



Instituto Superior De Engenharia de Lisboa  
Área Departamental De Engenharia Química

# **Otimização do fracionamento do efluente da cortiça recorrendo a tecnologia de membranas e estudo dos seus potenciais biológicos**

**Daniela Filipa Pereira Silva**  
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

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

Orientadores:

Professora Doutora Rita Pacheco

Professor Doutor Luís Miguel Minhalma

Júri:

Presidente: Professor Doutor Teodoro Trindade

Vogais: Professor Doutor Pedro Luís Falé

Professora Doutora Rita Pacheco

**Dezembro de 2018**



Instituto Superior De Engenharia de Lisboa  
Área Departamental De Engenharia Química

# **Otimização do fracionamento do efluente da cortiça recorrendo a tecnologia de membranas e estudo dos seus potenciais biológicos**

**Daniela Filipa Pereira Silva**  
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

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

Orientadores:

Professora Doutora Rita Pacheco

Professor Doutor Luís Miguel Minhalma

Júri:

Presidente: Professor Doutor Teodoro Trindade

Vogais: Professor Doutor Pedro Luís Falé

Professora Doutora Rita Pacheco

**Dezembro de 2018**

## **Agradecimentos**

Agradeço especialmente aos meus orientadores Professores Doutores Rita Pacheco e Luis Miguel Minhalma, pela orientação ao longo do meu trabalho desde do início, como também pela revisão do mesmo e pelo conhecimento transmitido.

Ao instituto Superior de Engenharia de Lisboa, ISEL, e aos professores agradeço por todo o conhecimento fornecido tanto na Licenciatura como no Mestrado, possibilitando assim a chegada a esta etapa.

À Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro pela sua ajuda, hospitalidade e acolhimento no seu laboratório da faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, FCUL, e à Professora Lia Ascensão pela sua simpatia e ajuda na microscopia.

Aos meus pais e a minha irmã pelos conselhos, apoio constante e por não me terem deixado desistir.

Aos meus amigos e colegas do ISEL, em especial ao Ricardo, Joana, Patricia e Daniela, por todo o companheirismo e por toda a ajuda ao longo da vida académica e pessoal.

À Laura e a Rebeca, colegas do laboratório da FCUL, por toda a ajuda e disponibilidade prestada na adaptação ao laboratório e a FCUL, como também a sua ajuda no desenvolvimento das técnicas.

Aos meus amigos dos Escuteiros agradeço toda a animação prestada nos dias cinzentos.

## Resumo

A incidência de doenças oncológicas e degenerativas do sistema nervoso tem vindo ao aumentar com os anos, devido ao crescente contacto com produtos tóxicos, com isto em mente muitos processos têm sido desenvolvidos de forma a combatê-las. Um dos processos consiste na utilização de efluente proveniente da indústria corticeira, sendo este rico em compostos orgânicos mais propriamente compostos fenólicos, conhecidos por apresentarem elevadas capacidade antioxidantes e protetoras.

De modo a melhorar os potenciais biológicos do efluente, este foi fracionado em várias frações de tamanhos moleculares diferentes: fração leve, fração pesada e fração média, constituídas por compostos com dimensões inferiores a 9,56 kDa, superiores a 65,48 kDa e dimensões entre os 9,52 kDa e os 65,48 kDa, respetivamente. Para tal, recorreu-se à tecnologia de membranas de ultrafiltração, operando em modo de diafiltração e concentração. As diferentes membranas foram preparadas recorrendo ao método de inversão de fases, usando soluções poliméricas com diferentes conteúdos de acetato de celulose (polímero), formamida (promotor de poros) e acetona (solvente). Onde foram produzidas duas membranas com limites de exclusão molecular de 65,48 kDa e 9,52 kDa.

O efluente e as frações obtidas foram caracterizados utilizando o método da cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD), o do Folin-Ciocalteu (quantificação dos fenóis), o do DPPH (atividade antioxidante), o do TBARS (inibição da peroxidação lipídica) e ainda se analisou a capacidade de inibição da acetilcolinesterase. Sendo que na sua maioria a fração pesada apresentou melhores valores,  $0,176 \pm 0,065$  mg/mg de extrato de fenóis totais,  $0,085 \pm 0,009$  mg/mg de extrato de taninos, um  $EC_{50}$  de  $21,97 \pm 6,38$   $\mu$ g/mL e um  $AC_{50}$   $0,342 \pm 3,449$  mg/mL. Os compostos identificados e caracterizados através do HPLC-DAD foram o ácido quinico, gálico, carboxílico de brevifolina, protocatecuico, vanílico, siríngico e elágico.

Foram realizados ensaios em linhas celulares do cancro do fígado (HEP-G2) e do Melanoma da pele (A375). Determinando a citotoxicidade dos compostos e o potencial de proteção da fração pesada contra agentes oxidantes ( $H_2O_2$  e TBHP) e físicos (radiação UV) nas células A375.

Por fim, as células A375 foram visualizadas através da microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e de fluorescência, na presença e ausência da fração.

**Palavras chave:** membranas, ultrafiltração, efluente da cortiça, frações do efluente, compostos fenólicos, atividade antioxidante, acetilcolinesterase, fotoproteção.

## Abstract

The occurrence of oncological diseases and degenerative diseases has been increasing over the years due to increasing contact with toxic products. Due to this, many processes have been developed to combat them. One of the processes consists in the use of effluent from the cork industry, which are rich in organic compounds like phenolic compounds, known to have high antioxidant and anticancer properties.

To improve the biological potentials of the effluent, it was fractionated into several fractions of different molecular sizes: light fraction, heavy fraction and average fraction, composed of compounds smaller than 9.56 kDa, higher than 65.48 kDa and dimensions between the 9.52 kