa biodegradabilidade e elevada toxicidade, o que dificulta o seu tratamento. [36-38]

Vários processos têm sido utilizados para reduzir a carga orgânica presente no efluente, de forma a proceder à sua descarga. De entre eles destacam-se os processos de tratamento biológico, fundamentalmente utilizando lamas activadas, que apesar de ser altamente eficiente na degradação de matéria orgânica, revelou a necessidade de ser acoplado com uma técnica de ozonização para melhorar a eficiência, o que apresenta elevados custos de aplicação. [36-38]

Outra alternativa é o tratamento químico, utilizando para tal agentes oxidantes como o ozono, o peróxido de hidrogénio ou o oxigénio. Apesar destes processos serem amplamente utilizados, a utilização de um oxidante simples como o ozono, nem sempre conseguem destruir todos os compostos orgânicos. Como tal, são usados frequentemente processos de oxidação avançados, que consistem na utilização de mais do que um agente oxidante, por exemplo, a acoplação de radiação UV ao tratamento referido acima com ozono, o que torna o processo dispendioso. [36-38]

Como alternativa, os processos físicos têm sido cada vez mais utilizados e optimizados para o tratamento deste tipo de efluentes, nomeadamente a tecnologia de membranas, que para além de reduzir custos, tem a vantagem de permitir recuperar os compostos que se encontram no efluente. Sendo assim além do tratamento do efluente para a descarga, permite recuperar compostos de elevado valor acrescentado como os referidos anteriormente e cujas aplicações já foram mencionadas. [36-38]

1.2. Processos de Filtração com Membranas

1.2.1. Classificação

Os processos de membrana, cuja força motriz é um gradiente de pressão, tais como a osmose inversa, a nanofiltração, a ultrafiltração e a microfiltração podem ser usados para a minimização de poluentes em correntes líquidas. Estes processos fazem uso de uma barreira de membrana semi-permeável, que funciona como uma barreira fina e que pode ser produzida a partir de diferentes tipos de materiais. ^[36-38]

Estes sistemas de separação baseados em membranas limitam o transporte de várias espécies de um modo específico, permitindo separar a corrente de alimentação em duas novas correntes (Figura 1.12). ^[36-38]

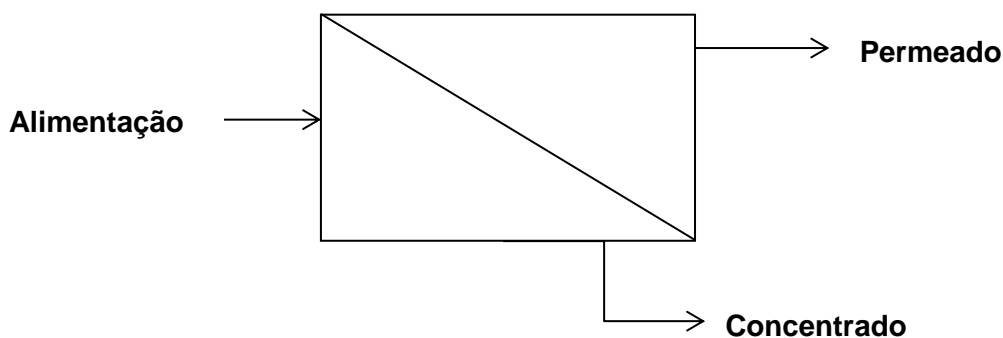


Figura 1.12 – Esquema de um Processo de Filtração de Membrana.

A corrente que consegue atravessar a membrana é denominada de permeado, enquanto que a outra corrente, que possui os componentes que não foram capazes de atravessar a membrana, é chamada de concentrado ou retentado. Na grande parte dos processos de membrana, uma diferença de pressão entre a alimentação e a corrente de permeado constitui a força motriz para a separação. ^[39-47]

As membranas podem ser feitas de diferentes tipos de material, dividindo-se em três grandes grupos, os materiais inorgânicos, como é o caso do vidro poroso e a grafite, os materiais sintéticos, como a poliamida e o polipropileno, e por último os materiais sintéticos derivados de materiais naturais, em que o mais utilizado é o acetato de celulose. O acetato de celulose pode ser obtido a partir de uma reacção de acetilação da celulose, e é considerado um dos mais importantes ésteres orgânicos derivados da celulose. É amplamente usado na indústria têxtil e na produção de membranas para processos de separação devido ao seu baixo custo. ^[36-40]

As membranas podem também dividir-se em termos de estrutura, membranas Simétricas e Assimétricas (Figura 1.13). Por sua vez, as membranas Assimétricas podem ser Integrais, se a camada activa e a camada suporte forem constituídas pelo mesmo material, ou Compostas, se as duas camadas forem formadas por materiais diferentes. [44-47]

As membranas Assimétricas são as mais utilizadas nos processos de separação, uma vez que estas apresentam elevada capacidade de permeação, elevados coeficientes de rejeição (capacidade para reter solutos) e uma elevada resistência mecânica. Para além disso, é mais fácil de evitar o fenómeno de Colmatação, comparativamente com as membranas Simétricas. [41-43]

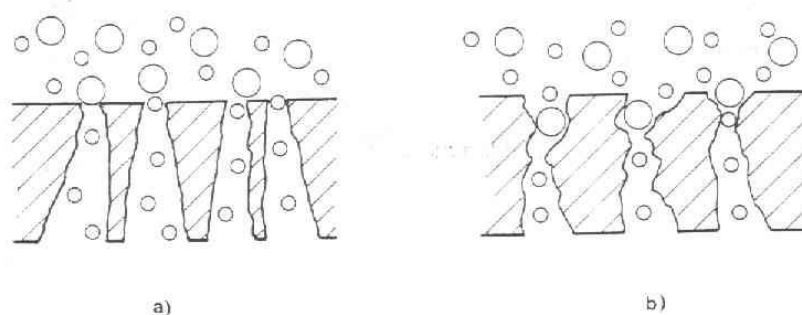


Figura 1.13 – Esquema de uma Membrana Assimétrica (a) e Simétrica (b).

A polarização de concentração (PC - Figura 1.14) é provavelmente o problema mais frequentemente encontrado nos processos de separação por membrana. A PC leva à formação de uma barreira adicional à transferência de massa na superfície da membrana, devido à rejeição de alguns solutos. O efeito deste bloqueio é reduzir o fluxo através da membrana e assim, diminuir a selectividade global da membrana. [39,40]

Há várias estratégias que podem ser empregues para minimizar os efeitos da polarização de concentração. A primeira é a redução da concentração de solutos na alimentação. Outra possibilidade envolve a manutenção das velocidades no lado da alimentação tão elevadas quanto possível, uma vez que quanto maior a velocidade, maior a turbulência e conseqüentemente maior será a tendência para ressuspender os solutos acumulados na superfície da membrana. A colmatação é um outro dos problemas que deve ser minimizado e que consiste no “entupimento” dos poros das membranas. Uma estratégia para a eliminar a colmatação consiste no uso de um ciclo de limpeza, recorrendo a enzimas ou a lavagens com ácidos e bases. Ou então, pode se optar pela utilização de um fluxo reverso, ou seja um aumento da pressão a partir

do lado do permeado da membrana para o lado da alimentação, e assim desimpedir os poros da membrana. ^[39,40]

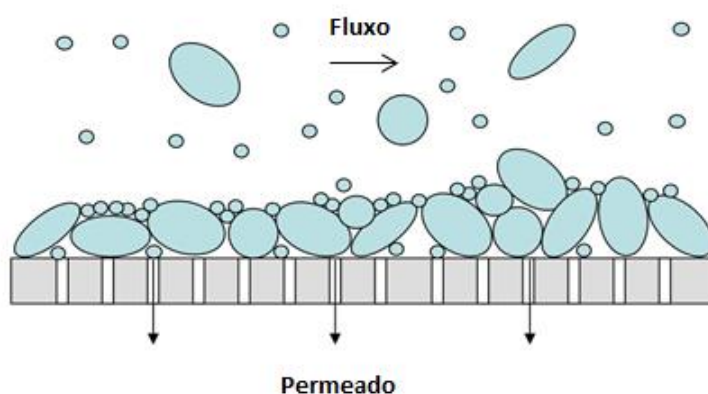


Figura 1.14 – Processo de polarização da concentração à superfície de uma membrana.

Como foi referido anteriormente, existem diferentes processos de separação por membrana, e a sua escolha prende-se com o tamanho da molécula a separar e com o tipo de tratamento que se pretende efectuar, como representa a Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Classificação de Processos de Filtração com Membranas. ^[36]

Processo de Separação	Tipo de Membrana	Força Motriz	Método de Separação	Aplicações
Microfiltração (MF)	Microporosa	0,1 – 1 bar	Filtração	Esterilização, Clarificação
Ultrafiltração (UF)	Assimétrica Microporosa	0,5 – 5 bar	Filtração	Separação de macromoléculas em solução
Nanofiltração (NF)	Assimétrica Filme Denso	10 – 40 bar	Filtração/Solução/Difusão	Separação parcial de sais e solutos orgânicos com menos de 1000 Da
Osmose Inversa (OI)	Assimétrica Filme Denso	20 – 100 bar	Solução/Difusão	Separação de sais e microsolutos

Para o presente trabalho, utilizaram-se duas membranas de Ultrafiltração, uma vez que permitem a remoção de sólidos suspensos e solutos com peso molecular superior a 1000 Da. O método utilizado para a preparação das membranas foi o método da Inversão de Fases, que consiste na indução da separação de fases de uma solução constituída por um polímero, um solvente e um não solvente, previamente homogénea, quer por alteração da temperatura, quer por evaporação seguida de imersão da solução num banho de água (processo por via húmida) ou expondo-a a uma atmosfera não-solvente (processo por via seca). ^[36,42]

Normalmente, a solução de polímero é imersa num banho de coagulação e de uma permuta do solvente com a água resulta a separação de fases. A fase rica em polímero forma a camada activa (menos porosa), enquanto a fase pobre em polímero dá origem aos poros (camada suporte), dando origem a uma morfologia assimétrica. Este método permite a obtenção de membranas com permeabilidades e tamanho de poros diferentes através da variação da concentração de formamida (não solvente, promotor de poros) e de acetona, na solução polimérica de acetato de celulose (polímero). A acetona é o solvente volátil e normalmente é deixado evaporar antes de mergulhar a membrana no banho de coagulação, permitindo assim o enriquecimento do polímero à superfície, que irá dar origem à camada activa da membrana. ^[36,42]

1.2.2. Diafiltração

Quando é desejado um elevado grau de separação de solutos, o fluxo pode cair para um valor muito baixo, sendo comum empregar o processo de diafiltração (Figura 1.15). A diafiltração envolve a adição de um solvente (geralmente água) à corrente de retentado. A corrente final de retentado é geralmente pouco concentrada em solutos, devido às várias adições de solvente realizadas ao longo do processo de separação, no entanto contém apenas os solutos com incapacidade de atravessar os poros da membrana. ^[48,49]

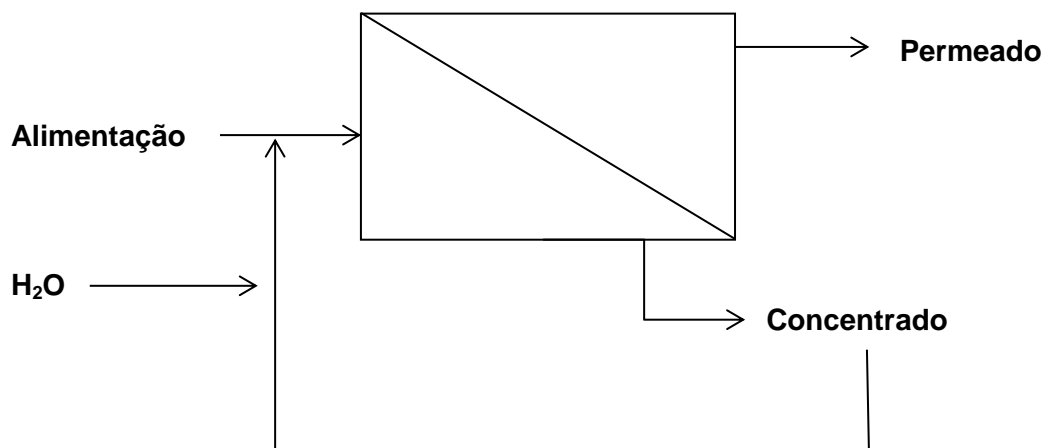


Figura 1.15 – Esquema de um Processo de Diafiltração.

1.2.3. Caracterização das Membranas

Existem parâmetros descritivos da estrutura e da eficiência da membrana, que devem ser determinados, de forma a caracterizar as mesmas. Um deles é a Permeabilidade Hidráulica (L_p), que consiste na capacidade de permeação de uma membrana à água pura, representando a quantidade de água permeada por unidade de tempo, área superficial e pressão transmembranar. Este parâmetro é determinado experimentalmente representando graficamente o fluxo volumétrico de permeado (J_p) em função da pressão transmembranar aplicada (ΔP) de acordo com a expressão (1). [36-38]

$$J_p = L_p \times \Delta P \quad (1)$$

Uma vez que ao longo do processo de separação a temperatura pode não ser constante, é necessário corrigir o fluxo para uma temperatura de 25 °C, utilizando para tal a expressão (2), onde a variação da viscosidade é tida em conta e em que o T_{ensaio} corresponde à temperatura.

$$J_p(25 \text{ } ^\circ\text{C}) = \frac{J_p(\text{ensaio})}{0,901} e^{\left(-6,96 + \frac{2044}{273,15 + T_{\text{ensaio}}}\right)} \quad (2)$$

Desta forma, determina-se o declive da representação linear (Figura 1.16), sendo este valor a permeabilidade hidráulica da membrana L_p .

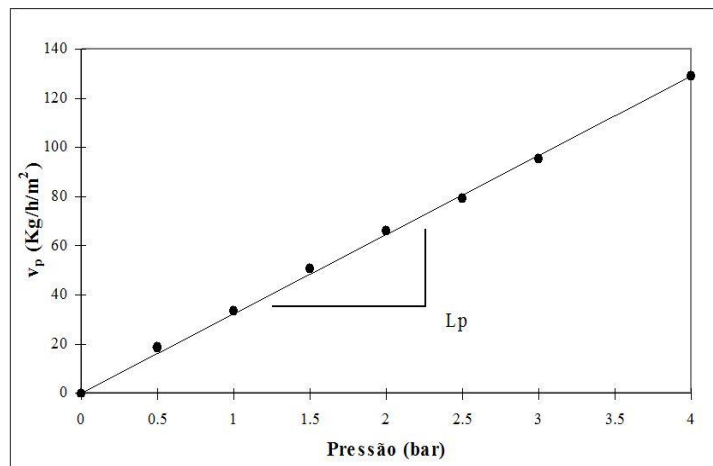


Figura 1.16 – Representação gráfica para a determinação da Permeabilidade Hidráulica.

Outro parâmetro importante para a caracterização da membrana, é a sua rejeição a sais e solutos orgânicos. A rejeição aparente (f) é medida em função da membrana, do soluto, da pressão e da hidrodinâmica do sistema. A sua determinação é efectuada a partir das concentrações do soluto na solução de alimentação e permeado, através da expressão (3), [36-38]

$$f = \frac{C_A - C_P}{C_A} \quad (3)$$

Onde,

- C_A – Concentração do soluto na alimentação;
- C_P – Concentração do soluto no permeado.

A capacidade que uma membrana apresenta de rejeitar preferencialmente um determinado soluto é designada por selectividade, e é uma das características mais importantes nas membranas. [36-38]

Por último, o limite de exclusão molecular é o parâmetro que está relacionado com o peso molecular de um soluto de referência cuja rejeição é cerca de 90 %. É vulgarmente denominado por *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO), e é determinado pela representação gráfica do $\log (f/(1-f))$ em função do peso molecular de diversos solutos de referência (Figura 1.17). O MWCO é então determinado por intersecção da recta obtida com a recta $y=1$. [36-38]

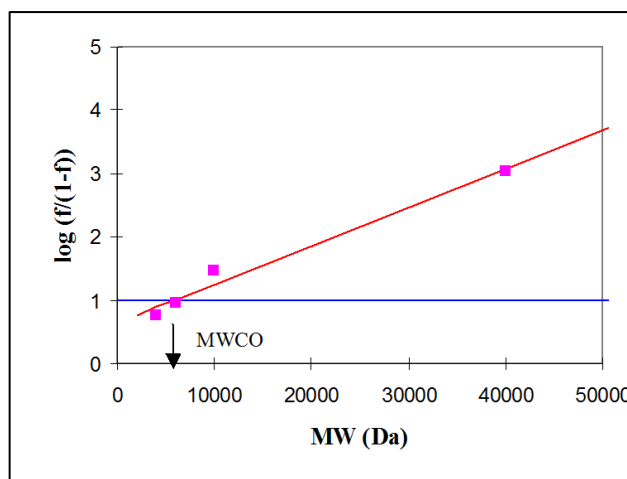


Figura 1.17 – Representação gráfica para a determinação do MWCO.

A caracterização das membranas é um passo fundamental neste processo de separação, porque permite determinar parâmetros importantes, anteriormente descritos, e avaliar o tipo de membrana utilizada. A rejeição aos sais permite fazer esta diferenciação, sendo que para o caso deste trabalho, esta rejeição deva apresentar valores próximos de zero uma vez que se utilizou membranas de ultrafiltração. A rejeição aos solutos orgânicos permite diferenciar duas membranas de ultrafiltração uma da outra através do diâmetro do poro. Neste caso pretende-se duas membranas com tamanhos médios de poros bem distintos, de forma a garantir um bom fraccionamento do efluente, uma diminuição significativa da carga orgânica do mesmo, e a recolha de três fracções completamente diferentes umas das outras.

1.3. Objectivos do trabalho

Este trabalho tem como objectivo o fraccionamento e purificação de compostos fenólicos presentes em diferentes fracções do efluente da cortiça, através do uso de membranas de acetato de celulose de Ultrafiltração preparadas no laboratório.

A recolha das fracções pela tecnologia de membranas tem como finalidade a identificação de compostos recuperados nas fracções e avaliação do seu potencial anticancerígeno e antioxidante.

Assim, foi traçado o seguinte plano de trabalhos:

- Preparação de membranas de acetato de celulose de Ultrafiltração através do método de inversão de fases.
- Caracterização das membranas em termos de Permeabilidade Hidráulica, Rejeição a Sais e Limite de Exclusão Molecular.
- Ensaio de permeação em modo de Diafiltração.
- Caracterização do efluente da Cortiça e das fracções recuperadas (TOC, Cor, Teor em Polifenóis e Taninos).
- Identificação dos compostos recuperados nas fracções do efluente da Cortiça por LC-MS.
- Caracterização da actividade antioxidante das fracções recuperadas do efluente da cortiça.
- Avaliação do potencial citotóxico das fracções recuperadas em MCF-7.
- Estudo preliminar do efeito das fracções na expressão de proteínas das células.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram fornecidos pela Merck, Sigma, Panreac, Flucka e Riedel de Haën. Os eluentes usados na cromatografia líquida de alta resolução (HPLC-DAD) foram adquiridos à VWR Chemicals. Relativamente aos padrões, estes foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. O meio de cultura utilizado no crescimento celular foi adquirido à Lonza. Um único lote de efluente da cortiça foi cedido pela empresa Elcor.

2.2. Preparação das Membranas

Para a realização do trabalho proposto foi necessário a preparação de duas membranas de acetato de celulose, com limites de exclusão molecular diferentes. Utilizou-se o método de inversão de fases e como tal começou-se por preparar as soluções poliméricas a utilizar, com os reagentes na proporção indicada na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Reagentes utilizados na preparação das Membranas.

Reagente	CA ₁ (%p/p)	CA ₄ (%p/p)
Acetato de Celulose	17	17
Formamida	22	35
Acetona	61	48

Inicialmente foi adicionado o acetato de celulose, seguido da formamida e por último a acetona. O frasco foi fechado e a tampa vedada com parafilme para evitar a evaporação da acetona. Por fim o frasco foi agitado durante 24 horas, ao fim desse tempo obteve-se um fluido homogéneo e viscoso.

O passo seguinte consistiu na preparação das membranas, utilizou-se para tal uma faca metálica com uma ranhura calibrada (0,25 mm) e um vidro rectangular. Encheu-se a faca com a solução polimérica obtida e fez-se deslizar perpendicularmente, a uma velocidade constante, a faca sobre o vidro. Evaporou-se o filme polimérico durante 30 segundos, e de seguida mergulhou-se o vidro num banho de água desionizada entre 0 a 3 °C. Após alguns minutos, removeu-se o filme do vidro e procedeu-se à identificação da face activa da membrana. As membranas preparadas foram preservadas em água desionizada até a utilização.

Após inspecção das membranas preparadas, seleccionaram-se as duas melhores e foram cortadas à dimensão da placa porta membranas do módulo de

ultrafiltração (Tech Sep.). De seguida instalaram-se as duas membranas na placa, com a camada activa virada para o exterior.

A instalação de ultrafiltração é constituída por um tanque de alimentação, uma bomba (com regulador de caudal), uma válvula (para regular a pressão de funcionamento), dois manómetros, antes e depois da placa porta membranas (duas membranas de área útil 147,8 cm²), e um rotâmetro. A instalação de ultrafiltração encontra-se representada na Figura 2.1.

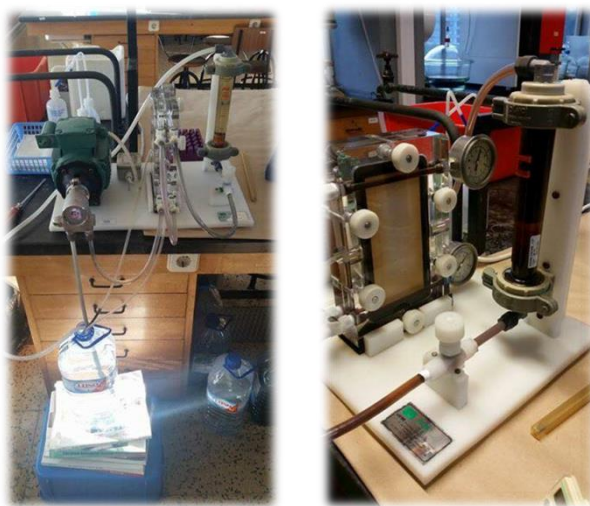


Figura 2.1 – Instalação de Ultrafiltração, modelo Ray-Flow, Tech Sep.

2.3. Caracterização das Membranas

De forma a avaliar o desempenho das membranas no processamento do efluente da cortiça foram realizados ensaios experimentais no sentido de conhecer a permeabilidade da membrana à água pura – permeabilidade hidráulica – e a sua rejeição aos sais e solutos orgânicos o que permitiu determinar o limite de exclusão molecular das membranas.

As membranas depois de colocadas na instalação foram compactadas antes de se proceder à sua caracterização. A etapa de compactação consiste em fazer circular água desionizada em recirculação total (onde o concentrado e o permeado são ambos reciclados ao tanque de alimentação) durante 2 horas, a uma pressão de 3 bar e com um caudal de alimentação de 180 L/h.

Após 2 horas de compactação as membranas foram caracterizadas em termos de Permeabilidade Hidráulica (L_p), Rejeição a sais mono e bivalentes e Rejeição a solutos orgânicos.

Para a determinação da Permeabilidade Hidráulica foram realizados ensaios a pressões de trabalho diferentes (1; 1,5; 2; 2,5 e 3 bar). Nestes ensaios, recolheu-se um volume de permeado para um recipiente previamente tarado. Registou-se o peso numa balança analítica (Sartorius), a temperatura e o tempo de recolha. O caudal de alimentação utilizado nestes ensaios foi de 180 L/h.

Para a determinação da rejeição aos sais, prepararam-se duas soluções-mãe de 3 L de NaCl e Na₂SO₄ à concentração de 600 ppm e registou-se a sua condutividade. Foram realizados ensaios à pressão de 1 bar e ao caudal de 180 L/h. Recolheu-se o permeado durante cerca de 3 minutos para um recipiente, e registou-se o peso, a temperatura, o tempo de recolha e a condutividade do permeado. Entre cada ensaio as membranas foram lavadas com 10 L de água desionizada (5 L rejeitados e 5 L em recirculação total durante 10 minutos).

Para a determinação da rejeição aos solutos orgânicos, prepararam-se várias soluções de Polietilenoglicol e Dextran com massas moleculares compreendidas entre 3000 e 100 000 g/mol numa concentração de 600 ppm. Realizou-se de forma idêntica ao procedimento da determinação da rejeição aos sais, contudo neste caso, registou-se o Carbono Orgânico Total (COT, OI Analytical) em vez da condutividade. Entre cada ensaio as membranas foram lavadas com 10 L de água desionizada (5 L rejeitados e 5 L em recirculação total durante 10 minutos).

2.4. Permeação do Efluente da cortiça – Recuperação das fracções pequena, média e grande

A fracção denominada de fracção Pequena foi obtida utilizando a membrana CA₁, a qual foi alimentada com 5 L de Efluente da cortiça (Figura 2.2) e que operou a um caudal de 180 L/h e a uma pressão de 2 bar até se recolher o volume de permeado pretendido (300 mL). A fracção Pequena foi recolhida e liofilizada. A massa seca desta fracção foi reservada a -20 °C até posterior utilização.

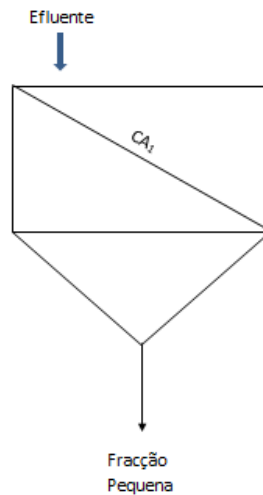


Figura 2.2 – Esquema de recolha da fracção Pequena do Efluente da Cortiça

As restantes fracções, Média e Grande, foram recolhidas utilizando um processo de Diafiltração a um caudal de 180 L/h e pressão de 2 bar. Neste processo a cada 50 mL de permeado recolhido foi adicionado 50 mL de água desionizada à alimentação constituída pelo Efluente da cortiça, de forma a garantir que o volume de alimentação se mantinha constante (2 L).

A fracção denominada de fracção Grande foi recolhida utilizando-se a membrana CA_4 , foram recolhidas várias amostras de 50 mL de permeado e estas foram analisadas, em termos de COT, e reunidas para posteriormente serem utilizadas como alimentação na obtenção da fracção Média. Registou-se também o tempo total da operação, o tempo de cada recolha e o COT da alimentação. Quando os valores de COT do permeado estabilizaram, a operação foi dada por terminada. A fracção Grande, que consiste no Concentrado desta operação foi recolhida e liofilizada. A massa seca desta fracção foi reservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior utilização.

Para a fracção Média procedeu-se da mesma forma e utilizou-se, novamente, a membrana CA_1 , a qual foi alimentada com o permeado recolhido da Diafiltração anterior (Figura 2.3). Quando os valores de COT estabilizaram, desligou-se a instalação. A fracção Média foi recolhida e liofilizada. A massa seca desta fracção foi reservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior utilização.

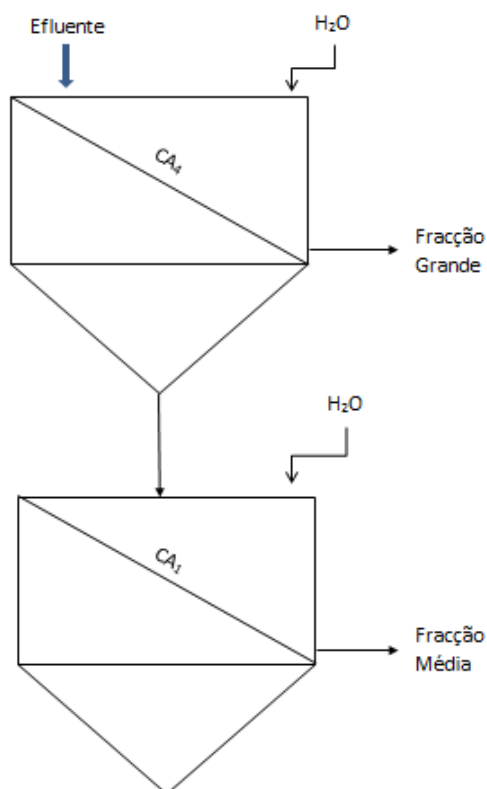


Figura 2.3 – Esquema de recolha das fracções Média e Grande do Efluente.

2.5. Caracterização do Efluente da cortiça e das fracções

2.5.1. Quantificação de Fenóis Totais (FT)

O teor em Fenóis totais foi quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu (F-C) de acordo com o procedimento descrito na literatura.^[36] Começou-se por adicionar 100 μL da amostra a quantificar (1 mg/mL) a 200 μL de reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 800 μL de Na_2CO_3 (700 mM). A mistura foi incubada sobre agitação durante 2 horas ao abrigo da luz e registou-se a absorvência a 765 nm do complexo azul formado por transferência de electrões em meio alcalino a partir de compostos fenólicos.^[14] O teor em FT foi determinado com recurso a uma recta de calibração de ácido tânico de 0,01 a 0,1 mg/mL ($\text{Conc.} = 0,1303 \times \text{Abs}(765\text{nm}) - 0,0014$) (ver Anexo 6.2.1) em miligramas de equivalentes de ácido tânico por mg de amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.5.2. Quantificação de Fenóis não Taninos (FNT)

Como referido anteriormente, os taninos, dado a sua estrutura química tem tendência a formar complexos com substratos proteicos, como tal a partir da complexação dos taninos com a polivinilpolipirrolidona (PVPP) foi possível determinar a quantidade de fenóis não taninos presentes na amostra. ^[36] Assim, a 100 mg de PVPP foram adicionados 2 mL de uma solução da amostra a analisar numa concentração de 1 mg/mL. A mistura foi agitada e reservada a 4 °C durante 15 minutos. De seguida centrifugou-se a 12 000 g durante 10 minutos. Foi quantificado o teor de fenóis em triplicado, de acordo com o procedimento descrito em 2.5.1., no sobrenadante. A quantidade de taninos presentes nas amostras foi calculada a partir pela expressão seguinte em miligramas de equivalentes de ácido tânico por mg de amostra,

$$\text{Taninos} = FT - FNT$$

2.5.3. Quantificação de Glúcidos

O método utilizado para a quantificação de glúcidos totais foi o método da Antrona. ^[50] Preparou-se uma solução da amostra a analisar com uma concentração de 1 mg/mL e a 500 µL adicionou-se 2 mL de uma solução fresca de Antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) 0,2% (m/v) em ácido Sulfúrico 95%. A solução de Antrona foi preparada 30 minutos antes do ensaio. A mistura foi incubada a 100 °C durante 10 minutos e posteriormente arrefecida em banho de gelo durante o mesmo período de tempo. Registou-se a absorvência a 620 nm do produto azul formado por complexação da antrona com os açúcares simples obtidos da hidrólise ácida com o ácido sulfúrico. ^[50] Os glúcidos totais foram quantificados com recurso a uma recta de calibração de Glucose de 0,05 a 0,5 mg/mL ($Conc. = 0,2574 \times Abs(620\text{ nm}) - 0,0021$) (ver Anexo 6.2.1) em equivalentes de glucose por mg de amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.5.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Após a liofilização do efluente da cortiça e das fracções recolhidas pela metodologia descrita em 2.4, foram preparadas pastilhas em KBr com 1 mg das amostras a analisar e analisados por FTIR num espectrofotómetro DTGS-TEC. De modo a obter espectros com elevada razão S/N (sinal/ruído) foi utilizada uma resolução de 4 cm^{-1} e foram efectuados 400 varrimentos na gama espectral de $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$.

2.5.5. Cromatografia Líquida de elevada resolução (HPLC-DAD)

A análise por HPLC-DAD do efluente e das fracções recolhidas foi realizada num equipamento cromatográfico Elite LaChrom® VWR Hitachi Chromatograph equipado com um forno Column Oven L-2300 e um detector de fotodíodos Diode Array Detector L-2455 (VWR, EUA). Utilizou-se uma coluna de fase reversa LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 ($5\text{ }\mu\text{m}$). As fracções foram analisadas por HPLC-DAD injectando $25\text{ }\mu\text{L}$ (1 mg/mL) com um injector automático, e usando um gradiente composto por uma solução A (ácido trifluoroacético a 0,05%), e uma solução B (metanol) como se segue: 0 min, 80% A, 20% de B; 20 min 20% de A, 80% B; 25 min, 20% de A, 80% de B. O caudal foi de 1 mL/min e a detecção foi levada a cabo entre 200 e 500 nm com um detector de díodos. Os espectros dos padrões de ácido Quínico, Gálico e Elágico foram utilizados para confirmar a identidade dos compostos no efluente e nas fracções. Para estimar as concentrações destes compostos fenólicos foram efectuadas as curvas de calibração com as áreas dos picos dos padrões nas concentrações 0,002; 0,005; 0,01; 0,05 e $0,1\text{ mg/mL}$ para os ácidos Gálico e Elágico. No caso do Quínico, utilizaram-se as concentrações de 0,3; 0,5; 0,7 e 1 mg/mL (Anexo 6.2.3).^[51]

2.5.6. Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS)

A identificação dos compostos presentes no efluente da cortiça e nas fracções foi efectuado por LC-MS e LC-MS/MS num sistema Surveyor Plus Modular LC ligado a um espectrómetro de massa de Ion-Trap LCQ Duo equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) da Thermo Scientific (Bremen, Alemanha). Para o sistema de LC utilizou-se uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 ($5\text{ }\mu\text{m}$). As amostras foram analisadas por injeção de $25\text{ }\mu\text{L}$ a uma concentração de

10 mg/ml e utilizando um gradiente linear composto de solução A (ácido fórmico 1,0%), e a solução B (metanol) como se segue: 0 min, 70% A, 30 % de B; 20 min 20% de A, 80% B; 25 min, 20% de A, 80% de B. O espectrómetro de massa foi operado em modo negativo na gama 120-1000 m/z e os parâmetros foram ajustados de modo a otimizar o rácio sinal/ruído (S/N) para os iões de interesse e de acordo com o procedimento descrito na literatura. ^[51] O software Xcalibur™ da Thermo Scientific foi usado para adquirir e processar os dados.

2.5.7. Actividade Antioxidante

Para a determinação da actividade antioxidante do efluente da cortiça e das fracções foi utilizado o método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). O radical DPPH possui uma coloração roxa absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 517 nm. Por acção de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção a 517 nm, podendo a mesma ser monitorizada pelo decréscimo da absorvência. ^[51,52] A 1 mL da solução de DPPH (0,002% em metanol com 0,7 Unidades de Absorvência a 517 nm) foram adicionados volumes crescentes da amostra a analisar de modo a obter concentrações variáveis da amostra. A mistura foi incubada durante 30 minutos protegida da luz, à temperatura ambiente, e a absorvência a 517 nm foi registada contra o respectivo branco. Foi realizado um ensaio controlo nas mesmas condições mas onde foi utilizada água destilada no lugar da amostra. A percentagem de actividade antioxidante foi calculada de acordo com a seguinte expressão

$$AA (\%) = 100 \times (A_{DPPH} - A_{amostra}) / A_{DPPH}$$

AA é a actividade antioxidante, A_{DPPH} é a absorvência da solução controlo contra o respectivo branco e $A_{amostra}$ é a absorvência da amostra contra o respectivo branco. A concentração da amostra que demonstrar uma actividade antioxidante de 50 % é referida como o EC_{50} e foi obtida por representação da actividade antioxidante em função da concentração da amostra. O mesmo tipo de procedimento foi utilizado para as soluções dos compostos usados como padrões, ácido Quínico, Gálico e Elágico. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.5.8. Inibição da Peroxidação Lipídica (TBARS)

Para a determinação da inibição da peroxidação lipídica (PL) do efluente da cortiça e das fracções foi utilizado o método dos TBARS. [53] Os produtos da PL que podem ser medidos incluem dienos conjugados, hidroperóxidos de lípidos e aldeídos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), para formar substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A progressão da peroxidação lipídica pode ser monitorizada medindo a absorvência destes produtos de peroxidação. [53] Como tal, a 1 mL da amostra a analisar foi adicionado uma solução de 1 g de salmão homogeneizado em 10 mL de PBS 1x (Tampão fosfato salino). A esta mistura adicionou-se 1 mL de uma solução de FeSO₄ 15 mM e 2 mL de uma solução de H₂O₂ 1 mM. Foram realizados dois ensaios controlo nas mesmas condições mas onde a um deles se adicionou 0,5 mL de PBS e 0,5 mL de H₂O (controlo 100% oxidação), bem como os agentes oxidantes, e ao outro 4 mL de PBS (controlo sem oxidação). A mistura foi incubada a 37 °C durante 1 hora. A 500 µL dessa mistura foram adicionados 250 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 1% (em NaOH 0,05 M) e 250 µL de uma solução de ácido tricloroacético 2,8%. A mistura foi incubada em água a ferver durante 10 minutos e posteriormente arrefecida em banho de gelo. Foi adicionado 2 mL de 1-Butanol o que provocou a formação de duas fases na mistura. Registou-se a absorvência a 535 nm da fase superior. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica foi calculada de acordo com a seguinte expressão

$$\text{Inibição (\%)} = 100 \times (A_{100\% \text{ oxidação}} - A_{\text{amostra}}) / A_{100\% \text{ oxidação}}$$

$A_{100\% \text{ oxidação}}$ é a absorvência da solução controlo 100% oxidação contra o respectivo branco (controlo sem oxidação) e A_{amostra} é a absorvência da amostra contra o respectivo branco (controlo sem oxidação). A concentração da amostra que demonstrar uma inibição de 50 % é referida como o EC₅₀ e foi obtida por representação da inibição em função da concentração da amostra. O mesmo tipo de procedimento foi utilizado para as soluções dos compostos usados como padrões, ácido Quínico, Gálico e Elágico. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.6. Ensaios em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7

O meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) foi utilizado na cultura celular, suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomomicina e a adição de 2 mM L-glutamina, numa estufa a uma temperatura 37°C com 5% de CO₂. As células foram cultivadas em frascos T75 (de 75

cm²) e o meio substituído a cada 48h-72h. As células são tripsinizadas quando a confluência observada ao microscópio óptico atinge cerca de 80%. Nessa altura do cultivo removeu-se o meio de cultura, as células foram lavadas com 3 mL de PBS 1x e adicionou-se 1 mL de tripsina incubando durante 5 minutos a uma temperatura de 37 °C na estufa com 5% de CO₂ para ajudar a separar as células. Procedeu-se à contagem das células num hemacitómetro, câmara de contagem Neubauer Improved, e foi adicionado o meio DMEM correspondente para obter a concentração final de células de 75 000 células por poço nas microplacas de cultivo celular de 96 poços para os ensaios de Citotoxicidade e Inibição da proliferação celular. Nos ensaios de Citotoxicidade, as células são crescidas previamente, e só depois entram em contacto com as amostras em estudo, enquanto que nos ensaios de inibição da proliferação celular as células são cultivadas em diferentes concentrações das amostras.

2.6.1. Determinação da Citotoxicidade

Para avaliar o potencial citotóxico de compostos, existem diversos métodos que poderiam ser utilizados, entre os quais o método do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este é um teste colorimétrico baseado na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais das células vivas e metabolicamente activas, converterem a solução aquosa de cor amarela do substrato MTT num sal formazan, formado por cristais, com uma coloração azul-escuro/roxo, insolúveis em água e que pode ser quantificado após dissolução a 595 nm. A quantidade de sal formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis já que as células mortas por efeito de um composto citotóxico não formam o sal. ^[54,55]

Para analisar a citotoxicidade, 100 µL das células por poço foram previamente cultivadas numa microplaca de 96 poços de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Colocou-se a microplaca a incubar durante 72 horas a 37 °C na estufa com 5% de CO₂. Após isso, o meio foi substituído por 100 µL das soluções da amostra a analisar com diferentes concentrações, em meio DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Incubaram-se durante 24 horas. De seguida, retirou-se o meio contendo as soluções de amostra e lavaram-se os poços da microplaca duas vezes com PBS 1x. Incubaram-se as células durante 2,5 horas 100 µL por poço de uma solução de MTT 0,5 mg/mL, em meio DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Por fim descartou-se a solução de MTT e adicionou-se 200 µL de metanol em cada poço, de forma a dissolver os cristais formados. Registou-se a absorvência a 595 nm e 630 nm num leitor de microplacas Tecan SunriseTM. Foram

realizados ensaios controlo em que as células foram incubadas com meio DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Para cada concentração foram realizados oito ensaios. Os resultados foram expressos em percentagem de citotoxicidade considerando que a absorvência nos ensaios controlo corresponde a 100 % de viabilidade, ou seja 0 % de citotoxicidade. A representação da citotoxicidade associada a doses crescentes da solução a analisar permitiu calcular para cada amostra analisada o IC₅₀, ou seja, a concentração da amostra que apresenta 50 % de citotoxicidade. O mesmo tipo de procedimento foi utilizado para as soluções dos compostos usados como padrões, ácido Quínico, Gálico e Elágico.

2.6.2. Inibição da Proliferação Celular

Para avaliar o potencial citoestático das amostras a analisar foi desenhado um procedimento experimental adaptado do anterior.^[56] Neste caso, as células foram inoculadas com concentrações crescentes de soluções da amostra a analisar em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. O objectivo seria avaliar se, na presença das amostras, ocorreria inibição da proliferação celular sendo quantificadas as células viáveis após a incubação, pelo método do MTT.^[56]

Para analisar a viabilidade, 100 µL das células por poço foram previamente cultivadas numa microplaca de 96 poços de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Após isso foram adicionadas as amostras a analisar com diferentes concentrações em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Colocou-se a microplaca a incubar durante 72 horas a 37 °C na estufa com 5% de CO₂. De seguida, retirou-se o meio contendo as soluções de amostra e lavaram-se os poços da microplaca duas vezes com PBS 1x. Incubaram-se as células durante 2,5 horas 100 µL por poço de uma solução de MTT 0,5 mg/mL, em meio DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Por fim descartou-se a solução de MTT e adicionou-se 200 µL de metanol em cada poço, de forma a dissolver os cristais formados. Registou-se a absorvência a 595 nm e 630 nm num leitor de microplacas Tecan Sunrise™. Foram realizados ensaios controlo em que as células foram incubadas com meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Para cada concentração foram realizados oito ensaios. Os resultados foram expressos em percentagem de viabilidade considerando que a absorvência nos

ensaios controlo corresponde a 100 % de viabilidade. A representação da viabilidade associada a doses crescentes da solução a analisar permitiu calcular para cada amostra analisada o IC₅₀, ou seja, a concentração da amostra que apresenta 50 % de viabilidade. O mesmo tipo de procedimento foi utilizado para as soluções dos compostos usados como padrões, ácido Quínico, Gálico e Elágico.

2.6.3. Análise preliminar do efeito da fracção Grande sobre as proteínas celulares por SDS-PAGE e a permeação dos compostos

De modo a avaliar o perfil de proteínas existentes na linha celular MCF-7 em contacto com concentrações crescentes da fracção Grande recorreu-se à análise electroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das proteínas presentes no meio de cultura. Para estes ensaios as células foram cultivadas em microplacas de 12 poços de acordo com o procedimento descrito em 2.6.2 em contacto com três concentrações diferentes da fracção Grande em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Foram utilizadas as concentrações da fracção Grande de 0,05, 0,2 e 0,35 mg/mL, respectivamente o IC₁₀, IC₅₀ e IC₈₀ previamente conhecido do ensaio da Inibição da proliferação celular. Após 72 h de incubação o meio de cultura contendo as células não viáveis, designado por sobrenadante, e as células viáveis, ressuspendidas em PBS 1x, foram preservados a -80 °C. Foi efectuada a quantificação de proteína de acordo com o método de Bradford ^[57] usando a albumina do soro bovino como padrão (Anexo 6.3.1) e a electroforese em gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada num sistema horizontal (Gel Box, Amersham, GE Healthcare) usando um gel de 10 poços de gradiente de acrilamida 4-12 % (Amersham ECL, GE Healthcare).

As proteínas do sobrenadante foram analisadas por SDS-PAGE; antes de se aplicar as amostras no gel, foi necessário um tratamento prévio da amostra para extracção das proteínas. O sobrenadante foi descongelado e sonicou-se durante 10 minutos, e depois centrifugado a 4 °C a 16000 g durante 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e quantificaram-se as proteínas de acordo com o método de Bradford. Precipitaram-se “overnight” 20 µg com dois volumes de acetona a 4 °C, separaram-se por centrifugação a 16000 g durante 10 minutos e secaram-se em azoto.

Inicialmente colocou-se o tampão de corrida (Tampão Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM; SDS 0,1% m/v) no cátodo e ânodo do sistema. Foi efectuada uma pré-corrída para equilibrar o gel de gradiente de acrilamida 4-12 % a 160 V durante 12 minutos. As

amostras (20 µg) foram misturadas com tampão de aplicação 5x SDS-PAGE Sample Loading Buffer (NZYtech) e aplicadas nos poços do gel bem como o marcador de peso molecular NZY Blue Protein Marker (NZY Tech). A corrida foi realizada a 100 V. O gel foi corado overnight numa solução de azul de Coomassie (0,1% m/v) e posteriormente descorado com uma solução metanol:ácido sulfúrico.^[58] O tratamento de resultados do SDS-PAGE foi feito usando o software ImageJ.

O conteúdo das células viáveis foi analisado por HPLC-DAD de acordo com o procedimento descrito em 2.5.5 após terem sido sujeitas ao mesmo procedimento de sonicação subsequente ao descongelamento referido anteriormente.

2.7. Análise Estatística

O software utilizado foi o GraphPadPrism 5.0 e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão. Foi realizada uma análise adicional da variância pelo teste-t com o valor de $P= 0.05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização das Membranas

Como foi referido anteriormente, as membranas após serem preparadas devem ser compactadas ao módulo de Ultrafiltração, e só após esta etapa devem ser caracterizadas em termos de Permeabilidade Hidráulica, Rejeição a sais e solutos orgânicos e determinado o seu Limite de Exclusão Molecular.

3.1.1. Determinação da Permeabilidade Hidráulica

Foram preparadas um lote de membranas do tipo CA₁ e do tipo CA₄ de acordo com o procedimento experimental descrito em 2.2. Após a compactação das membranas, determinou-se a Permeabilidade Hidráulica das membranas utilizadas, tendo-se obtido os valores experimentais (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Valores registados experimentalmente para a massa de água recolhida, o tempo do ensaio e a temperatura da água para as membranas CA₁ e CA₄.

Membrana	Pressão (bar)	Peso Vazio (g)	Peso Cheio (g)	Peso (g)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
CA ₁	1,0	168,83	208,61	39,79	30,0	32,0
	1,5	141,42	191,35	49,94	25,0	31,0
	2,0	122,15	179,75	57,60	22,0	29,0
	2,5	136,88	185,69	48,81	15,0	28,0
	3,0	137,88	187,24	49,36	15,0	26,0
CA ₄	1,0	133,75	201,11	67,36	2,0	14,8
	1,5	156,35	227,23	70,88	1,5	15,0
	2,0	141,38	229,61	88,23	1,5	15,5
	2,5	136,84	242,44	105,6	1,5	16,1
	3,0	153,63	275,04	121,41	1,5	16,6

Com as massas obtidas para cada ensaio, foi possível determinar o caudal mássico e o fluxo de permeação através da expressão,

$$J_p = \frac{Q}{A}$$

A área de cada uma das membranas utilizadas foi de 147,8 cm², e o fluxo foi corrigido para uma temperatura de 25 °C, através da equação (2). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Caudais mássicos (Q), fluxo de permeação (Jp) e fluxo a 25 °C para as membranas CA₁ e CA₄.

Membrana	Pressão (bar)	Q (Kg/h)	Jp (Kg/h/m ²)	Jp 25°C (Kg/h/m ²)
CA ₁	1,0	0,08	2,69	2,30
	1,5	0,12	4,05	3,54
	2,0	0,16	5,31	4,85
	2,5	0,20	6,60	6,17
	3,0	0,20	6,68	6,53
CA ₄	1,0	2,02	68,34	87,12
	1,5	2,84	95,89	121,63
	2,0	3,53	119,36	149,55
	2,5	4,22	142,86	176,38
	3,0	4,86	164,25	200,33

Com os valores obtidos na Tabela 3.2, foi possível obter a Figura 3.1 que relaciona o fluxo a 25 °C com a pressão de trabalho,

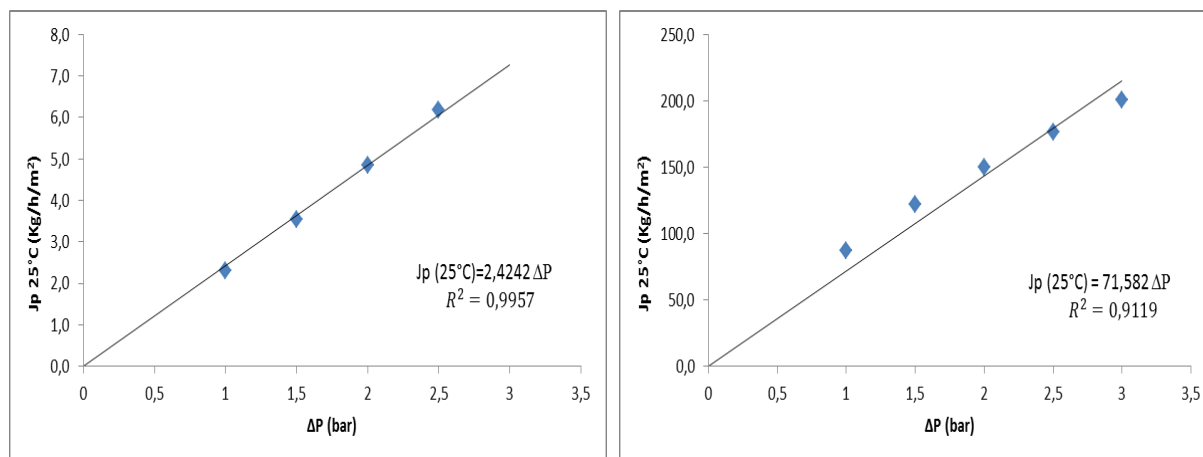


Figura 3.1 – Determinação da Permeabilidade Hidráulica para a membrana CA₁ (esquerda) e CA₄ (direita).

A partir da equação (1), o declive da recta obtido corresponde à permeabilidade hidráulica da membrana (L_p), como tal obteve-se os valores de permeabilidade para cada membrana que se apresentam na tabela 3.3,

Tabela 3.3 – Permeabilidade Hidráulica para as membranas CA₁ e CA₄.

Membrana	Lp (Kg/h/m ² /bar)
CA ₁	2,42
CA ₄	71,58

3.1.2. Determinação da rejeição das membranas a sais mono e bivalentes

Para determinar a rejeição aos sais das membranas, começou-se por proceder de forma idêntica aos ensaios anteriores, ou seja, a registar os valores experimentais de pressão, temperatura, massa de fluido recolhido e tempo e a determinar o fluxo de permeação (Jp) e o fluxo a 25 °C (ver Anexo 6.1.1).

Para além disso, para os ensaios realizados mediu-se a condutividade quer da solução salina, quer do permeado obtido, e converteu-se para concentração através das rectas de calibração (ver Anexo 6.1.1).

$$NaCl [X] = 0,492 \times \text{Condutividade}$$

$$Na_2SO_4 [X] = 0,617 \times \text{Condutividade}$$

Com os valores de concentração calculados, e a partir da relação (3), foi possível determinar os coeficientes de rejeição das membranas preparadas (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Coeficientes de rejeição a sais monovalentes e bivalentes, para as membranas CA₁ e CA₄.

Membrana	f NaCl (%)	f Na ₂ SO ₄ (%)
CA ₁	12	48,8
CA ₄	0,5	3,8

Analisando os resultados obtidos para a membrana CA₁, verificou-se que a membrana apresenta valores de rejeições moderados para os sais, indicando um processo de Ultrafiltração em que o diâmetro do poro é reduzido. Para além disso foi ainda possível observar que o coeficiente de rejeição ao sal monovalente é inferior ao do sal bivalente, como seria de esperar. Os valores de rejeição para a membrana CA₄, quer para o sal monovalente, quer para o bivalente, são próximos de zero, o que significa que a maior parte das moléculas consegue atravessar os poros da membrana, comprovando o uso de uma membrana de Ultrafiltração. ^[45]

3.1.3. Determinação da rejeição das membranas a solutos orgânicos

Foram preparadas três soluções de Polietilenoglicol (PEG), com massas moleculares de 3000, 6000 e 10000 g/mol para a membrana CA₁, enquanto para a membrana CA₄ utilizaram-se soluções de PEG com peso molecular de 20000 g/mol e Dextran 40000 e 70000 g/mol. Seguiu-se o procedimento experimental descrito em 2.3. e os resultados obtidos encontram-se no Anexo 6.1.2.

Para determinar a rejeição das membranas aos solutos orgânicos, mediu-se o Carbono Orgânico Total (COT), para o permeado e alimentação (ver Anexo 6.1.2). Os resultados de rejeição obtidos estão presentes nas Tabela 3.5 e 3.6.

Tabela 3.5 – Coeficiente de rejeição aos solutos orgânicos para a membrana CA₁.

Membrana	f PEG 3000 (%)	f PEG 6000 (%)	f PEG 10000 (%)
CA ₁	89,82	97,06	98,84

Tabela 3.6 – Coeficiente de rejeição aos solutos orgânicos para a membrana CA₄.

Membrana	f PEG 20000 (%)	f Dextran 40000 (%)	f Dextran 70000 (%)
CA ₄	33,02	72,47	87,32

Pelas tabelas 3.5 e 3.6 foi possível observar que os valores de rejeição das membranas vão aumentando com o aumento do peso molecular das soluções orgânicas utilizadas. A partir destes valores, foi possível obter a figura 3.2 que relaciona o logaritmo de $(f/(1-f))$ com o peso molecular dos solutos orgânicos utilizados, e assim determinar o MWCO.

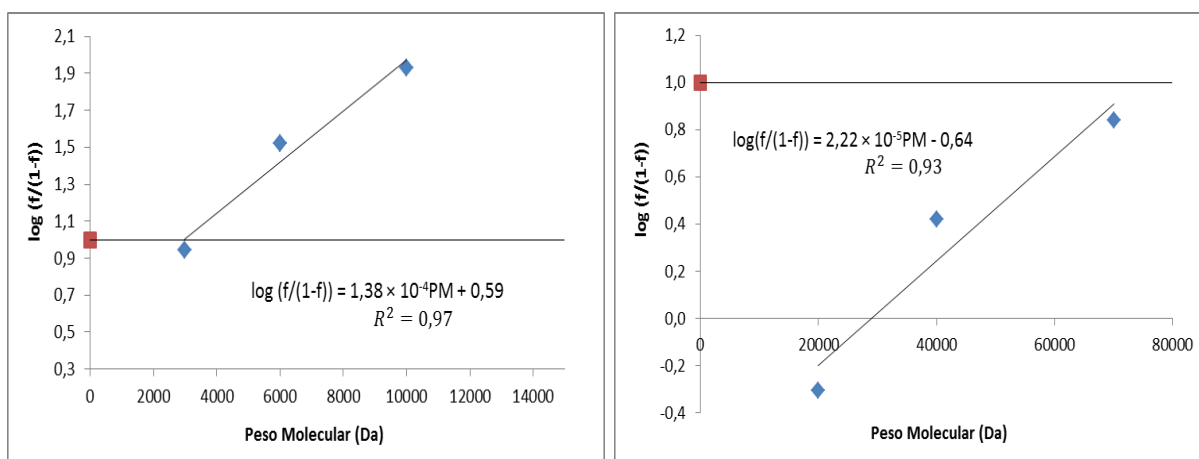


Figura 3.2 – Determinação gráfica do MWCO para as membranas CA₁ (esquerda) e CA₄ (direita).

Com as equações das rectas obtidas, e através da sua intersecção com a recta $y=1$, obteve-se o valor de MWCO para cada membrana presente na tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Limite de exclusão molecular para as membranas CA₁ e CA₄.

Membrana	MWCO (kDa)
CA ₁	3
CA ₄	74

A partir dos valores obtidos, é possível afirmar que o permeado recolhido através da membrana CA₁, contém maioritariamente moléculas com peso molecular inferior a 3000 Da. Como tal, as membranas CA₁ foram utilizadas para a recolha da fracção do efluente da cortiça que foi identificada como fracção Pequena.

O valor de MWCO obtido para a membrana CA₄ permite concluir que a maioria das moléculas com peso inferior a 74000 Da tem a capacidade de atravessar os poros da membrana e serem recolhidas no permeado.

3.2. Ensaaios com o Efluente da Cortiça

Apenas depois de concluída a caracterização total das membranas a utilizar, se pode prosseguir para a etapa do tratamento do Efluente e recolha das suas fracções.

O efluente da Cortiça foi separado em três fracções, a fracção Pequena onde se encontram os compostos que permeiam através da membrana com limite de exclusão molecular de 3000 Da, a fracção Média, onde se encontram os compostos que permeiam através da membrana com MWCO de 74000 Da e que são retidos pela membrana de 3000 Da, e por último a fracção Grande, onde se encontram os compostos retidos pela membrana de 74000 Da.

3.2.1. Fracção Pequena

Através de um processo simples de ultrafiltração, modo de concentração, utilizando a membrana CA₁, realizaram-se dois ensaios seguidos para recolher a maior quantidade possível de permeado, de acordo com o procedimento experimental descrito em 2.4. Tal como nos ensaios anteriores registaram-se os valores experimentais de pressão, temperatura, massa de fluido recolhido e tempo, e determinou-se o caudal mássico e os fluxos associados ao processo (Tabela 3.8).

Por último determinou-se o Pr/PWP, que corresponde ao rácio entre o fluxo a 25 °C obtido com a amostra e o fluxo de permeação obtido com água pura, e que é usado como indicador do desvio à idealidade, ou seja, permite comparar o comportamento face ao fluido utilizado com o comportamento que se obtém para a água. Este parâmetro foi calculado a partir da seguinte equação,

$$\frac{P_r}{PWP} = \frac{J_p(25^\circ\text{C})}{L_p \times \Delta P} \quad (4)$$

Tabela 3.8 – Valores experimentais para os ensaios com o efluente da cortiça utilizando as membranas CA₁.

Ensaio	1	2
Pressão (bar)	2	2
Peso Vazio (g)	128,49	144,31
Peso Cheio (g)	238,51	504,92
Peso (g)	110,03	360,61
Tempo (min)	90	345
Q (kg/h)	0,073	0,063
Jp (kg/h/m ²)	2,48	2,12
T (°C)	28,4	20,7
Jp 25 °C (kg/h/m ²)	2,30	2,35
Pr/PWP (%)	47	48

A partir dos valores obtidos, é possível verificar que os ensaios, apesar de terem durações diferentes, os parâmetros registados são semelhantes, como seria de esperar. Para cada permeado recolhido foi analisado a Condutividade, o COT e a Cor, bem como os respectivos coeficientes de rejeição (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 – Condutividade, cor e carbono orgânico total (COT) das soluções de Alimentação (A) e Permeado (P), e respectivos coeficientes de rejeição.

Ensaio	1	2
Condutividade A (μS/cm)	1920	1927
Condutividade P (μS/cm)	1361	1288
f (%)	29	33
Cor A	13320	13320
Cor P	510	275
f (%)	96	98
COT A (ppm)	2259,64	2259,64
COT P (ppm)	436,32	269,65
f (%)	81	88

Analisando os valores obtidos verificou-se que para o ensaio 2 os coeficientes de rejeição são superiores ao primeiro ensaio, o que era esperado, uma vez que o maior tempo de duração do ensaio 2, 345 minutos, relativamente ao ensaio 1, fez com que no ensaio 2 ocorressem fenómenos de polarização de concentração/colmatação da membrana o que aumentou a rejeição.

3.2.2. Frações Média e Grande

Para a recuperação das outras duas frações do Efluente, foi necessário recorrer a um processo de Diafiltração, de acordo com o procedimento experimental descrito em 2.4. No caso da fração Grande, utilizou-se a membrana CA₄, de forma a remover os compostos de tamanho inferior a 74000 Da e a concentrar os maiores no retentado. A fração Média foi obtida no concentrado da permeação através da membrana CA₁ usando como alimentação o permeado da diafiltração da fração Grande.

Durante o processo de Diafiltração registou-se o volume de Permeado recolhido, o que permitiu determinar os Diavolumes (DV), através da seguinte relação,

$$DV = \frac{\text{volume de permeado recolhido}}{\text{volume de alimentação inicial}}$$

Assim, foi possível obter a figura 3.3 e 3.4 que relacionam a variação do TOC no permeado e alimentação, respectivamente.

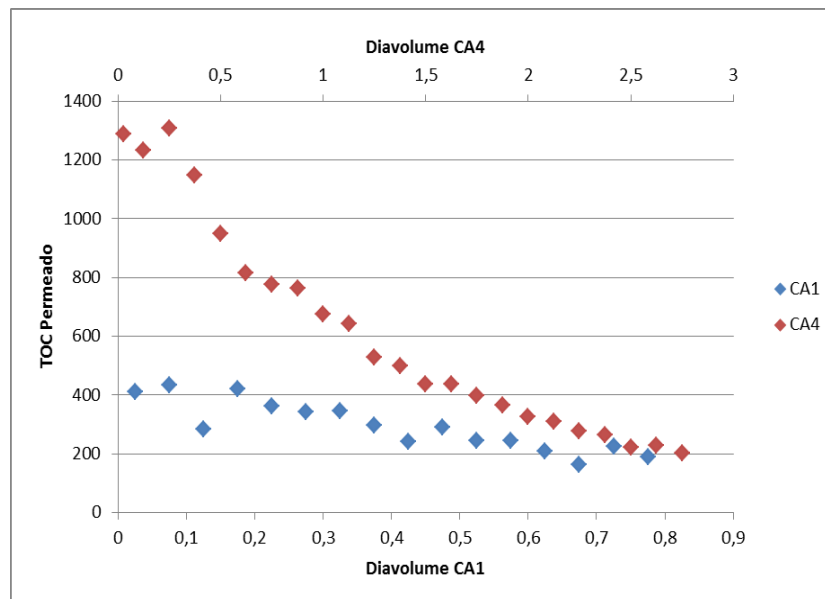


Figura 3.3 – Representação gráfica da variação do TOC no Permeado em função do Diavolume para ambas as membranas CA₁ e CA₄.

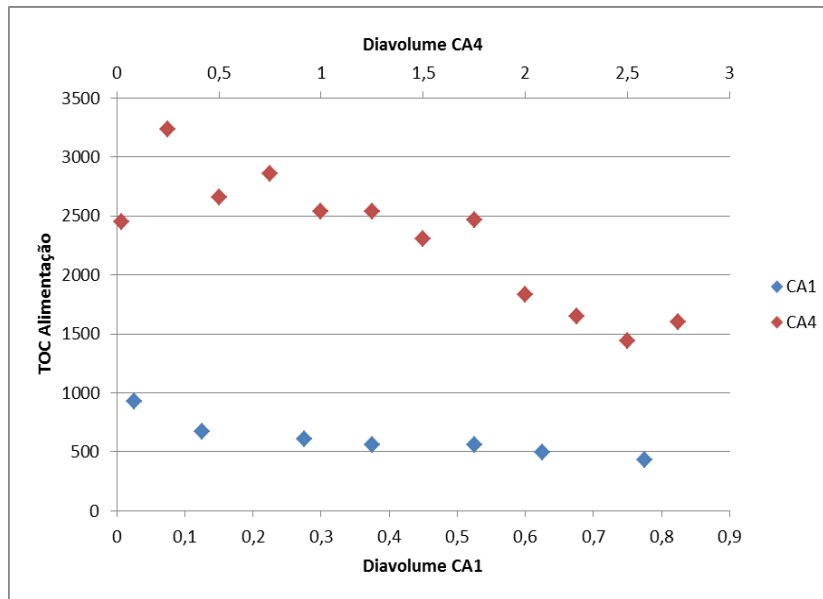


Figura 3.4 – Representação gráfica da variação do TOC na Alimentação em função do Diavolume, para ambas as membranas CA₁ e CA₄.

Como se pode observar pela análise destes gráficos, o TOC quer do Permeado, quer da Alimentação diminui ao longo do processo de diafiltração, até que estabiliza, altura na qual o processo foi interrompido.

Obteve-se também a figura 3.5, que demonstra as variações de fluxo ao longo do processo de diafiltração. Verificou-se que o fluxo se mantém constante ao longo do processo para a membrana CA₁ enquanto na membrana CA₄ se observaram variações de fluxo ao longo do processo, associadas a variações de pressão.

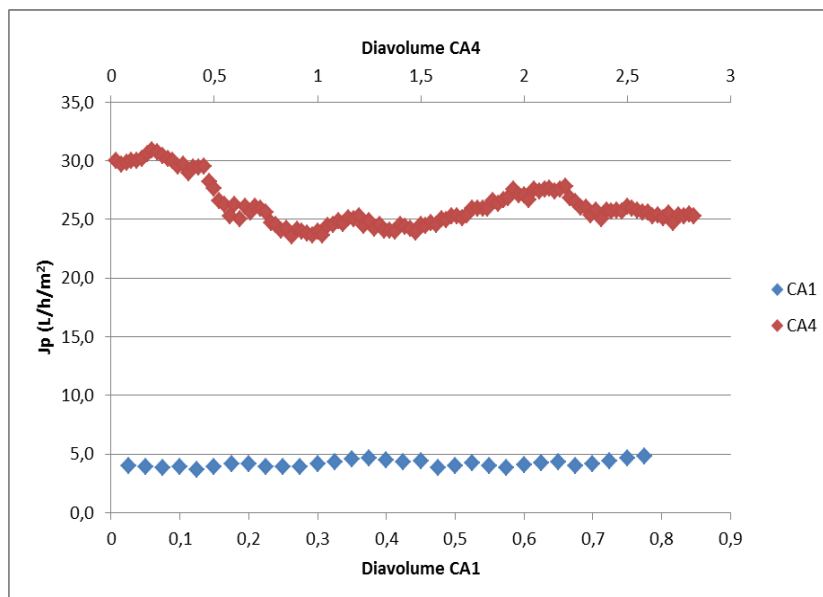


Figura 3.5 – Representação gráfica da variação do Fluxo em função do Diavolume para ambas as membranas CA₁ e CA₄.

A figura 3.6 relaciona os factores de rejeição de ambas as membranas ao longo do processo.

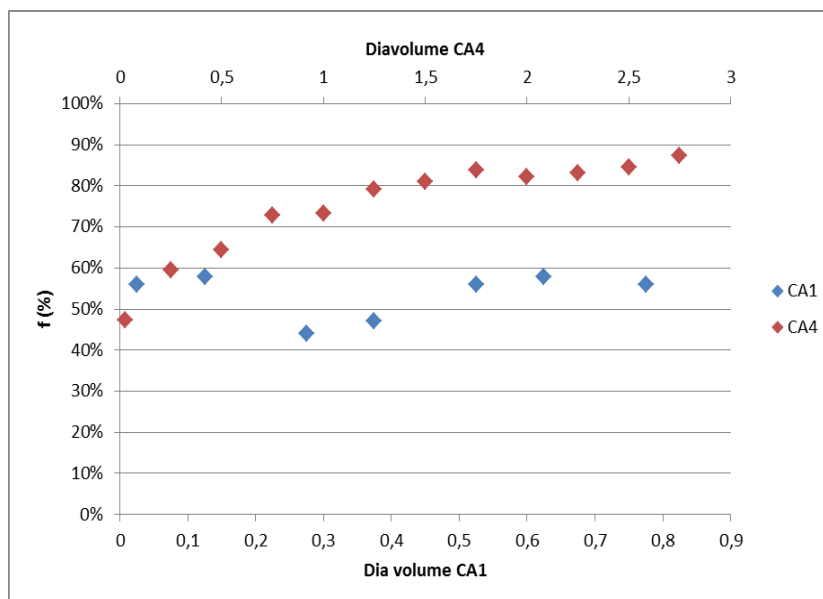


Figura 3.6 – Representação gráfica da variação do coeficiente de rejeição em função do Diavolume para ambas as membranas CA₁ e CA₄.

Pode-se verificar que o coeficiente de rejeição, para a membrana CA₄, vai aumentando, até atingir um patamar próximo dos 85%. Por outro lado, a rejeição na membrana CA₁ permaneceu constante num valor de aproximadamente 55% durante todo o processo, isto deve-se ao facto da membrana CA₁, por ter os poros mais pequenos, não ser tão afectada pela polarização de concentração comparativamente com a membrana CA₄, o que lhe permitiu à membrana CA₁ manter constante a sua selectividade ao longo do processo.

3.3. Caracterização do Efluente da cortiça e das fracções

3.3.1. Quantificação das Fracções do Efluente

As fracções obtidas através dos processos de membranas foram quantificadas em termos de Fenóis Totais, Taninos e Açúcares, de acordo com o procedimento experimental descrito em 2.5.1, 2.5.2 e 2.5.3, respectivamente e tendo-se obtido os seguintes resultados (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 – Caracterização das diferentes fracções relativamente a Fenóis Totais, Taninos e Açúcares.

	Efluente	Fracção Pequena <3000 Da	Fracção Média 3000 a 74000 Da	Fracção Grande >74000 Da
Fenóis (mg/mg extracto)	0,100 ± 0,005	0,053 ± 0,004	0,079 ± 0,004	0,156 ± 0,005
Taninos (mg/mg extracto)	0,062 ± 0,004	0,025 ± 0,002 ^a	0,031 ± 0,001 ^a	0,074 ± 0,003
Açúcares (mg glucose/mL)	0,217 ± 0,026 ^b	0,128 ± 0,04 ^c	0,065 ± 0,008 ^c	0,278 ± 0,052 ^b
TOC (ppm)	2259,64	352,99	427,99	1602,25

a,b,c – os valores não são significativamente diferentes entre si, segundo o teste da ANOVA para um intervalo de confiança de 95%, obtido através do programa *GraphPad Prism*

Em termos de Fenóis totais e Taninos, verificou-se que a quantidade destes compostos aumenta no sentido das fracções maiores, sendo que a fracção mais rica neste tipo de compostos é a fracção Grande, apresentando maior concentração de fenóis e taninos do que o próprio Efluente.

Relativamente à quantificação dos Açúcares redutores, a fracção Grande e o efluente são as que apresentam uma maior presença destes compostos, tal como referido anteriormente (no ponto 1.3.1.1) o efluente da cortiça caracteriza-se por ter uma elevada carga orgânica e uma grande quantidade de compostos fenólicos e açúcares. ^[36-38] A presença dos açúcares na fracção Grande pode estar relacionada com o facto de os açúcares poderem formar complexos com os taninos presentes no efluente da cortiça, e assim originarem moléculas de elevado peso molecular que têm dificuldade em atravessar os poros das membranas.

No caso da membrana CA₄, o aumento dos taninos no concentrado levou a que os açúcares ficassem maioritariamente retidos na fracção Grande e portanto menos abundantes na fracção Média. Analisando os valores de carga orgânica, observou-se uma diminuição dos mesmos comparativamente ao efluente, indicando que este processo é eficiente no tratamento do efluente da cortiça.

3.3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier foi utilizada de acordo com o procedimento descrito em 2.5.4, para uma análise preliminar da composição química do efluente da cortiça e das suas fracções. A espectroscopia de FITR baseia-se nas vibrações dos átomos de uma molécula que resultam numa alteração do momento dipolar da molécula e no facto das ligações químicas apresentarem frequências específicas às quais vibram a níveis de energia bem definidos, permitindo identificar os grupos funcionais presentes na molécula. [59] Na Figura 3.7, encontram-se os espectros do efluente e de cada fracção recolhida.

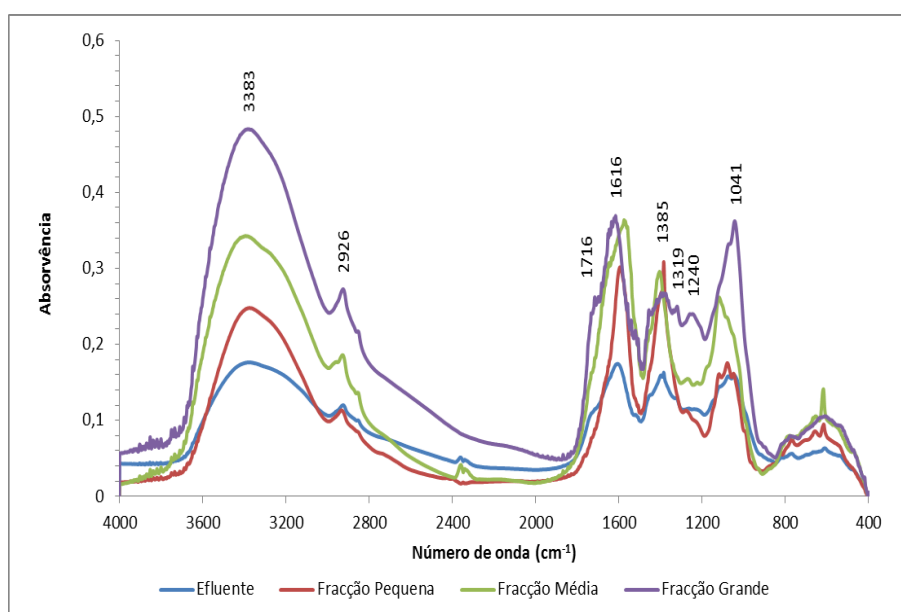


Figura 3.7 – Comparação dos espectros de infravermelhos obtidos das fracções recolhidas e do efluente, em KBr (1 mg).

De uma forma geral, a comparação destes espectros revela uma elevada semelhança espectral com o aparecimento em todas as amostras analisadas de bandas de absorção nas frequências assinaladas na Figura 3.7, no entanto com diferentes intensidades. Aos 3383 cm^{-1} é visível uma banda larga e intensa característica das vibrações de alongamento das ligações -OH presentes em variados compostos como nos polissacáridos e nos compostos fenólicos. A banda aos 2926 cm^{-1} com um pequeno ombro a 2860 corresponde à vibração simétrica e assimétrica de alongamento das ligações C-H nos grupos CH_2 e CH_3 das cadeias alifáticas de polissacáridos e alguns compostos fenólicos como os taninos. [60]

A região 1800-900 cm^{-1} tem parte da região de impressão digital e inclui a absorção típica de moléculas fenólicas, tais como a vibração de alongamento dos

grupos carbonilo C=O a 1716 cm^{-1} ,^[61] que aparece como um ombro e mais perceptivelmente na fracção Grande e no efluente. No entanto, alguns autores atribuem um pico específico em torno de 1716 cm^{-1} a um grupo C=O-H que corresponde à interacção por ligação de taninos, tal como a catequina, quando imersos numa matriz polimérica proporcionando uma ferramenta de diagnóstico para o estudo de interacções de polímeros.^[62] Como foi mostrado, tanto no efluente como na fracção Grande, existe um maior teor em açúcares e taninos nestas fracções (Tabela 3.10) e a presença deste pico nos espectros de FTIR em ambas, confirmou as interacções anteriormente indicadas e/ou a agregação que ocorrem devido aos polímeros, tais como os açúcares e taninos. No entanto, a presença desta banda a 1716 cm^{-1} pode também evidenciar a existência de ácidos urónicos. A presença deste tipo de compostos tem evidenciado uma elevada actividade na eliminação de espécies reactivas de oxigénio.^[60]

À frequência 1616 cm^{-1} e aos 1385 cm^{-1} encontram-se bandas características da vibração do grupo C=O, de C=C e outras vibrações características de anéis aromáticos dos compostos fenólicos.^[63,64] São visíveis também a 1319 , a 1240 e a 1041 cm^{-1} , bandas características das vibrações simétricas e assimétricas das ligações C-O dos compostos fenólicos e taninos.^[64] Estas três bandas são mais intensas na fracção Grande o que confirma a presença de uma maior quantidade deste tipo de compostos nesta fracção, relativamente a todas as outras e ao efluente.

3.3.3. Cromatografia Líquida de elevada resolução (HPLC-DAD)

As fracções recolhidas e o Efluente foram analisados através de uma cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD) com uma coluna de fase reversa RP-18, descrita em 2.5.5, o cromatograma obtido para o Efluente é apresentado de seguida na Figura 3.8.

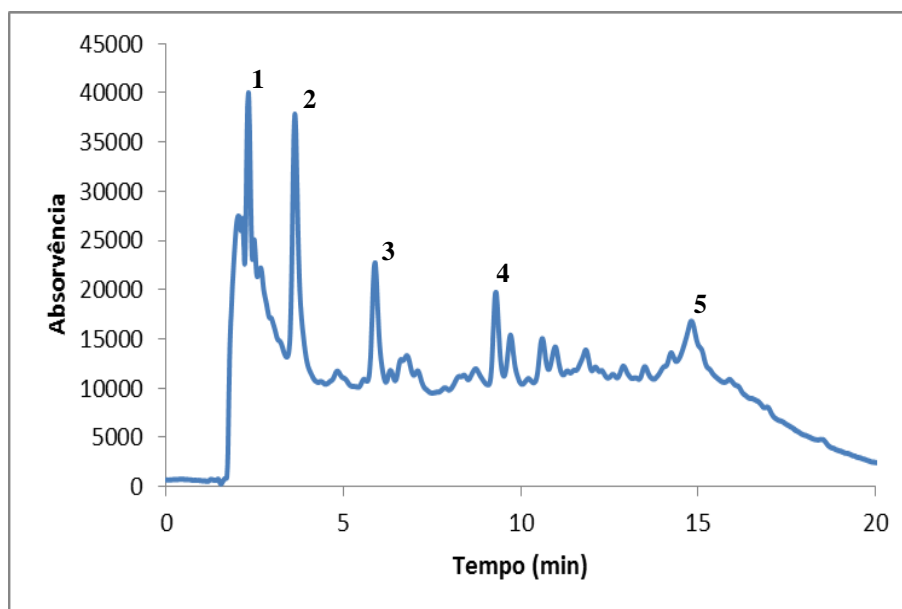


Figura 3.8 – Cromatograma do efluente da cortiça para uma concentração de 1mg/mL.

Com o cromatograma obtido para o Efluente da cortiça, foi possível identificar cinco picos maioritários de compostos presentes na amostra. De seguida comparou-se o cromatograma da Figura 3.8 com os cromatogramas das restantes fracções de forma a averiguar a presença dos compostos identificados e pela intensidade dos picos a quantidade relativamente ao efluente da cortiça.

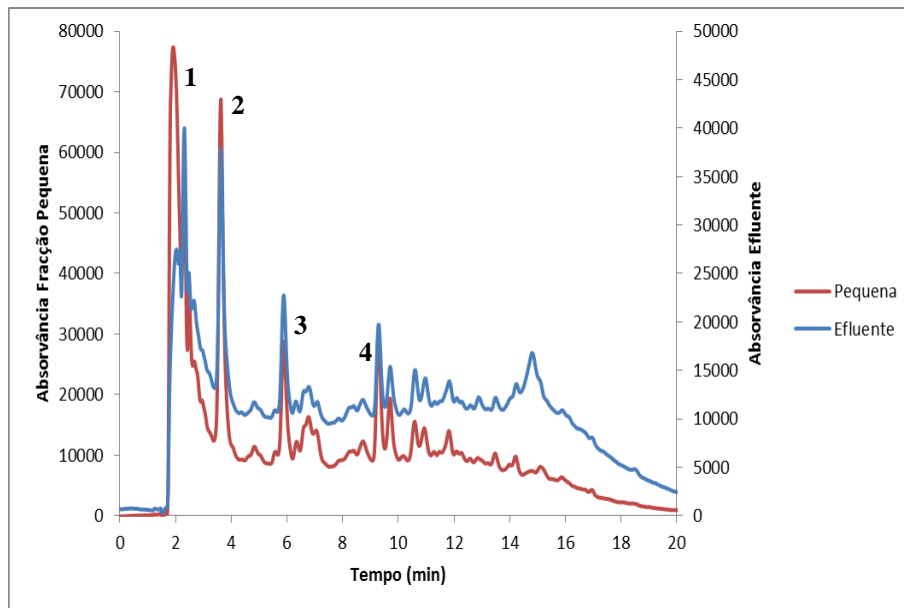


Figura 3.9 – Sobreposição dos cromatogramas do Efluente com a fração Pequena

Como se pode observar pela comparação dos cromatogramas do Efluente e da fração Pequena (Figura 3.9), verificou-se a presença da maioria dos compostos em ambas as amostras, sendo que na fração Pequena eles se encontram em menor quantidade do que no Efluente.

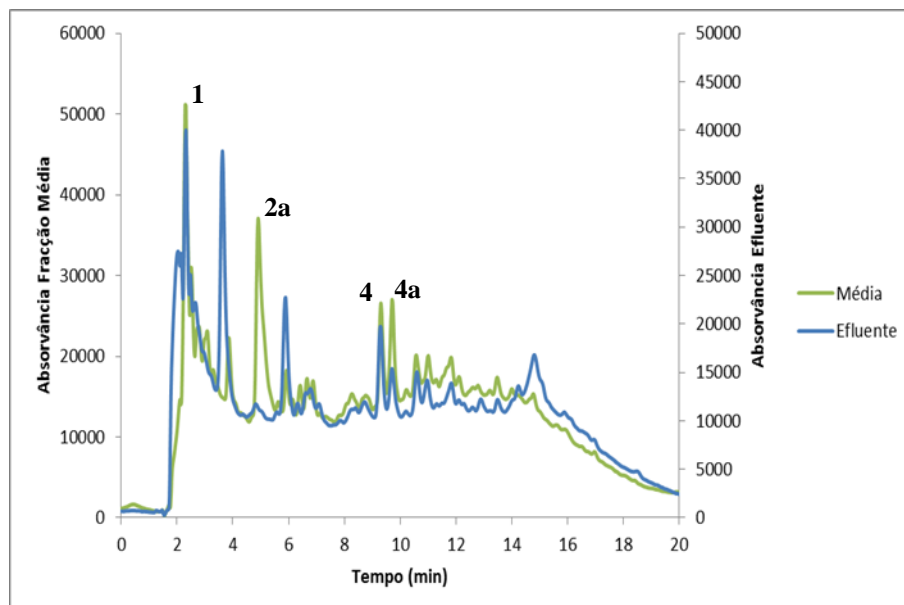


Figura 3.10 – Sobreposição dos cromatogramas do Efluente com a fração Média

Para a fracção Média, cujo cromatograma está representado na Figura 3.10, existe também uma sobreposição quase completa com o cromatograma do Efluente, havendo apenas a diminuição do pico ao tempo de retenção de 15 minutos, e o aparecimento de dois picos identificados com os números 2a. e 4a aos tempos de retenção de 5 e 10 minutos, respectivamente. Os espectros de UV-vis destes dois picos estão representados na Figura 3.11.

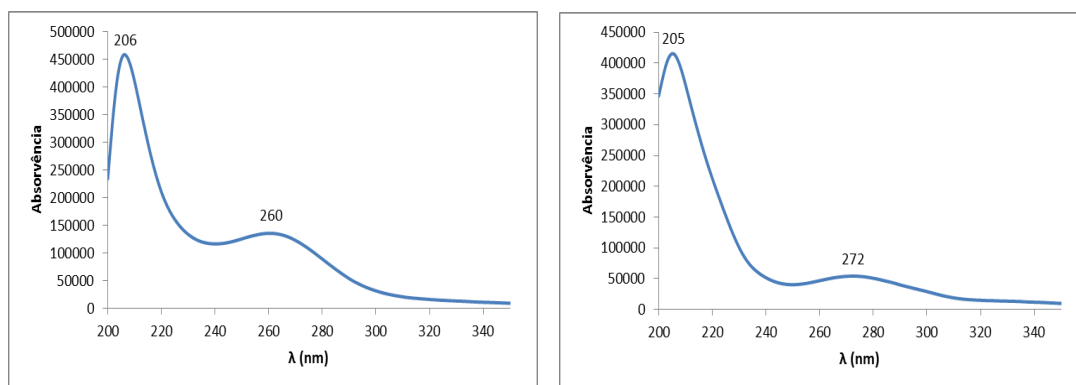


Figura 3.11 – Espectros de UV-vis dos picos 2a. (esquerda) e 4a. (direita).

Através dos espectros UV-vis de cada um dos picos, e por comparação com a literatura, é possível propor que se trata de compostos da família dos elagitaninos, vulgarmente encontrados na cortiça, em que a um ácido hexa-hidroxi-difenico (HHDP – Figura 3.12) se encontra ligado um resíduo glicosídeo. ^[65]

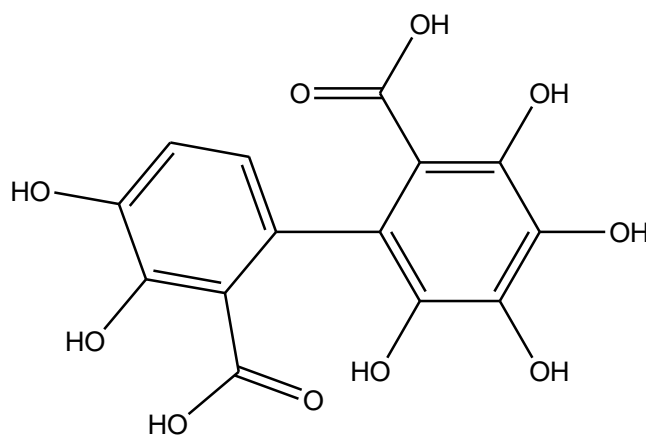


Figura 3.12 – Estrutura molecular do HHDP. ^[65]

O cromatograma da fracção Grande foi também comparado com o do efluente, tendo-se obtido a figura 3.13.

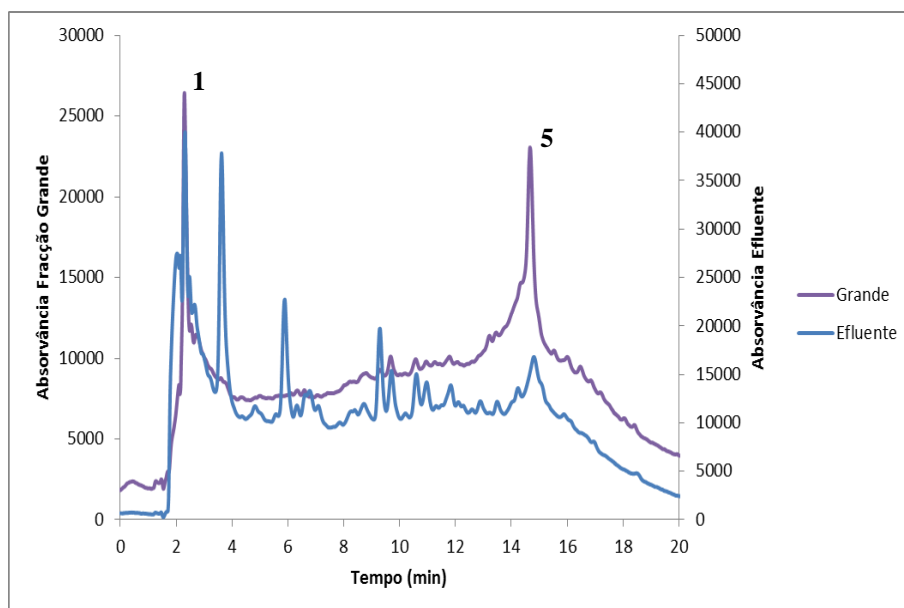


Figura 3.13 – Sobreposição dos cromatogramas do Efluente com a fracção Grande.

Analisando os cromatogramas da fracção Grande e do Efluente (Figura 3.13), verificou-se que a fracção Grande é aquela que difere mais do Efluente, sendo constituída maioritariamente por dois compostos, que estão representados pelos picos 1 e 5.

Na Tabela 3.11, estão representadas as intensidades relativas para os sinais dos picos maioritários identificados por HPLC-DAD.

Tabela 3.11 – Intensidade relativa dos sinais dos picos maioritários obtidos por HPLC-DAD para o Efluente da cortiça e suas fracções.

Pico	Efluente da cortiça	Fracção Pequena	Fracção Média	Fracção Grande
1	+	++	+	+
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	+	+	-
5	+	-	-	+++

3.3.4. Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS)

Para completar a caracterização do Efluente e das respectivas fracções, estes foram analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), conforme o procedimento experimental descrito em 2.5.6, tendo-se conseguido identificar os seguintes compostos (Tabela 3.12).

Tabela 3.12 - Compostos fenólicos identificados no efluente da cortiça e respectivas fracções, perfis de fragmentação MSⁿ e de absorção no UV.

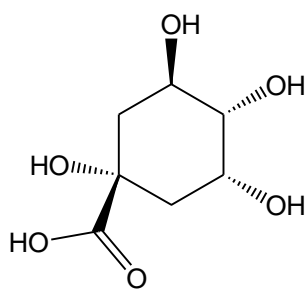
Nome do Composto	Pico	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	UV λ _{máx.} (nm)
Ácido Quínico	1	191	----	228
Ácido Gálico	2	169	125	228; 271
Ácido Protocatecuico	3	153	109	228; 259; 292
Ácido carboxílico de Brevifolina	4	291	247	229; 260
Ácido Elágico	5	301	----	254; 366

Para além destes compostos, foi ainda possível identificar apenas no efluente da cortiça, outros que não se visualizam no espectro cromatográfico, devido a terem uma baixa absorvidade ou estarem presentes em baixa quantidade (Tabela 3.13).

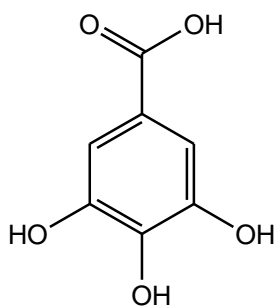
Tabela 3.13 - Compostos fenólicos identificados no efluente da cortiça e perfis de fragmentação MSⁿ.

Nome do Composto	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z
Galato de Metilo	183	169; 125
Ácido-o-hexósido acetil triterpeno	711	665; 503
Derivado do Ácido Cumárico	283	164
Derivado do Ácido Cumárico	299	265; 206; 164

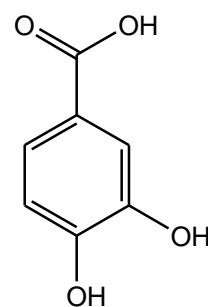
Na Figura 3.14 encontram-se representadas as estruturas moleculares de alguns compostos identificados no efluente e nas fracções recolhidas. Os espectros MS² dos compostos identificados encontram-se no Anexo 6.2.2.



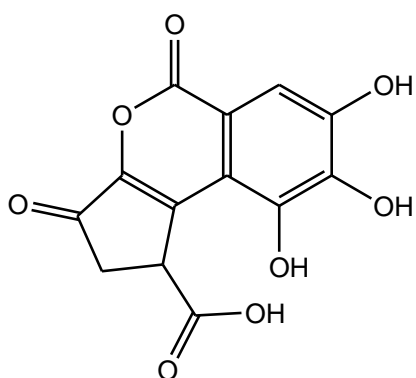
Ácido Quínico (1)



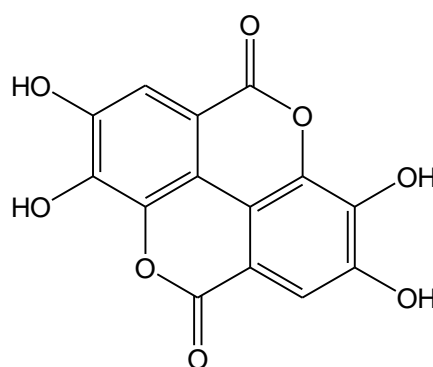
Ácido Gálico (2)



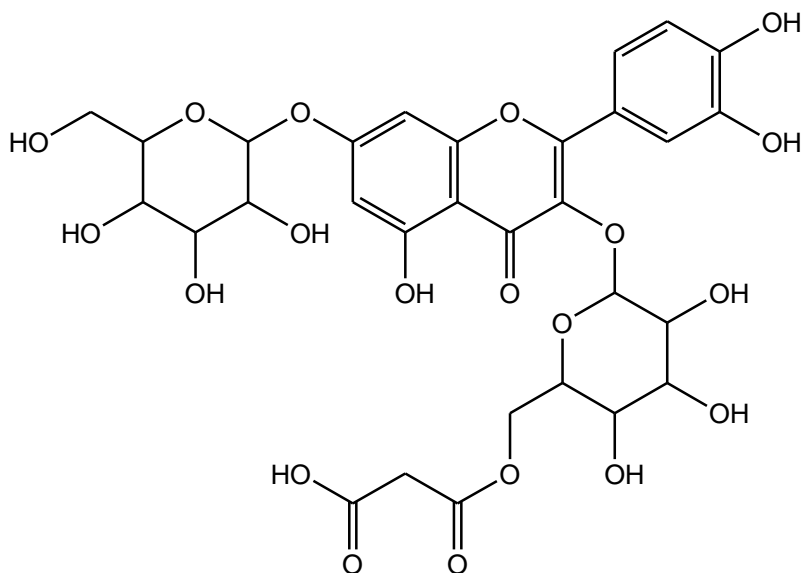
Ácido Protocatecuico (3)



Ácido carboxílico de Brevifolina (4)



Ácido Elágico (5)



Ácido-o-hexósido acetil triterpeno

Figura 3.14 – Estruturas químicas de compostos identificados no Efluente da cortiça.

Uma análise do cromatograma por HPLC-DAD do efluente da cortiça, Figura 3.8, e tendo por base os cinco picos maioritários identificados na Tabela 3.12 por LC-MS, pode prever-se que o efluente é constituído por cerca de 36% de ácido Gálico (2), 26% de ácido Quínico (1), 18% de ácido Protocatecuico (3), 14% de ácido carboxílico de Brevifolina (4) e 6% de ácido Elágico (5). Aplicando a mesma metodologia às fracções Pequena e Média, Figura 3.9 e 3.10 respectivamente, o ácido Elágico (5) não se encontra presente em nenhuma delas sendo que ambas são constituídas por ácido Quínico (1), cerca de 15% para a fracção Pequena e 59% para a Média, ácido Gálico (2), cerca de 50% e 12%, ácido Protocatecuico (3) cerca de 16% e 8% e ácido carboxílico de Brevifolina (4), cerca de 19% e 20%, respectivamente. A fracção Grande é formada por uma mistura de ácido Quínico (1), aproximadamente 60%, e os restantes 40% de ácido Elágico (5). Apesar da massa molar destes 2 compostos ser muito inferior ao MWCO da membrana, 74000 Da, o que indicaria que eles permeariam facilmente através da membrana, eles são grandemente rejeitados pela membrana uma vez que há uma grande acumulação de material à superfície da membrana que funciona como uma barreira adicional na transferência de massa. ^[14]

A quantificação de ácido Quínico, Gálico e Elágico (Tabela 3.14) identificados como maioritários no efluente e fracções recolhidas, foi efectuada com base em curvas de calibração recorrendo aos padrões comerciais, obtidas por HPLC-DAD (ver Anexo 6.2.3).

Tabela 3.14 – Doseamento do Ácido Quínico, Gálico e Elágico nas diferentes fracções recuperadas e no Efluente para uma concentração de 1 mg/mL.

Composto	Efluente	Fracção Pequena	Fracção Média	Fracção Grande
Ácido Quínico (1) (µg/mg)	313	314	711	338
Ácido Gálico (2) (µg/mg)	9	20	4	-----
Ácido Elágico (5) (µg/mg)	6	-----	-----	9

Com base nos resultados obtidos da quantificação dos compostos maioritários por HPLC-DAD, verificou-se que o ácido Quínico é o composto maioritário no efluente da cortiça e nas suas fracções, devido à sua baixa absorvidade, ou seja, o pico do Quínico tem menor absorvidade aos diferentes comprimentos de onda quando comparado com os cromatogramas dos ácidos Gálico e Elágico.

3.3.5. Actividades Biológicas do efluente da cortiça e fracções

3.3.5.1. Actividade Antioxidante

Foram realizados ensaios de actividade antioxidante, de acordo com o método do DPPH descrito em 2.5.7, para as fracções recolhidas e para o efluente tendo-se obtido os resultados da Figura 3.15.

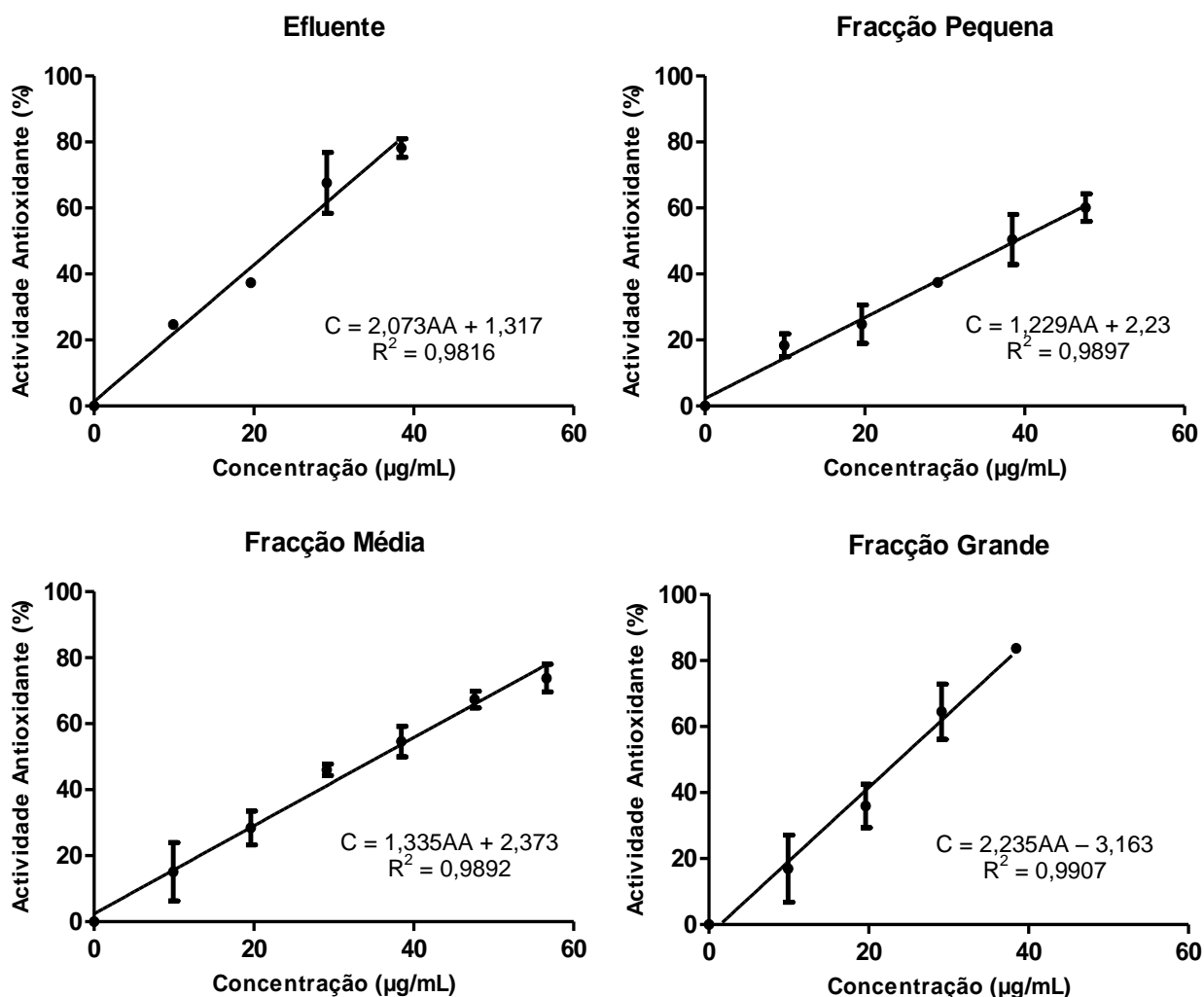


Figura 3.15 – Perfis antioxidantes para as fracções recolhidas e para o efluente, onde C representa a concentração em µg/mL e AA representa a actividade antioxidante em %.

Como se pode observar a actividade antioxidante aumentou de um modo dependente da dose para todas as fracções e para o efluente, obtendo-se coeficientes de correlação entre 0,9816 e 0,9907. Pela análise das figuras obtidas é possível observar que o efluente e a fracção Grande são as fracções que possuem uma melhor

actividade antioxidante, dado a diferença do declive das rectas para esses ensaios relativamente às restantes.

A partir das equações da rectas obtidas para cada ensaio, foi possível determinar o EC₅₀ para cada fracção (Tabela 3.15).

Tabela 3.15 – Determinação do EC₅₀ da Actividade Antioxidante de cada fracção.

	EC ₅₀ (µg/mL)
Efluente	23,48 ± 1,38
Fracção Pequena <3000 Da	38,87 ± 3,59
Fracção Média 3000 a 74000 Da	35,68 ± 2,84
Fracção Grande >74000 Da	23,79 ± 1,25

Com a determinação do EC₅₀ para as fracções recolhidas, concluiu-se o que já tinha sido referido anteriormente, que a fracção Grande e o Efluente são as que apresentam a melhor actividade antioxidante. Este facto pode ser justificado, não só pela maior presença de Fenóis e Taninos nestas fracções do que nas restantes (Figura 3.16), comprovando assim o potencial antioxidante conhecido por parte deste tipo de compostos, como também pela presença de ácidos urónicos detectados nestas fracções através da espectroscopia de FTIR (Figura 3.7) e/ou pela presença do ácido Elágico nestas fracções (Tabela 3.14).

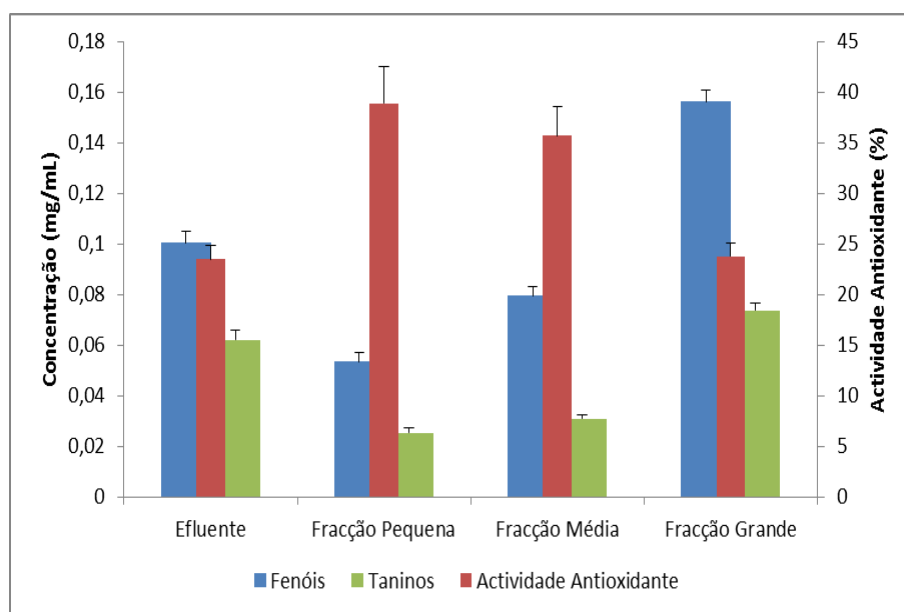


Figura 3.16 – Influência da quantidade de Fenóis e Taninos na Actividade Antioxidante de cada fracção e do efluente.

De modo a avaliar o efeito da presença dos compostos na actividade antioxidante exibida pelo efluente e fracções foram realizados ensaios de determinação da actividade antioxidante usando a mesma metodologia para os padrões comerciais. O EC₅₀ determinado para os padrões está representado na Tabela 3.16, no caso do ácido Quínico este apresentou um valor muito baixo de actividade antioxidante, não sendo possível determinar o seu EC₅₀. Para o ácido Quínico uma concentração de 1,5 mg/mL apresentou uma actividade antioxidante de 5,14% ± 2,95.

Tabela 3.16 – Determinação do EC₅₀ da Actividade Antioxidante de cada padrão.

	EC ₅₀ (µg/mL)
Ácido Gálico	0,54 ± 0,02
Ácido Elágico	1,84 ± 0,07

Para o efluente, o ácido Gálico justifica cerca de 39% da actividade antioxidante desta fracção, enquanto o ácido Elágico representa cerca de 8%. A restante actividade pode ser justificada por outros compostos presentes na fracção ou por um fenómeno de sinergismo, ou seja, o ácido Quínico apesar de ser um antioxidante fraco, como referido, na presença de outros compostos pode potenciar a actividade antioxidante dos mesmos e assim aumentar a actividade global da fracção. [66] À semelhança da fracção Grande em que o ácido Elágico representa apenas cerca de 12% da actividade total da fracção, e uma vez que não contém ácido Gálico a sua actividade antioxidante pode ser justificada pela presença do ácido Quínico pelas razões apresentadas anteriormente.

Nas fracções com menor actividade antioxidante, como a fracção Média, o ácido Gálico representa cerca de 26% da actividade da mesma, sendo que a presença de maior quantidade de ácido Quínico nesta fracção relativamente a todas as outras poderá justificar a actividade antioxidante da mesma. No caso da fracção Pequena o ácido Gálico aparentemente justifica aproximadamente toda a actividade da fracção e aqui a quantidade do Quínico é menor. Em ambas as fracções, Pequena e Média, foi verificado que não contêm ácido Elágico, mais concretamente a ausência do par Quínico/Elágico, que como referido anteriormente parece potenciar, no efluente e fracção Grande, o efeito antioxidante exibido por estas fracções.

3.3.5.2. Inibição da Peroxidação Lipídica

Foram realizados ensaios de inibição da peroxidação lipídica, de acordo com o método dos TBARS descrito em 2.5.8, para o efluente, para as fracções e para os padrões comerciais que representam os compostos maioritários, ácido Quínico, Gálico e Elágico.

Para os padrões os resultados são apresentados na Figura 3.17 para o ácido Gálico e ácido Elágico. O ácido Quínico registou uma baixa actividade de inibição da peroxidação lipídica e para uma concentração de 1,36 mg/mL obteve-se uma inibição de $39,81\% \pm 0,68$.

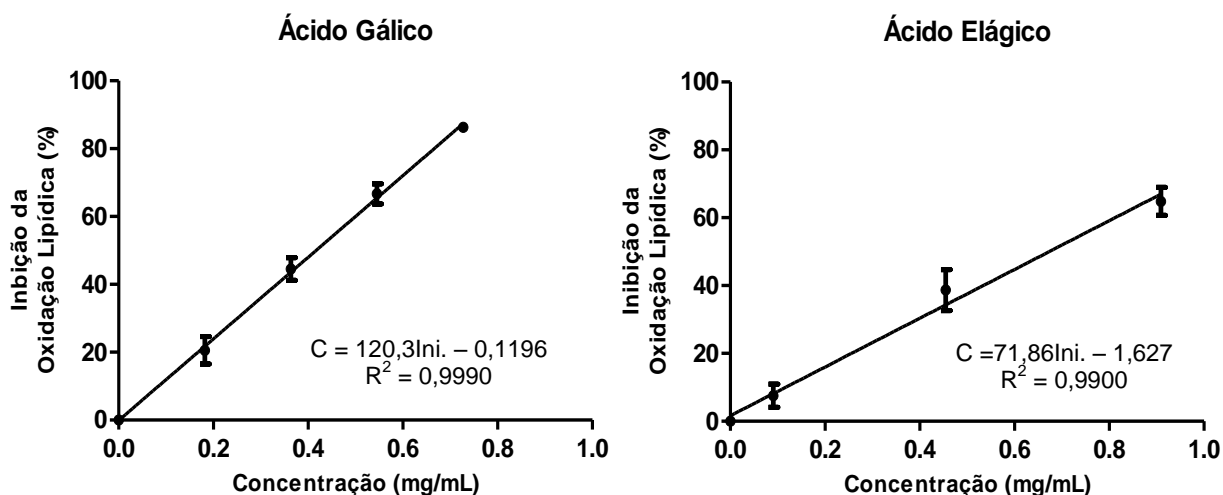


Figura 3.17 – Representação gráfica da Inibição da Oxidação Lipídica do ácido Gálico, Quínico e Elágico, em função da concentração, onde C representa a concentração em $\mu\text{g/mL}$ e Ini. representa a inibição da peroxidação lipídica em %.

Como se pode observar a inibição da peroxidação lipídica aumentou de um modo linear com o aumento da concentração para o ácido Gálico e Elágico, obtendo-se coeficientes de correlação de 0,999 e 0,99. Pela análise das figuras obtidas é possível observar que o ácido Gálico apresenta uma melhor inibição, dado a diferença do declive das rectas. A partir das equações da rectas obtidas para cada ensaio, foi possível determinar o EC_{50} para cada padrão (Tabela 3.17).

Tabela 3.17 – Determinação do EC₅₀ da inibição da oxidação lipídica de cada padrão.

	EC₅₀ (mg/mL)
Ácido Gálico	0,42 ± 0,02
Ácido Elágico	0,67 ± 0,05

Para o efluente e para as fracções os valores registados de inibição da peroxidação lipídica foram muito baixos e foram registadas várias interferências no método, possivelmente devido a interacções entre os açúcares presentes nas amostras e os reagentes utilizados no ensaio. ^[67]

3.3.6. Ensaios em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7

3.3.6.1. Determinação da Citotoxicidade

O efluente da cortiça e as diferentes fracções obtidas foram ainda estudados em linhas celulares humanas do cancro da mama de MCF-7 para avaliar o potencial citotóxico das mesmas (Figura 3.18), de acordo o método do MTT descrito em 2.6.1.

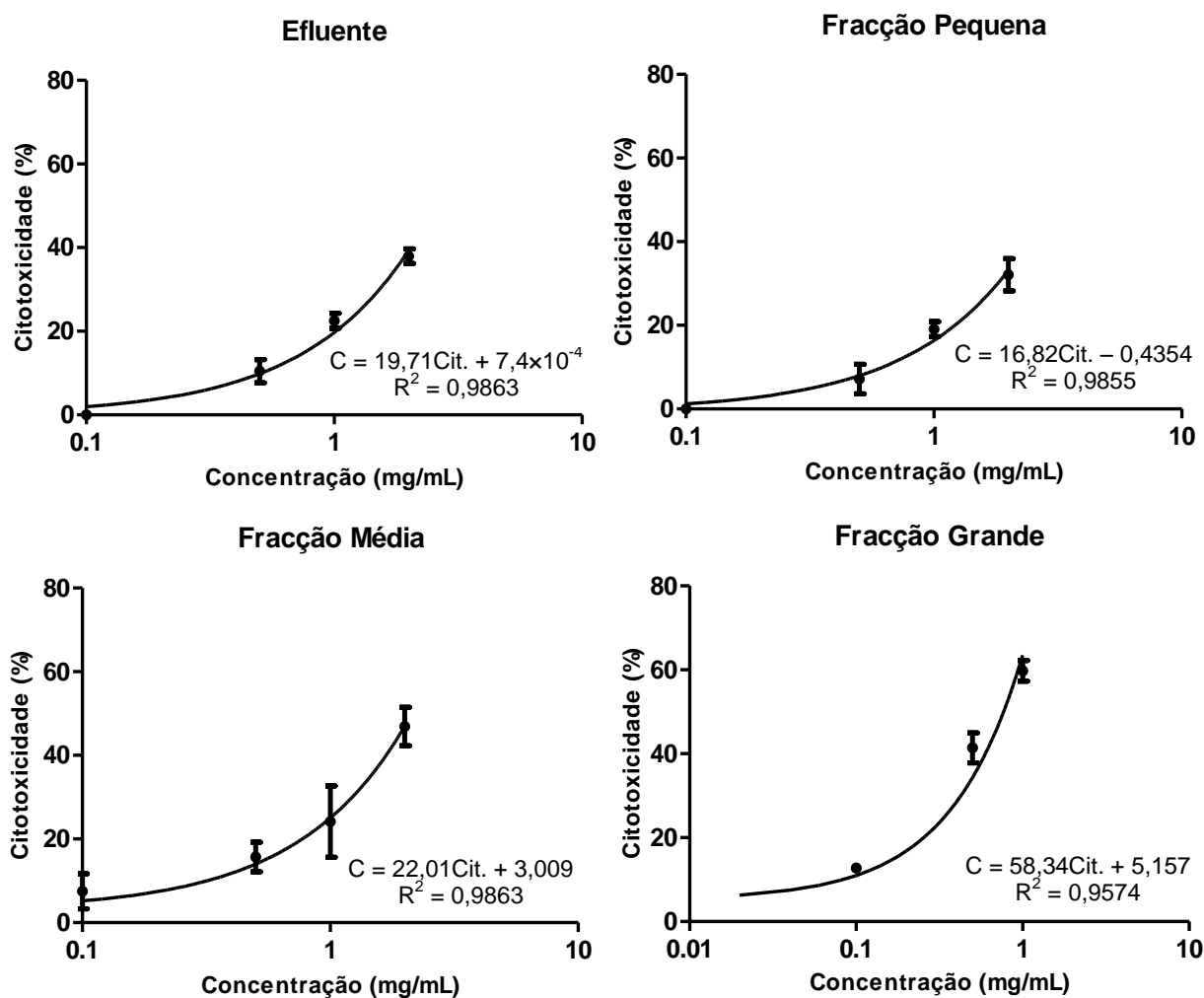


Figura 3.18 – Perfis citotóxicos em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7, para o efluente e para as fracções recolhidas, onde C representa a concentração em mg/mL e Cit. representa a citotoxicidade em %.

Como se pode observar na Figura 3.18 a citotoxicidade aumentou de um modo dependente da dose para todas as fracções e para o efluente, obtendo-se coeficientes de correlação entre 0,9574 e 0,9863. Pela análise das figuras obtidas é possível observar que a fracção Grande é a fracção que possui uma melhor actividade citotóxica, porque terá maior efeito citotóxico para concentrações inferiores.

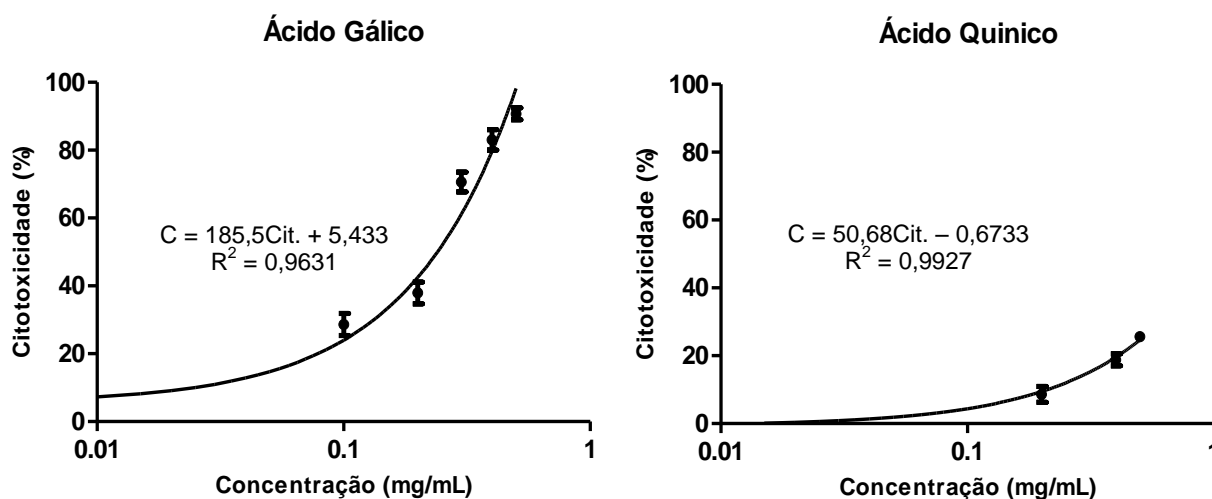
Com os resultados obtidos foi possível determinar o IC₅₀ para cada uma das fracções em estudo, tendo-se obtido os seguintes resultados (Tabela 3.18).

Tabela 3.18 – Determinação do IC₅₀ da Actividade Citotóxica de cada fracção a 24h.

	IC ₅₀ (mg/mL)
Efluente	>2
Fracção Pequena <3000 Da	>2
Fracção Média 3000 a 74000 Da	>2
Fracção Grande >74000 Da	0,78 ± 0,03

Analisando os resultados obtidos verificou-se que nenhuma das fracções apresenta valores relevantes de citotoxicidade, uma vez que concentrações superiores a 0,1 mg/mL são consideradas não tóxicas para células humanas [68,69], mesmo assim a fracção Grande é a que apresenta um valor de IC₅₀ inferior (0,78 mg/mL). Esta fracção, como mostrado na Tabela 3.14, é a que apresenta maior quantidade de ácido Elágico quando comparada com as outras fracções e com o próprio efluente da cortiça, o que pode indicar que a presença deste composto tem um efeito directo no aumento da toxicidade desta fracção.

Foram realizados ensaios usando a mesma metodologia para avaliar o potencial citotóxico dos padrões comerciais dos compostos presentes no efluente e fracções em estudo, nomeadamente o Ácido Gálico, o Quínico e o Elágico (Figura 3.19).



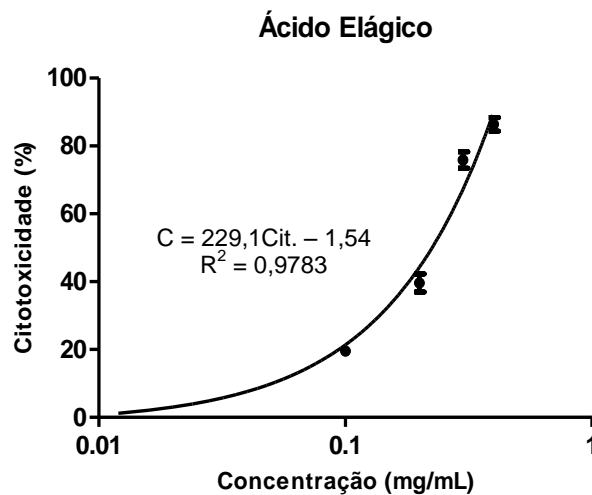


Figura 3.19 – Perfis citotóxicos em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7 para os padrões em estudo, onde C representa a concentração em mg/mL e Cit. representa a citotoxicidade em %.

Pela análise da Figura 3.19 verifica-se que a citotoxicidade aumenta com o aumento da concentração dos padrões, e para além disso, é possível desde já concluir que o ácido Quínico é o menos citotóxico dos compostos, obtendo-se coeficientes de correlação entre 0,9631 e 0,9927.

Através dos resultados obtidos foi possível determinar o IC₅₀ para cada dos padrões, tendo-se obtido os seguintes resultados (Tabela 3.19).

Tabela 3.19 – Determinação do IC₅₀ da Actividade Citotóxica em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7 de cada padrão.

	IC ₅₀ (mg/mL)
Ácido Quínico	>0,5
Ácido Gálico	0,24 ± 0,01
Ácido Elágico	0,22 ± 0,005

Os resultados obtidos para os padrões permitem afirmar que nenhum deles apresenta um nível de citotoxicidade relevante ^[68,69], e como referido anteriormente, o ácido Quínico é o menos citotóxico, enquanto o ácido Gálico e Elágico têm níveis de citotoxicidade idênticos. Dada a baixa citotoxicidade do ácido Quínico será a presença de maior quantidade de ácido Elágico na fracção Grande relativamente ao efluente

que poderá justificar o aumento da citotoxicidade desta fracção, como referido anteriormente.

Foi adicionalmente estudada a influência do tempo de exposição, durante 48 e 72 horas, das células humanas do cancro da mama MCF-7 ao efluente e às fracções, utilizando uma concentração de 2 mg/mL para o Efluente, fracções Pequena e Média, e uma concentração de 0,8 mg/mL para fracção Grande, e obteve-se os resultados da Tabela 3.20 que foram comparados com a citotoxicidade nas mesmas condições a 24h.

Tabela 3.20 – Determinação da Citotoxicidade em linhas celulares humanas de cancro da mama MCF-7 de cada fracção a 48 e 72h.

	Citotoxicidade a 24h (%)	Citotoxicidade a 48h (%)	Citotoxicidade a 72h (%)
Efluente	37,95 ± 1,72	91,75 ± 4,44	70,64 ± 14,11
Fracção Pequena <3000 Da	32,10 ± 3,88	0	0
Fracção Média 3000 a 74000 Da	46,92 ± 4,60	12,92 ± 7,63	94,47 ± 0,84
Fracção Grande >74000 Da	50	91,93 ± 3,60	84,61 ± 3,19

Como se pode observar os valores de citotoxicidade do efluente e da fracção Grande aumentam com o tempo de exposição. Para a fracção Pequena os valores de citotoxicidade diminuem com o tempo de exposição. A fracção Média apresentou valores incoerentes, e como tal sugere-se que o ensaio se deverá repetir antes de tirar alguma conclusão sobre o comportamento desta fracção. Ainda dada a limitação de tempo não foi possível realizar o mesmo tipo de estudo com os padrões comerciais.

De qualquer modo, para as concentrações de efluente, fracções e padrões utilizadas em contacto com a linha celular do cancro da mama MCF-7, os valores obtidos de citotoxicidade permitiram concluir que o efluente e as fracções não são tóxicas ^[68,69] e como tal apresentam potencial para poderem ser utilizadas como fontes seguras dos compostos fenólicos que contêm.

3.3.6.2. Inibição da Proliferação Celular

De modo a avaliar o potencial citostático do efluente e das fracções na inibição da proliferação da linha celular humana do cancro da mama MCF-7, foi realizado o crescimento das células em contacto com estes e avaliada a viabilidade celular pelo método do MTT após 72h de crescimento de acordo com o procedimento experimental descrito em 2.6.2. Os resultados obtidos apresentam-se na figura 3.20.

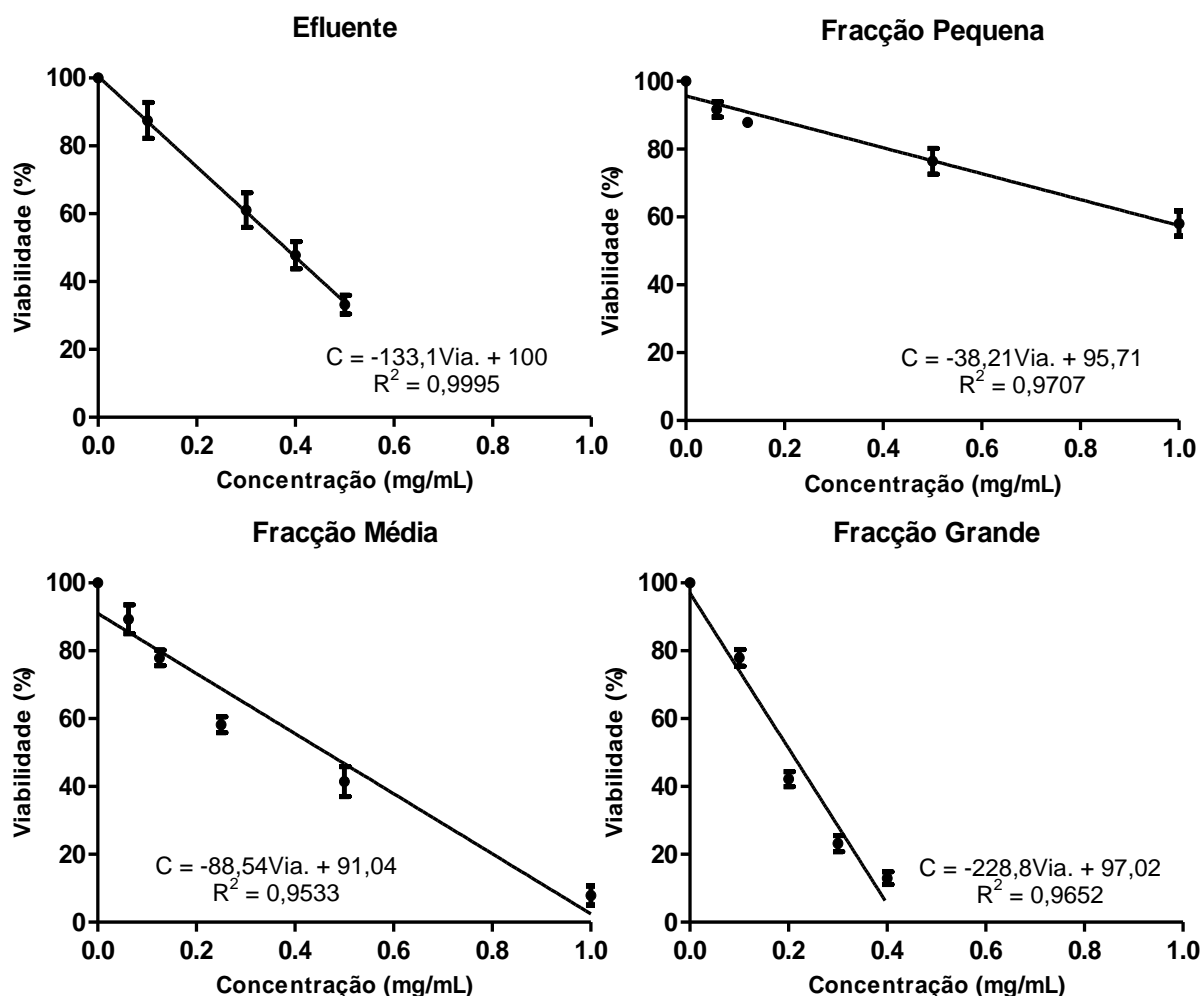


Figura 3.20 – Perfis da inibição da proliferação celular em linhas celulares humanas do cancro da mama MCF-7 para as fracções recolhidas e para o efluente, onde C representa a concentração em mg/mL e Via. representa a viabilidade celular em %.

Como se pode observar há um efeito na redução da proliferação celular a 72h com o aumento da concentração do efluente e das fracções, sendo evidente a redução da viabilidade das células da linha celular MCF-7 com o aumento da concentração, obtendo-se coeficientes de correlação entre 0,9533 e 0,9995. Para além disso foi

possível observar que a redução de viabilidade é mais acentuada na fracção Grande seguida do efluente, por comparação entre os declives obtidos para as fracções Média e Pequena.

Tal como anteriormente, determinou-se o IC₅₀ (que neste caso corresponde á concentração de amostra que apresenta 50% de viabilidade) para cada um dos ensaios, obtendo-se os resultados da Tabela 3.21.

Tabela 3.21 – Determinação do IC₅₀ da Inibição da Proliferação Celular em linhas celulares humanas de cancro da mama MCF-7 de cada fracção.

	IC ₅₀ (mg/mL)
Efluente	0,38 ± 0,02
Fracção Pequena <3000 Da	>1
Fracção Média 3000 a 74000 Da	0,46 ± 0,02
Fracção Grande >74000 Da	0,20 ± 0,003

É evidente que, o efluente e as fracções recolhidas têm maior efeito na redução da proliferação celular do que propriamente na morte das células, uma vez que os IC₅₀ determinados na tabela 3.21 são substancialmente inferiores aos obtidos para os ensaios de citotoxicidade (Tabela 3.18) e portanto os compostos presentes têm maior potencial de utilização como agentes citoestáticos.

Este tipo de compostos pode inibir a formação e crescimento de tumores por indução da paragem do ciclo celular e apoptose. As células malignas são caracterizadas por uma proliferação excessiva, incapacidade de realizar apoptose em condições normais, e um tempo de vida prolongado ou imortalizado. A regulação do ciclo celular é alterada nestas células, assim qualquer perturbação de proteínas específicas do ciclo celular por compostos fenólicos pode potencialmente afectar e/ou bloquear a proliferação contínua destas células cancerígenas. [23-26]

Diferentes autores verificaram que os polifenóis podem afectar o crescimento de células de cancro através da indução de apoptose em muitas linhas celulares, tais como o de hepatoma (HepG2), do cólon (SW620, HT-29, CaCo-2, e HCT-116), da próstata (DU-145 e LNCaP), do pulmão (A549), da mama (MCF-7), o melanoma (SK-MEL 28 e SK-MEL-1), o neuroblastoma (SH-SY5Y) e as células de leucemia HL-60. A indução de apoptose e/ou a inibição da proliferação por polifenóis foi relatada como

resultando de um certo número de mecanismos, incluindo indução da paragem do ciclo celular. ^[12,13,19]

Além disso, alguns estudos demonstraram que estes compostos exibem efeito diferencial em células cancerígenas comparativamente com as células normais. Por exemplo, um extracto rico em antocianina de Aronia tem a capacidade para induzir o bloqueio do ciclo celular em células HT-29 do cancro do cólon, mas não em células do cólon normais (NCW460). ^[23-26]

Em termos de inibição da proliferação celular, a fracção Grande foi a que apresentou o maior efeito citoestático devido á presença de maior quantidade de ácido Elágico nesta fracção relativamente às restantes e ao efluente da cortiça. Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que o ácido Elágico provoca efeitos anticancerígenos por inibição da proliferação de células tumorais. ^[70]

3.3.6.3. Análise preliminar do efeito da fracção Grande sobre as células por HPLC-DAD e SDS-PAGE

Devido a este potencial citostático exibido pela fracção Grande e de modo a compreender o seu efeito molecular nas células da linha celular do cancro da mama MCF-7, foi iniciado um estudo preliminar sobre o efeito no conteúdo intracelular e no conteúdo proteico das células quando em contacto com concentrações crescentes desta fracção, nomeadamente 0,05 mg/mL (IC_{10}), 0,2 mg/mL (IC_{50}) e 0,35 mg/mL (IC_{80}), em que o IC_{10} , o IC_{50} e o IC_{80} , correspondem à concentração de amostra que apresenta 10%, 50% e 80% de citotoxicidade, respectivamente.

Após 72 h de incubação das células com as concentrações crescentes da fracção Grande, o conteúdo intracelular das células viáveis foi analisado por HPLC-DAD de acordo com o procedimento descrito em 2.5.5. (Figura 3.21), e o sobrenadante com as células mortas em suspensão analisado por SDS-PAGE de acordo com o procedimento descrito em 2.6.3, com o objectivo de observar se alguns compostos da fracção Grande permeavam as células e qual o seu efeito na inibição do crescimento celular e nas respectivas proteínas.

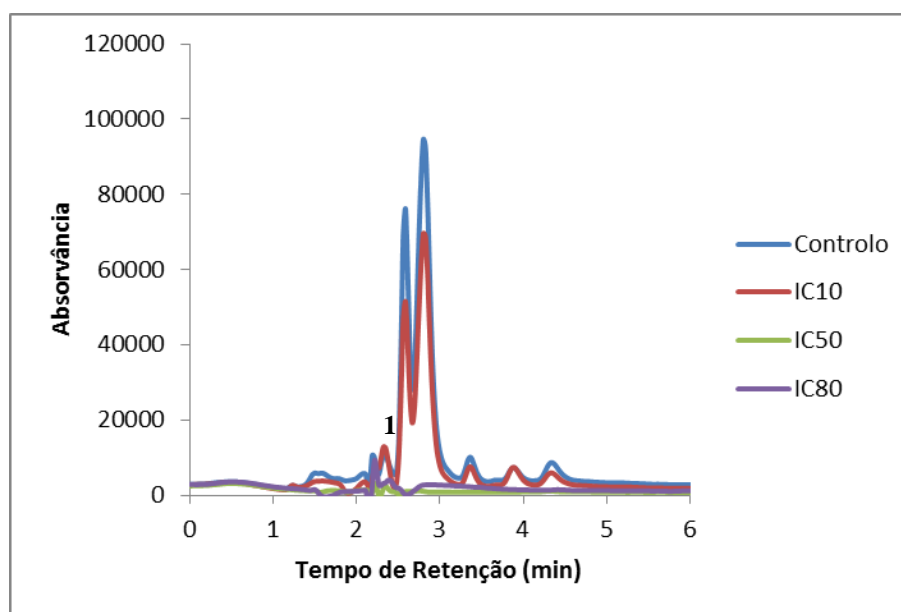


Figura 3.21 – Comparação dos cromatogramas das células removidas, de cada concentração da fracção Grande.

No caso do estudo por HPLC-DAD do conteúdo intracelular (Figura 3.21), verificou-se que nos ensaios do IC₅₀ e IC₈₀, a quantidade de células existentes para análise foi muito baixa devido ao efeito inibitório no crescimento celular e como tal os cromatogramas não apresentam picos evidentes. No caso do ensaio controlo em que as células estão em contacto com o meio de cultura e do ensaio com a fracção à concentração do IC₁₀, a quantidade analisada do conteúdo intracelular é praticamente idêntica com uma ligeira diminuição da intensidade dos picos obtidos no cromatograma do conteúdo com o IC₁₀, como seria de esperar, uma vez que a concentração de compostos aplicada nos poços do IC₁₀ foi muito reduzida e por esse motivo foi apenas reduzido o efeito no crescimento celular.

Para além disso, por comparação destes cromatogramas do conteúdo intracelular com o cromatograma da fracção Grande aos mesmos tempos de retenção (Figura 3.22), verificou-se que o ácido Quínico (1) se encontra presente no cromatograma das células em contacto com a concentração dos poços do IC₁₀, o que permite concluir que existiu permeabilidade das células ao ácido Quínico, o que seria de esperar sendo que este é o composto que se encontra em maior quantidade na fracção Grande.

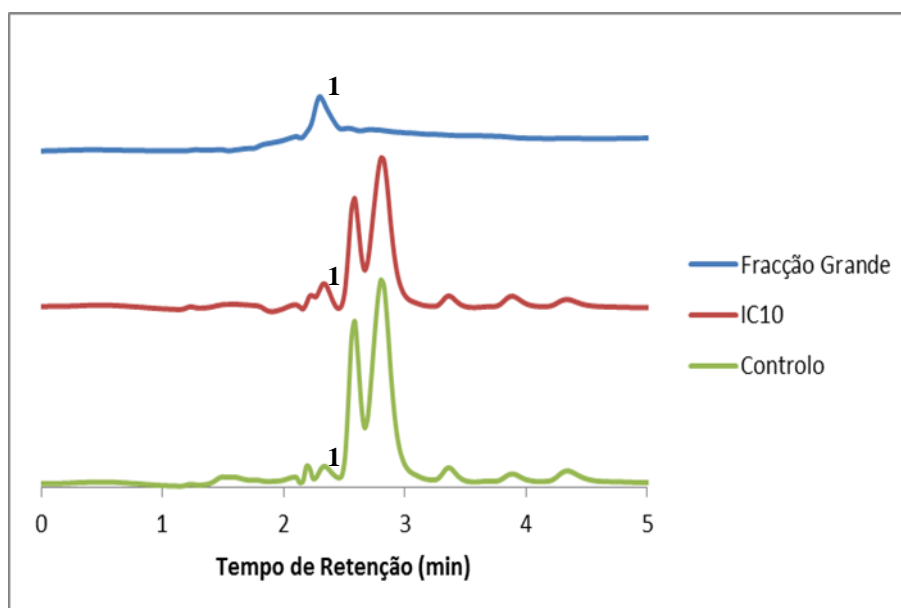


Figura 3.22 – Comparação dos cromatogramas das células removidas, de cada concentração da fracção Grande com a mesma, nos primeiros 5 minutos da cromatografia.

Por análise dos espectros de UV-vis do pico 1 (Figura 3.23) foi constatado que os espectros de UV-vis são idênticos para a fracção Grande, para as células do IC₁₀ e para a comparação com o espectro de UV-Vis do padrão de ácido Quínico, o que permite afirmar que é o mesmo composto. Em oposição nas células do controlo, ao mesmo tempo de retenção aparece um pico de intensidade inferior e cujo espectro é ligeiramente diferente como se constata na figura 3.23 e portanto não se trata do ácido Quínico.

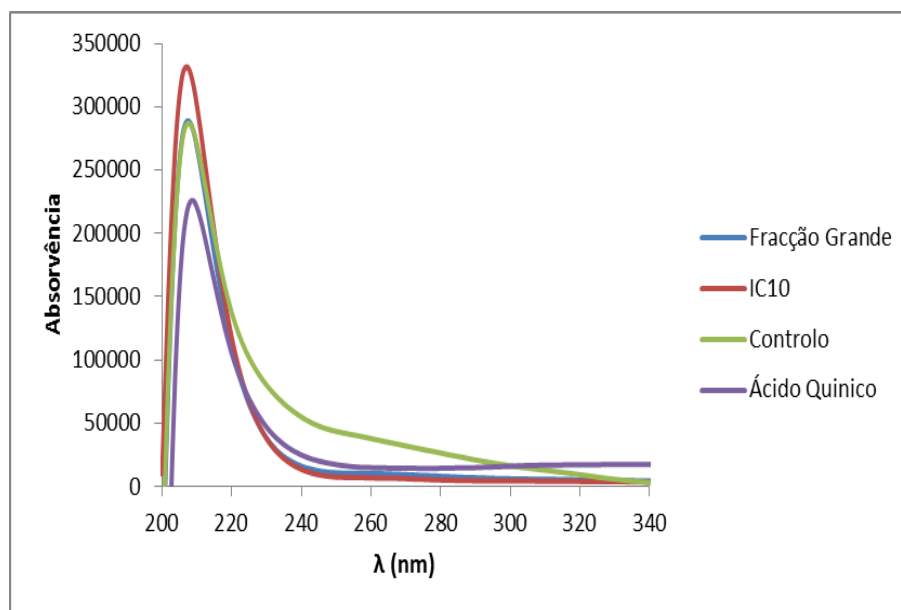


Figura 3.23 – Comparação dos espectros de UV-vis do pico 1 para a fracção Grande e para as células do controlo e do IC₁₀ com o padrão de ácido Quínico.

No caso dos sobrenadantes recolhidos (Figura 3.24), que são constituídos pelo meio de cultura, pela fracção que nele se encontra dissolvida (no caso do controlo não contém) e células não viáveis, verificou-se que não existem diferenças entre as concentrações em estudo e o controlo, o que indica que existem compostos no meio de cultura que por apresentarem o mesmo tempo de retenção dos compostos da fracção Grande se sobrepõem e interferem com a análise por esta metodologia e daí se ter recorrido à análise por SDS-PAGE.

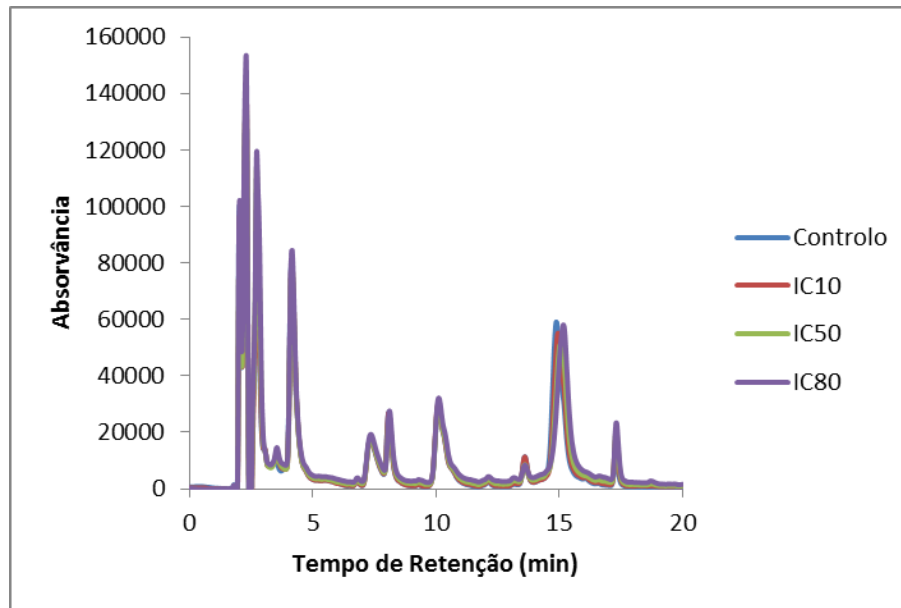


Figura 3.24 – Comparação dos cromatogramas dos sobrenadantes retirados de cada concentração da fracção Grande.

Analisou-se por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante (SDS-PAGE) o sobrenadante dos poços após 72 h de crescimento em contacto com concentrações crescentes da fracção Grande, com o objectivo de se observar diferenças nas proteínas expressas pelas células, em suspensão, que não eram viáveis. A Figura 3.25 representa os resultados obtidos onde o Meio representa o meio de cultura onde as células foram cultivadas, o SC representa o sobrenadante recolhido para os poços do controlo, o S10, S50 e S80 representam os sobrenadantes recolhidos dos poços em que a concentração da fracção Grande correspondia ao IC₁₀, IC₅₀ e IC₈₀, respectivamente, e o M representa o marcador utilizado no processo de Electroforese.

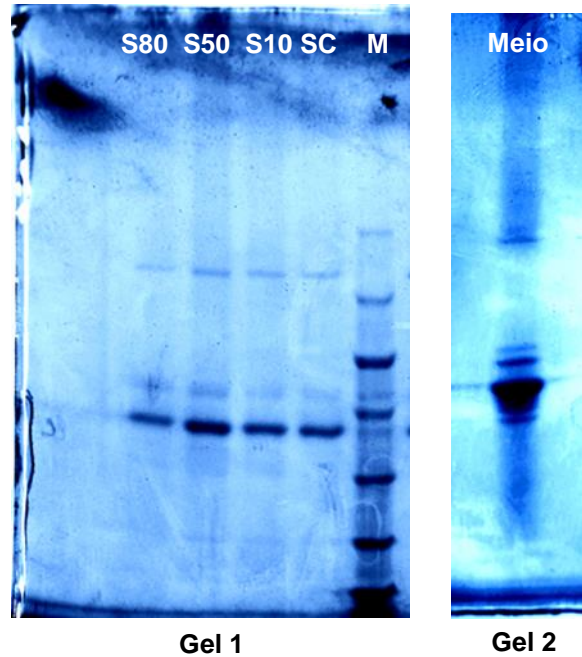


Figura 3.25 – Electroforese desnaturante SDS-Page, Gel 1: **S80** – Sobrenadante do IC80; **S50** – Sobrenadante do IC50; **S10** – Sobrenadante do IC10; **SC** – Sobrenadante do controlo; **M** – Marcador de peso molecular NZY Blue Protein Marker; Gel 2: **Meio** – Meio de cultura. 20 µg de todas as amostras.

Como se pode observar na Figura 3.25 há 3 bandas mais intensas que são comuns às células analisadas (poços SC, S₁₀, S₅₀ e S₈₀) e que não são coincidentes com as bandas das proteínas do meio de cultura (Meio) e que como tal correspondem às proteínas das células em estudo.

As intensidades destas 3 bandas são diferentes consoante as condições de crescimento a que as células foram sujeitas. Foi determinado a massa molecular relativa e a intensidade destas três bandas comuns às células sujeitas a diferentes condições de crescimento (Tabela 3.22). A massa molecular relativa foi calculada com base na curva de calibração das proteínas do marcador M (Anexo 6.3.1). As intensidades das bandas foram obtidas com recurso ao programa *Imagej*. O mesmo procedimento foi efectuado para a análise das proteínas do meio.

Tabela 3.22 – Peso molecular e respectivas intensidades das bandas presentes no gel de electroforese para os sobrenadantes recolhidos e meio de cultura.

Poço	Massa Molecular Relativa (kDa)	Intensidade da Banda
Controlo	55,79	9950,388
	70,10	3327,489
	114,98	4116,468
SC10	55,79	8558,974
	70,10	3039,225
	114,98	5579,338
SC50	55,79	16620,844
	70,10	1571,012
	114,98	7009,095
SC80	55,79	10469,640
	70,10	1537,912
	114,98	8124,401
Meio	45,20	333,355
	52,45	13365,844
	60,87	1728,083
	110,35	1401,459

Por análise dos valores da massa molecular relativa, confirmou-se a presença das mesmas bandas em todos os sobrenadantes estudados e o que claramente se verificou é que as proteínas com massa molecular relativa de 55,79 kDa e 114,98 kDa aumentaram a sua quantidade nas células não viáveis e as proteínas de 70,10 kDa diminuíram a sua quantidade nas células não viáveis com o aumento da concentração da fracção Grande (Figura 3.26).

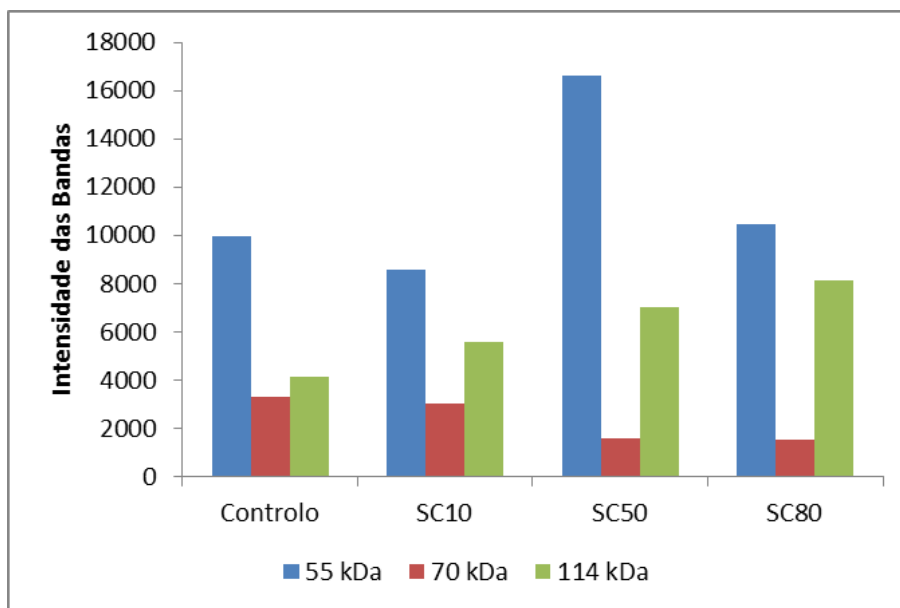


Figura 3. 26 – Comparação das intensidades das bandas obtidas no gel de electroforese para os sobrenadantes dos poços do controlo e das concentrações de IC10, IC50, IC80 da fracção Grande.

Tendo em conta que este estudo é apenas preliminar podemos estabelecer uma hipótese breve sobre as proteínas que estão envolvidas com base nos mecanismos de regulação do ciclo celular e com base na presença do ácido Elágico na fracção Grande e que tem, como referido, um potencial citoestático.

De acordo com a bibliografia o ácido Elágico foi reportado como indutor da expressão da proteína p53 induzindo a paragem do ciclo celular na fase G1 em células T24 do cancro humano da bexiga. ^[71] Como referido anteriormente há inúmeros estudos que reportam o papel dos compostos fenólicos indutores da paragem do ciclo celular. ^[12,13,19] Sendo a proteína p53, uma proteína supressora de tumores, com 53 kDa, a principal deste tipo de proteínas, conhecida pelo seu importante papel no controlo da paragem do ciclo celular, ^[71] não seria de estranhar que nas células sujeitas ao contacto com a fracção Grande rica em compostos fenólicos e contendo ácido Elágico tenha ocorrido um ligeiro aumento da quantidade desta proteína levando à paragem do ciclo celular tornando a células incapazes de se dividir, aqui representada a 55,79 kDa dadas as aproximações, apesar deste aumento não ser muito regular (Figura 3.26, barra azul).

Muitos dados sugerem o envolvimento da proteína de 70 kDa cinase ribossomal S6 (p70S6K) no cancro da mama. Esta proteína desempenha um papel importante no crescimento celular, proliferação ^[72] e tem sido constatado que há um

aumento da sua expressão nas linhas celulares do cancro da mama.^[73] De modo que a p70S6K tem sido considerada como um novo alvo terapêutico para o desenvolvimento de fármacos.^[74]

Neste caso, os estudos aqui realizados com a fracção Grande em contacto com as células MCF-7 do cancro da mama demonstraram que a quantidade desta proteína diminuiu com o aumento da concentração da fracção e que este efeito era tanto maior a concentração da fracção o que tornou as células não viáveis (Figura 3.26, barra vermelha). Está reportado um estudo muito recente na bibliografia que estuda o efeito da exposição a compostos fenólicos da manga na supressão do cancro da mama e onde foi detectada uma diminuição da expressão desta proteína,^[75] o que poderá ir de encontro a estes resultados do estudo preliminar efectuado.

A perda de função da proteína pRb, cuja massa molecular relativa oscila entre 105-115 KDa^[76] pode ser associada a mutações no seu gene o que diminui a sua expressão em tumores humanos.^[77] Dado o seu importante papel na regulação da divisão celular, a inactivação da via de controlo da pRb pode resultar em crescimento descontrolado que está associado a alguns tipos de cancro,^[78] nomeadamente algumas das formas mais agressivas do cancro de mama têm uma expressão reduzida de pRb.^[79] Nos resultados encontrados (Figura 3.26, barra verde) foi verificado que nas células sujeitas ao contacto com doses crescentes da fracção Grande, rica em compostos fenólicos e contendo ácido Elágico, ocorreu um aumento da quantidade de uma proteína com aproximadamente a mesma massa molecular que a pRb de 114,98 kDa o que não permitiu que as células de MCF-7 proliferassem.

No entanto, só com base em estudos mais aprofundados com recurso a Western blotting e a electroforese 2D poderiam confirmar os resultados encontrados.

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

Com este trabalho foi possível o fraccionamento do efluente do processamento da cortiça, utilizando membranas de ultrafiltração, e o estudo das fracções recuperadas quer em termos da sua caracterização quer da sua actividade biológica.

Em primeiro lugar, realizou-se o fraccionamento do efluente utilizando membranas de ultrafiltração com limites de exclusão moleculares distintos. Obtiveram-se três fracções, as quais foram denominadas de Pequena, Média e Grande, e para cada uma delas observou-se um decréscimo na carga orgânica total comparativamente com a alimentação. O efluente da cortiça apresentou uma carga orgânica de aproximadamente 2259 ppm, enquanto que as fracções Pequena, Média e Grande tinham valores de 352, 427 e 1602 ppm, respectivamente, o que permitiu concluir que o processo de membranas é eficaz no tratamento do efluente.

Em segundo lugar, as fracções foram caracterizadas em termos de Fenóis totais, Taninos e Açúcares redutores, sendo que a fracção Grande mostrou ser a fracção com maior quantidade destas famílias de compostos, justificando assim o valor superior relativamente às outras fracções, de carga orgânica total obtido anteriormente. Alguns destes compostos presentes nas fracções e no efluente foram identificados através de uma técnica de LC-MS, sendo que o maioritário para todas as fracções é o ácido Quínico. A fracção Pequena e Média apresentam quantidades idênticas de ácido Quínico e Gálico, enquanto o ácido Elágico apenas é observado no efluente e na fracção Grande.

Por último, estudou-se a actividade biológica das fracções recuperadas podendo-se concluir que a fracção Grande é a que apresenta maior potencial, quer a nível antioxidante (EC_{50} de 23,78 $\mu\text{g/mL}$) quer a nível citotóxico e citoestático (IC_{50} de 0,78 e 0,20 mg/mL , respectivamente). Os valores de EC_{50} estão relacionados com a presença do ácido Elágico na fracção mas também a um efeito de sinergismo existente entre o par ácido Quínico/Elágico, que parece potenciar o efeito antioxidante da fracção Grande. Relativamente aos valores de IC_{50} obtidos para a citotoxicidade e para a inibição da proliferação celular obtidos para a fracção Grande, prendem-se com a presença de uma maior quantidade de ácido Elágico nesta fracção que nas restantes. Para além disso, os resultados de citotoxicidade obtidos para o efluente e respectivas fracções permite concluir que nenhum é tóxico para células humanas e como tal apresentam potencial para poderem ser utilizadas como fontes seguras dos compostos fenólicos que contêm.

Realizaram-se ainda estudos preliminares do efeito das fracções na proteínas das células do cancro da mama MCF-7, onde ainda não foi possível chegar a resultados conclusivos sobre o mesmo, apesar de haver alterações na quantidade de algumas proteínas indicando um possível efeito citoestático por parte da fracção Grande. Por HPLC-DAD, observou-se que os compostos presentes nas fracções, em particular o ácido Quínico por ser o maioritário, se encontravam no interior das células.

A realização deste trabalho permitiu não só a redução da carga orgânica no efluente da cortiça como também a valorização dos compostos presentes no mesmo, e isto é algo que distingue e traz vantagens à utilização dos processos de membranas comparativamente aos outros métodos de tratamento de efluentes industriais.

Para dar continuidade a este trabalho seria interessante prosseguir e aprofundar o estudo do efeito das fracções nas células cancerígenas e nas suas proteínas, através de técnicas como o Western blotting e a electroforese 2D, e alargar esse estudo aos padrões comerciais utilizados neste trabalho.

Outra possibilidade é a preparação de membranas com limites de exclusão moleculares intermédios, de forma a obter mais fracções do efluente com o objectivo de melhorar as actividades biológicas apresentadas neste trabalho, e estudar o efeito sinérgico Quínico/Elágico proposto.

Por fim, e dados os bons resultados de actividade antioxidante, e a ausência de citotoxicidade apresentados por parte da fracção Grande, seria interessante a preparação de um creme para aplicação cutânea, uma vez que os compostos antioxidantes eliminam os radicais livres e protegem a pele das agressões diárias como o stress, poluição, raios UV, entre outros.

5. Referências Bibliográficas

- [1] - Sierra-Pérez, J., Boschmonart-Rives, J., Gabarrell, X. (2015). Production and trade analysis in the Iberian cork sector: Economic characterization of a forest industry. *Resources, Conservation and Recycling*, 98, pp.55-66.
- [2] – APCOR (2016). Acedido em 24 de Agosto de 2016, em <http://www.apcor.pt>.
- [3] – Amorim (2016). Acedido em 24 de Agosto de 2016, em <http://www.amorim.pt>.
- [4] - Silva, S., Sabino, M., Fernandes, E., Correlo, V., Boesel, L., Reis, R. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50(6), pp.345-365.
- [5] - Pereira, H. (1988). Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L. *Wood Sci.Technol.*, 22(3), pp.211-218.
- [6] - Mano, J. (2002). The viscoelastic properties of cork. *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE*, 37, pp.257-263.
- [7] - Bernards, M. (2002). Demystifying suberin. *Can. J. Bot.*, 80(3), pp.227-240.
- [8] - Marques, A., Pereira, H., Meier, D., Faix, O. (1994). Quantitative Analysis of Cork (*Quercus suber* L.) and Milled Cork Lignin by FTIR Spectroscopy, Analytical Pyrolysis, and Total Hydrolysis. *Holzforschung*, 48(s1), pp.43-50.
- [9] - Marques, A., Pereira, H., Meier, D., Faix, O. (1996). Isolation and Characterization of a Guaiacyl Lignin from Saponified Cork of *Quercus suber* L. *Holzforschung*, 50(5), pp.393-400.
- [10] - Marques, A., Pereira, H., Meier, D., Faix, O. (1999). Structural Characterization of Cork Lignin by Thioacidolysis and Permanganate Oxidation. *Holzforschung*, 53(2).
- [11] - Irchhaiya, R., Kumar, A., yadav, A., Gupta, N., Kumar, S., Gupta, N., Kumar, S., Yadav, V., Prakash, A., Gurjar, H. (2014). Metabolites in Plants and its Classification. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, pp.287-305.
- [12] - Kabera, J., Semana, E., Mussa, A., He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, pp.377-392.

- [13] - Roleira, F., Tavares-da-Silva, E., Varela, C., Costa, S., Silva, T., Garrido, J., Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*, 183, pp.235-258.
- [14] - Minhalma, M. (2001). Tannic-membrane interactions on ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 22-23(1-2), pp.479-488.
- [15] - Okuda, T., Ito, H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 16(12), pp.2191-2217.
- [16] - Haslam, E. (1996). Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J. Nat. Prod.*, 59(2), pp.205-215.
- [17] - Moure, A., Cruz, J., Franco, D., Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M., Parajó, J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), pp.145-171.
- [18] - Dai, J., Mumper, R. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), pp.7313-7352.
- [19] - Battestin, V., Katsumi Matsuda, L., Alves Macedo, G. (2004). FONTES E APLICAÇÕES DE TANINOS E TANASES EM ALIMENTOS. *Alim. Nutr.*, 15(1), pp.63-72.
- [20] - Fernandes, A., Fernandes, I., Cruz, L., Mateus, N., Cabral, M., de Freitas, V. (2009). Antioxidant and Biological Properties of Bioactive Phenolic Compounds from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food Chem.*, 57(23), pp.11154-11160.
- [21] - Azevedo, J., Fernandes, I., Lopes, P., Roseira, I., Cabral, M., Mateus, N., Freitas, V. (2014). Migration of phenolic compounds from different cork stoppers to wine model solutions: antioxidant and biological relevance. *Eur Food Res Technol*, 239(6), pp.951-960.
- [22] - Stanković, M. (2011). Total Phenolic content, Flavonoid concentration and Antioxidant Activity of *Marrubium peregrinum* L. Extracts. *Kragujevac Journal of Science*, 33, pp.63-72.

- [23] - Sousa, C., Silva, H., Vieira-Jr., G., Ayres, M., Costa, C., Araújo, D., Cavalcante, L., Barros, E., Araújo, P., Brandão, M., Chaves, M. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30(2), pp.351-355.
- [24] - Ismail, T., Calcabrini, C., Diaz, A., Fimognari, C., Turrini, E., Catanzaro, E., Akhtar, S., Sestili, P. (2016). Ellagitannins in Cancer Chemoprevention and Therapy. *Toxins*, 8(5), p.151.
- [25] - Bejarano, I., Godoy-Cancho, B., Franco, L., Martínez-Cañas, M., Tormo, M. (2015). Quercus Suber L. Cork Extracts Induce Apoptosis in Human Myeloid Leukaemia HL-60 Cells. *Phytother. Res.*, 29(8), pp.1180-1187.
- [26] - Hu, M. (2011). Dietary Polyphenols as Antioxidants and Anticancer Agents: More Questions than Answers. *Chang Gung Med J*, 34(5), pp.449-460.
- [27] - Wang, N., Wang, Z., Mo, S., Loo, T., Wang, D., Luo, H., Yang, D., Chen, Y., Shen, J., Chen, J. (2012). Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 134(3), pp.943-955.
- [28] – Stephens, F., Aigner, K. (2009). *Basics of oncology*. Berlin: Springer-Verlag.
- [29] – Cassidy, J., Bissett, D., Obe, R. (2002). *Oxford Handbook of Oncology*. Nova lorque: Oxford University Press Inc.
- [30] – Organização Mundial de Saúde (2016). Acedido a 26 de Setembro de 2016, em <http://www.who.int/cancer/>
- [31] – Liga contra o Cancro (2016). Acedido em 9 de Setembro de 2016, em <http://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama/>
- [32] – Lee, A., Oesterreich, S., Davidson, N. (2015). MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 107(7).
- [33] – Aakvaag, A., Utaaker, E., Thorsen, T., Lea, O., Lahooti, H. (1990). Growth Control of Human Mammary Cancer Cells (MCF-7 Cells) in Culture: Effect of Estradiol and Growth Factors in Serum-containing Medium. *Cancer Research*, 50, pp.7806-7810.
- [34] – Levenson, A., Jordan, V. (1997). MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line'. *Cancer Research*, 57, pp.3071-3078.

- [35] – ATCC (2016). Acedido em 11 de Setembro de 2016, em <http://www.atcc.com>.
- [36] - Bernardo, M. (2010). Fraccionamento do Efluente da Indústria da Cortiça por Ultra-Nanofiltração: Caracterização e Estudo da sua Biodegradabilidade. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
- [37] - Bernardo, M., Santos, A., Cantinho, P., Minhalma, M. (2011). Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: A biodegradation and valorisation study. *Water Research*, 45(2), pp.904-912.
- [38] - Santos, A., Bernardo, M., Vespeira, C., Cantinho, P., Minhalma, M. (2012). Cork industry wastewater characterization: assessment of the biodegradability, reuse and of the relationship between BOD, COD and tannins with TOC. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 2(1), p.33.
- [39] - Humphrey, J., Keller, G. (1997). *Separation process technology*. New York: McGraw-Hill.
- [40] - Seader, J., Henley, E. (1998). *Separation process principles*. New York: Wiley.
- [41] - Long, R. (1995). *Separation processes in waste minimization*. New York: M. Dekker.
- [42] - Baker, R. (2004). *Membrane technology and applications*. Chichester: J. Wiley.
- [43] - Nunes, S., Peinemann, K. (2001). *Membrane technology in the chemical industry*. Weinheim: Wiley-VCH.
- [44] - Osada, Y., Nakagawa, T. (1992). *Membrane science and technology*. New York: M. Dekker.
- [45] - Lima, N. (2003). *Biotecnologia*. Lisboa: Lidel.
- [46] - Mulder, M. (1996). *Basic principles of membrane technology*. Dordrecht: Kluwer Academic.
- [47] - Bernardo, M., Santos, A., Cantinho, P., Minhalma, M. (2011). Biodegradation rate constants in different NF/UF fractions of cork processing wastewaters. *Desalination and Water Treatment*, 29(1-3), pp.264-270.
- [48] - Wang, L., Yang, Z., Wang, L., Zhu, R. (2014). Minimizing the operation time for continuous feed diafiltration processes under constant concentration ratio. *Desalination*, 346, pp.100-106.

- [49] - Wang, L., Wang, L., Xing, W., Xu, N. (2014). Time-optimal diafiltration processes for Cephalosporin C separated from fermentation broth under constant yield and constant concentration. *Separation and Purification Technology*, 122, pp.256-261.
- [50] - Xu, Y., Hu, X., Tang, P., Jiang, Y., Yuan, H., Du, Q., Yin, J. (2015). The major factors influencing the formation of sediments in reconstituted green tea infusion. *Food Chemistry*, 172, pp.831-835.
- [51] - Falé, P., Ferreira, C., Rodrigues, A., Cleto, P., Madeira, P., Florêncio, M., Frazão, F., Serralheiro, M. (2013). Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion. *J. Med. Plants Res.*, 7(20), pp.1370-1378.
- [52] - Alam, M., Bristi, N., Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), pp.143-152.
- [53] - Devasagayam, T., Boloor, K., Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 40, pp.300-308.
- [54] – Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), pp.55-63.
- [55] - da Costa, Â. (2013). Avaliação da citotoxicidade de diferentes nanotransportadores sem substância ativa em função da sua densidade populacional. Tese de Mestrado. Escola Superior de Tecnologia e Gestão Instituto Politécnico de Bragança.
- [56] - Cattaneo, L., Cicconi, R., Mignogna, G., Giorgi, A., Mattei, M., Graziani, G., Ferracane, R., Grosso, A., Aducci, P., Schininà, M., Marra, M. (2015). Anti-Proliferative Effect of *Rosmarinus officinalis* L. Extract on Human Melanoma A375 Cells. *PLOS ONE*, 10(7), p.e0132439.
- [57] – Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248-254.
- [58] – GE Healthcare Life Sciences, Amersham™ ECL™ Gel and Gel Box User Manual, 2011.

- [59] – Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Chichester, Eng.: J. Wiley.
- [60] – Ge, Q., Zhang, A., Sun, P. (2009). Purification and structural elucidation of a novel fucoglucan from the fruiting bodies of *Phellinus baumii* Pilát. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(2), pp.343-348.
- [61] – Silva, S., Feliciano, R., Boas, L., Bronze, M. (2014). Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 150, pp.489-493.
- [62] – Zhu, B., Li, J., He, Y., Yamane, H., Kimura, Y., Nishida, H., Inoue, Y. (2004). Effect of steric hindrance on hydrogen-bonding interaction between polyesters and natural polyphenol catechin. *Journal of Applied Polymer Science*, 91(6), pp.3565-3573.
- [63] – Kim, G. (2003). Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng. *Bioresource Technology*, 89(1), pp.81-87.
- [64] – Melniciuc Puica, N., Pui, A., Florescu, M. (2006). FTIR Spectroscopy for the analysis of vegetable tanned ancient leather. *European Journal of Science and Theology*, 2(4), pp.49-53.
- [65] - Fernandes, A., Sousa, A., Mateus, N., Cabral, M., de Freitas, V. (2011). Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC–DAD/ESI–MS. *Food Chemistry*, 125(4), pp.1398-1405.
- [66] - Soares, S. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, pp.71-81.
- [67] - Díaz, P., Linares, M., Egea, M., Auqui, S., Garrido, M. (2014). TBARs distillation method: Revision to minimize the interference from yellow pigments in meat products. *Meat Science*, 98(4), pp.569-573.
- [68] – Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103(3), pp.839-846.
- [69] - Oonsivilai, R., Ferruzzi, M., Ningsanond, S. (2008). Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 1, pp.116-128.

- [70] – Zhang, Hong-Mei et al (2014). “Research Progress on the Anticarcinogenic Actions and Mechanisms of Ellagic Acid.” *Cancer Biology & Medicine* 11(2) pp. 92–100.
- [71] - Li, T., Chen, G., Su, C., Lin, J., Yeh, C., Cheng, K., Chung, J. (2016). Ellagic Acid Induced p53/p21 Expression, G1 Arrest and Apoptosis in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Anticancer Research*, 25, pp.971-980.
- [72] - Segatto, I., Berton, S., Sonogo, M., Massarut, S., Fabris, L., Armenia, J., Mileto, M., Colombatti, A., Vecchione, A., Baldassarre, G., Belletti, B. (2014). p70S6 kinase mediates breast cancer cell survival in response to surgical wound fluid stimulation. *Molecular Oncology*, 8(3), pp.766-780.
- [73] – Couch, F., Wang, X., Wu, G., Qian, J., Jenkins, R., James, C. (1999). Localization of PS6K to Chromosomal Region 17q23 and Determination of Its Amplification in Breast Cancer. *Cancer Research*, 59, pp.1408-1411.
- [74] – Bahrami-B, F., Ataie-Kachoie, P., Pourgholami, M., Morris, D. (2014). p70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): an update. *Journal of Clinical Pathology*, 67(12), pp.1019-1025.
- [75] – Nemeč, M., Kim, H., Marciante, A., Barnes, R., Talcott, S., Mertens-Talcott, S. (2016). Pyrogallol, an absorbable microbial gallotannins-metabolite and mango polyphenols (*Mangifera Indica* L.) suppress breast cancer ductal carcinoma in situ proliferation in vitro. *Food Funct.*, 7(9), pp.3825-3833.
- [76] – El-Deiry, W. (2003). *Tumor suppressor genes*. Totowa, N.J.: Humana Press.
- [77] – Corte, R., Dunn, M., Chatterjee, S., Stein, J., Shi, S., Tran, Q., Hu, S., Xu, H., Groshen, S., Taylor, C., Skinner, D., Benedict, W. (1998). Elevated and Absent pRb Expression is Associated With Bladder Cancer Progression and has Cooperative Effects With p53. *The Journal of Urology*, pp.1936-1937.
- [78] – Suh, Y., Amelio, I., Guerrero Urbano, T., Tavassoli, M. (2014). Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis*, 5(1), p.e1018.
- [79] – Ceccarelli, C., Santini, D., Chieco, P., Taffurelli, M., Gamberini, M., Pileri, S., Marrano, D. (1998). Retinoblastoma (RB1) gene product expression in breast carcinoma. Correlation with Ki-67 growth fraction and biopathological profile. *Journal of Clinical Pathology*, 51(11), pp.818-824.

6. Anexos

6.1. Caracterização das Membranas

6.1.1. Determinação da rejeição a sais mono e bivalentes

Tabela 6.1 – Valores experimentais de massa de água recolhida, tempo de ensaio e temperatura. Caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para a membrana CA₁.

Amostra	NaCl	Na₂SO₄
Pressão (bar)	3	3
Peso Vazio (g)	153,69	133,80
Peso Cheio (g)	242,33	203,05
Peso (g)	88,64	69,25
Tempo (min)	25	25
Q (kg/h)	0,21	0,17
Jp (kg/h/m ²)	7,20	5,62
T (°C)	31,5	28,5
Jp 25 °C (kg/h/m ²)	6,22	5,19

Tabela 6.2 – Valores experimentais de massa de água recolhida, tempo de ensaio e temperatura. Caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para a membrana CA₄.

Amostra	NaCl	Na₂SO₄
Pressão (bar)	1	1
Peso Vazio (g)	153,69	141,41
Peso Cheio (g)	263,58	255,65
Peso (g)	109,89	114,24
Tempo (min)	3	3
Q (kg/h)	2,20	2,29
Jp (kg/h/m ²)	74,33	77,27
T (°C)	17,5	17,8
Jp 25 °C (kg/h/m ²)	88,70	91,55

Tabela 6.3 – Condutividade e concentrações das soluções de Alimentação (A) e Permeado (P) para as membranas CA₁ e CA₄.

Membrana	Amostra	NaCl	Na ₂ SO ₄
CA ₁	Condutividade A (μS/cm)	1027	818
	Condutividade P (μS/cm)	904	419
	Concentração A (ppm)	505,28	504,95
	Concentração P (ppm)	444,77	258,65
CA ₄	Condutividade A (μS/cm)	1091	878
	Condutividade P (μS/cm)	1086	845
	Concentração A (ppm)	536,77	541,99
	Concentração P (ppm)	534,31	521,62

6.1.2. Determinação da rejeição das membranas a solutos orgânicos

Tabela 6.4 – Valores experimentais de massa de água recolhida, tempo de ensaio e temperatura. Caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para a membrana CA₁.

Amostra	PEG 3000	PEG 6000	PEG 10000
Pressão (bar)	3	3	3
Peso Vazio (g)	121,28	140,12	128,49
Peso Cheio (g)	177,71	196,92	188,92
Peso (g)	56,42	56,80	60,43
Tempo (min)	20	20	20
Q (kg/h)	0,17	0,17	0,18
Jp (kg/h/m ²)	5,73	5,76	6,13
T (°C)	22	22	22
Jp 25 °C (kg/h/m ²)	6,14	6,18	6,57

Tabela 6.5 – Valores experimentais de massa de água recolhida, tempo de ensaio e temperatura. Caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para a membrana CA₄.

Amostra	PEG 20000	Dextran 40000	Dextran 70000
Pressão (bar)	1	1	1
Peso Vazio (g)	129,27	133,76	128,43
Peso Cheio (g)	230,42	218,93	215,73
Peso (g)	101,15	85,17	87,3
Tempo (min)	3	3	3
Q (kg/h)	2,02	1,70	1,75
Jp (kg/h/m ²)	68,42	57,61	59,05
T (°C)	17,8	17,2	17,9
Jp 25 °C (kg/h/m ²)	81,06	69,25	69,79

Tabela 6.6 – Carga Orgânica Total (COT) das soluções de Alimentação (A) e Permeado (P) para as membranas CA₁.

Amostra	PEG 3000	PEG 6000	PEG 10000
COT A (ppm)	291,21	272,00	308,66
COT P (ppm)	37,67	16,69	12,44
COT A corrigido (ppm)	282,27	263,06	299,72
COT P corrigido (ppm)	28,73	7,75	3,49

Tabela 6.7 – Carga Orgânica Total (COT) das soluções de Alimentação (A) e Permeado (P) para as membranas CA₄.

Amostra	PEG 20000	Dextran 40000	Dextran 70000
COT A (ppm)	372,38	265,01	235,75
COT P (ppm)	251,32	77,15	34,94
COT A corrigido (ppm)	366,61	259,24	229,98
COT P corrigido (ppm)	245,54	71,38	29,17

6.2. Caracterização do Efluente

6.2.1. Doseamento das Frações do Efluente

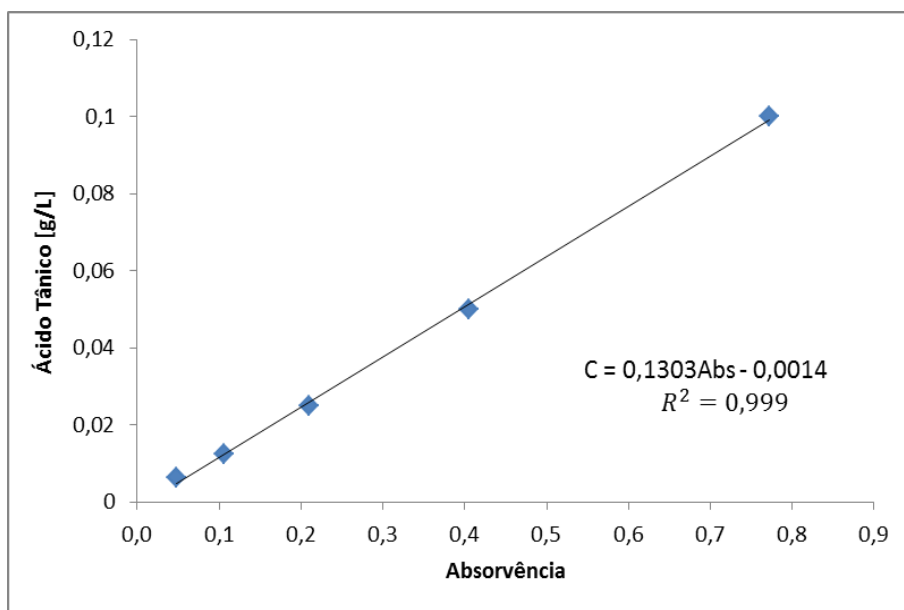


Figura 6.1 – Curva de calibração para a quantificação dos Fenóis totais e Taninos.

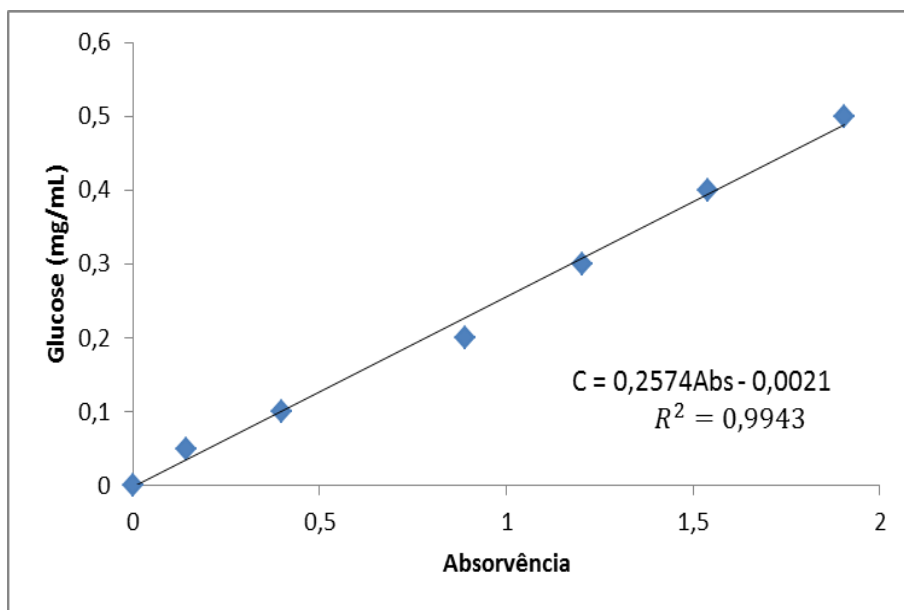


Figura 6.2 – Curva de calibração para a quantificação dos Açúcares redutores.

6.2.2. Espectrometria de Massa

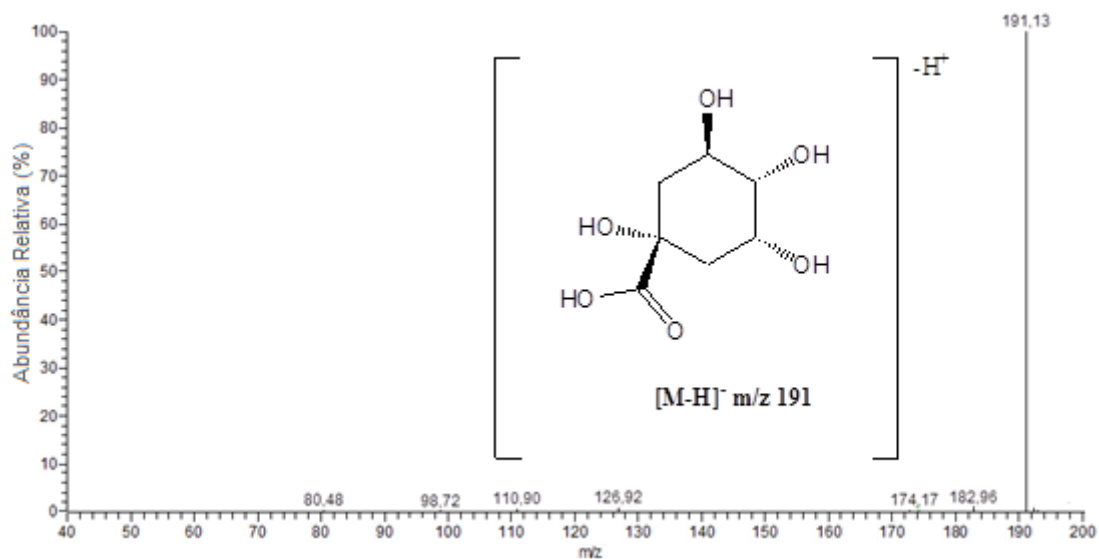


Figura 6.3 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 191 correspondente à molécula desprotonada de ácido Quínico.

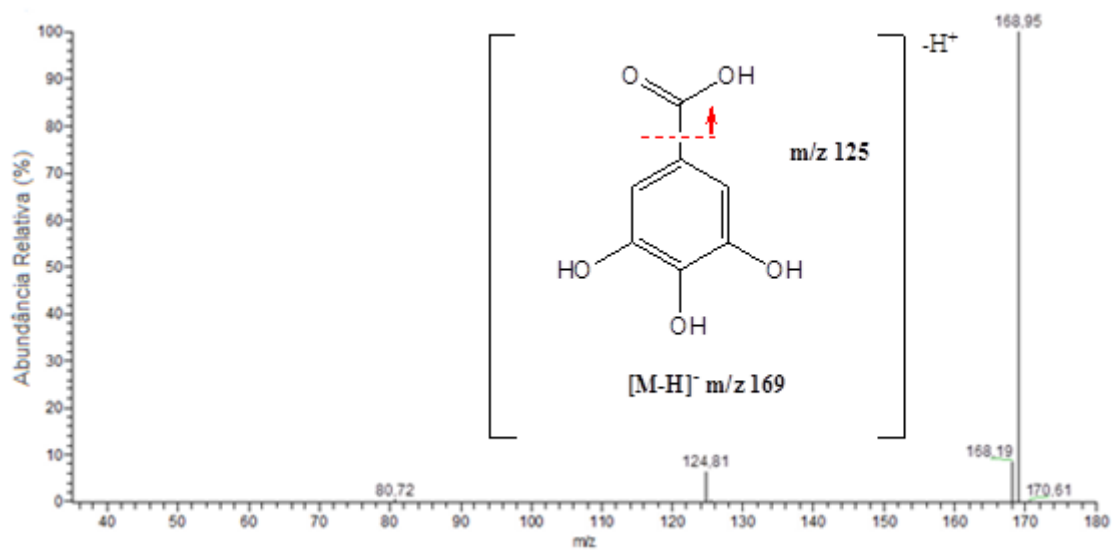


Figura 6.4 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 169 correspondente à molécula desprotonada de ácido Gálico.

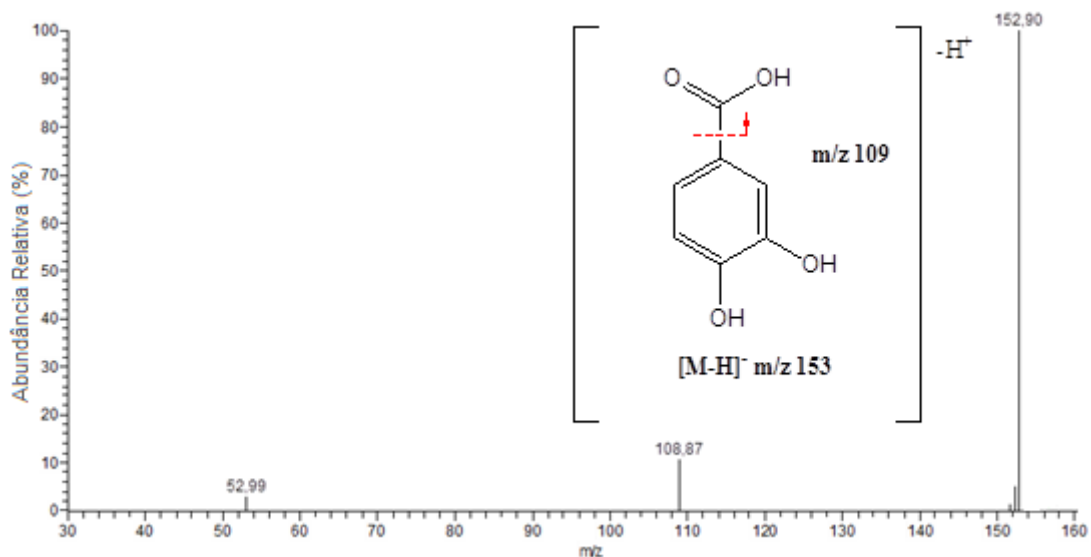


Figura 6.5 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 153 correspondente à molécula desprotonada de ácido Protocatecuico.

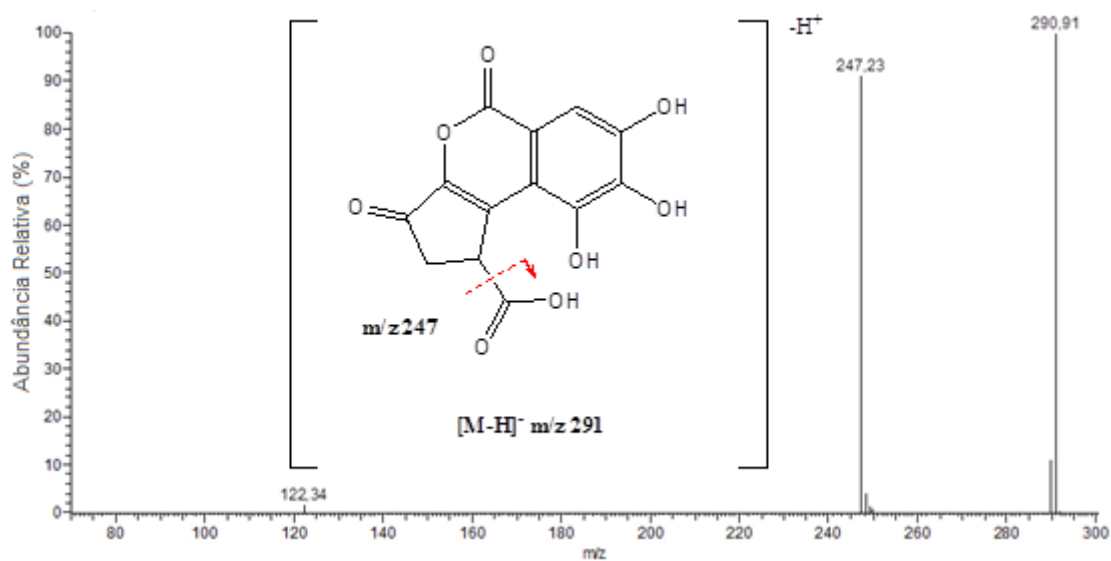


Figura 6.6 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 291 correspondente à molécula desprotonada de ácido carboxílico de Brevifolina.

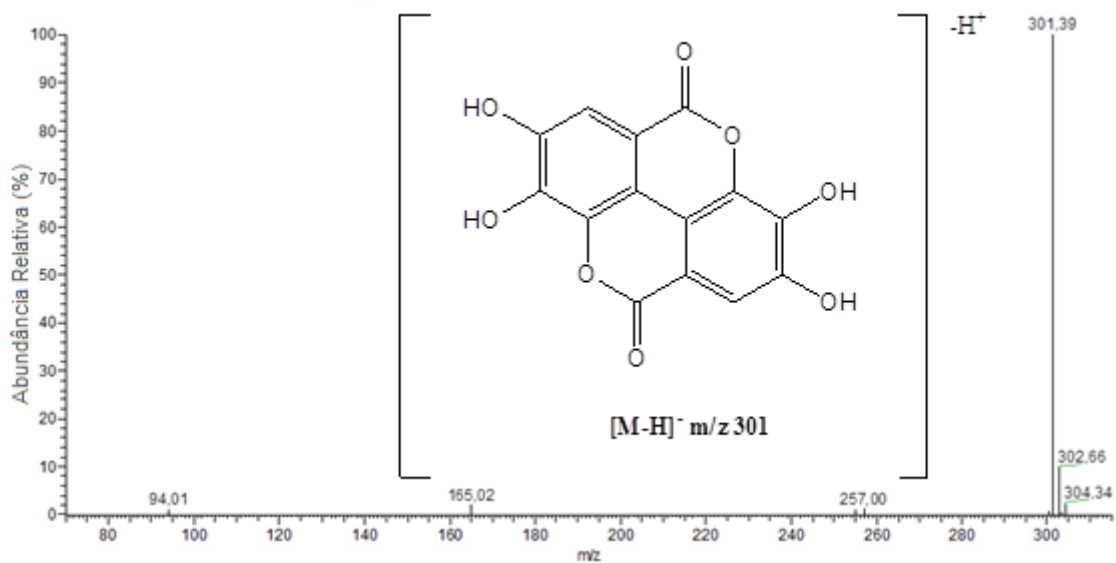


Figura 6.7 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 301 correspondente à molécula desprotonada de ácido Elágico.

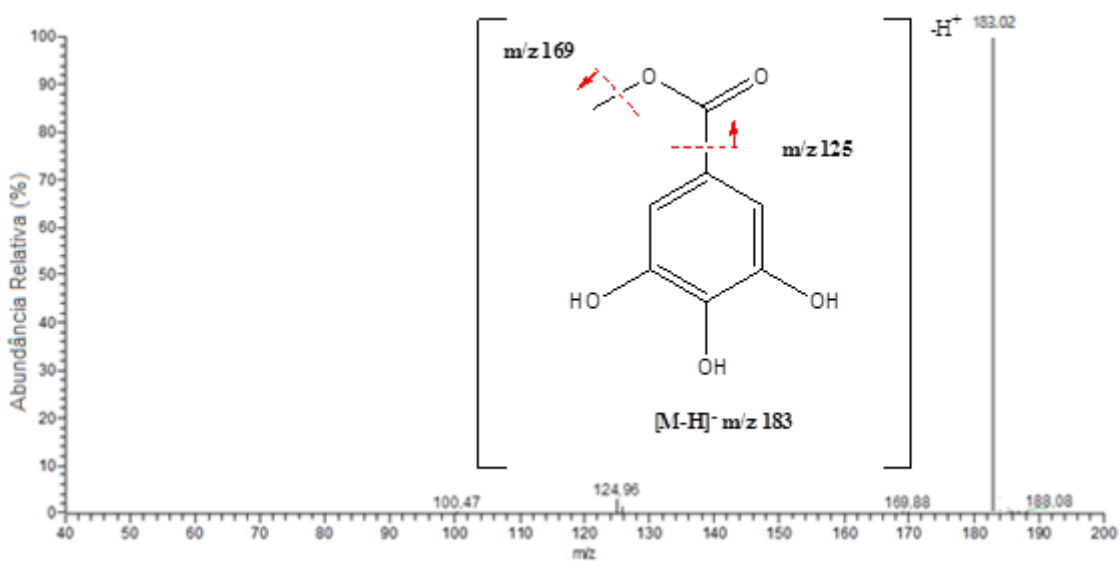


Figura 6.8 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do ião com m/z de 183 correspondente à molécula desprotonada de Galato de Metilo.

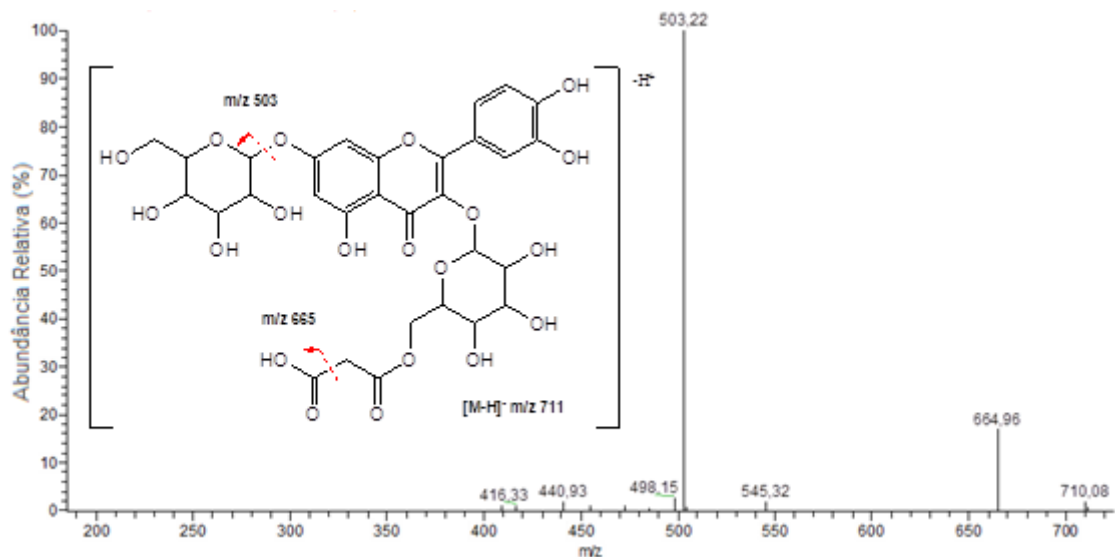


Figura 6.9 – Espectro de MS/MS obtido por ionização de electrospray (-) do íon com m/z de 711 correspondente à molécula desprotonada de Ácido-o-hexósido acetil triterpeno.

6.2.3. Doseamento dos Padrões

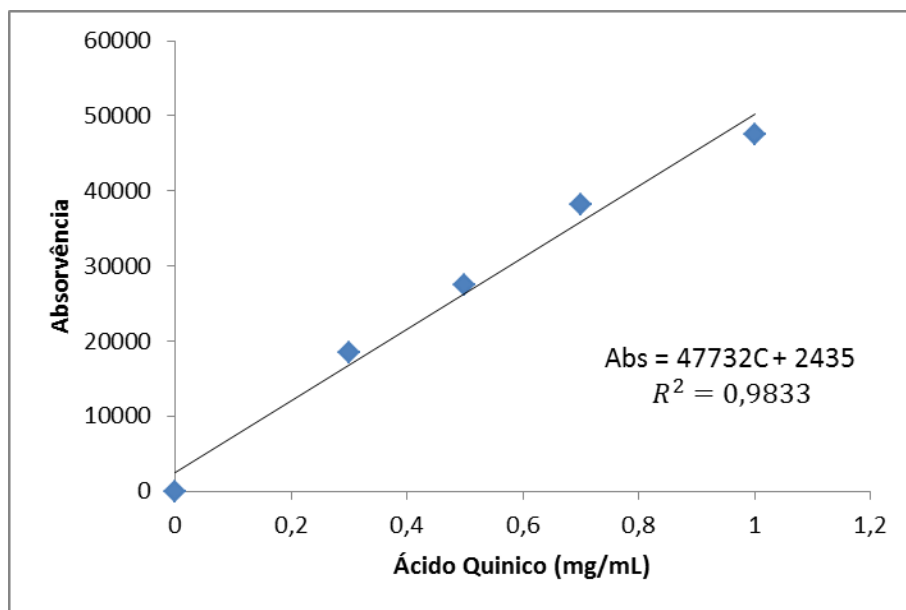


Figura 6.10 – Curva de calibração do ácido Quínico obtida por HPLC-DAD.

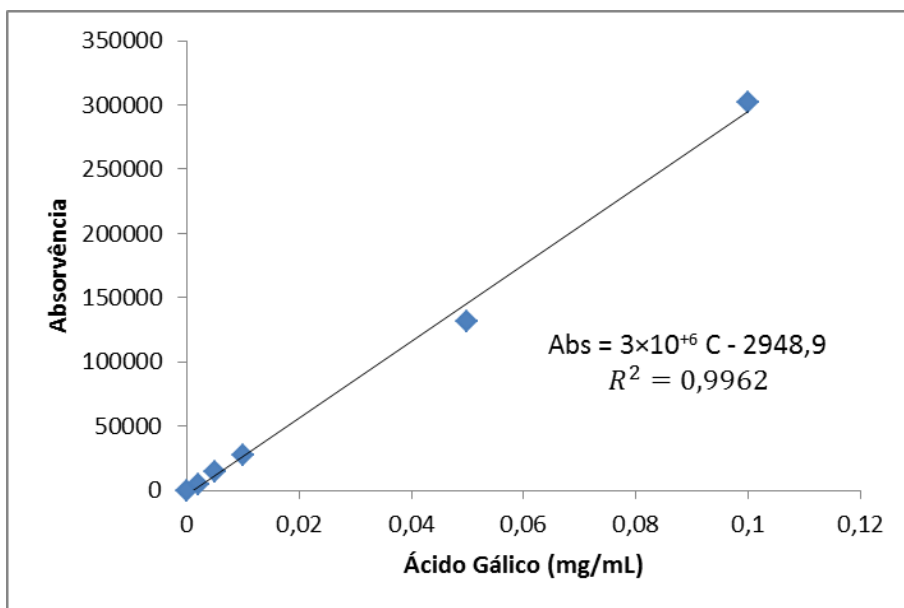


Figura 6.11 – Curva de calibração do ácido Gálico obtida por HPLC-DAD.

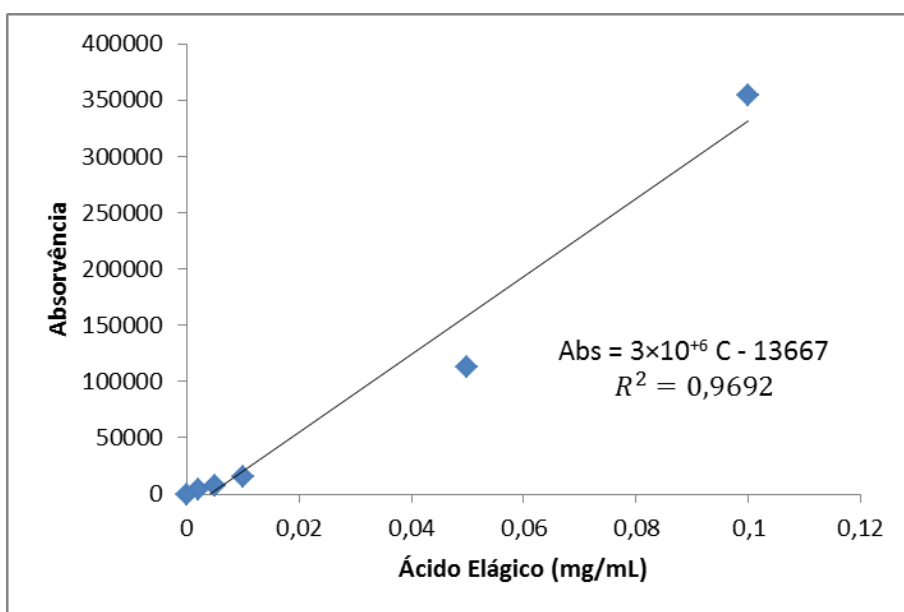


Figura 6.12 – Curva de calibração do ácido Elágico obtida por HPLC-DAD.

6.3. Actividades Biológicas

6.3.1. Análise preliminar por Electroforese das proteínas celulares

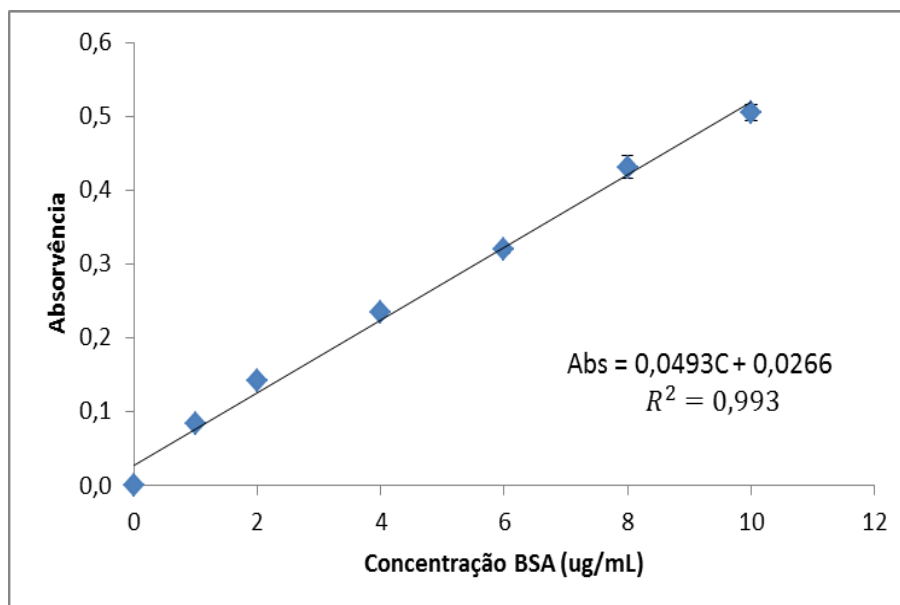


Figura 6.13 – Curva de calibração de BSA para o doseamento de proteína.

Tabela 6.8 – Peso molecular do marcador e respectiva determinação da mobilidade relativa.

Marcador (kDa)	Distância percorrida pelo corante (cm)	Distância percorrida pelo fragmento (cm)	Mobilidade Relativa	Log (MM)
10		Não existe banda	-----	1
15		Não existe banda	-----	1,176
20		8	0,941	1,301
25		7,9	0,929	1,398
35		7,2	0,847	1,544
45	8,5	6,4	0,753	1,653
60		5,6	0,659	1,778
72		4,9	0,576	1,857
100		4,1	0,482	2
140		Não existe banda	-----	2,146
180		Não existe banda	-----	2,255

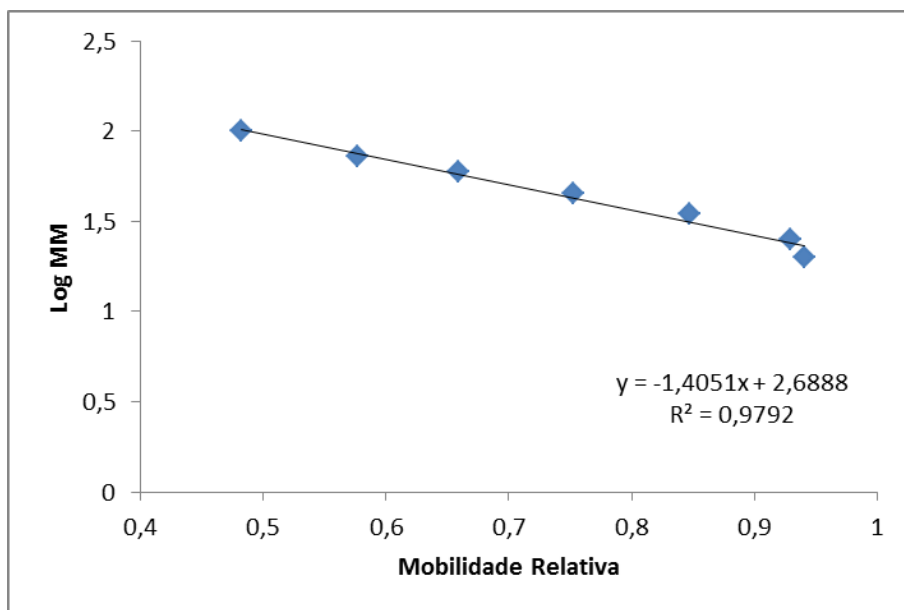


Figura 6.14 - Curva de Calibração do logaritmo do peso molecular (kDa) em função da mobilidade relativa do marcador.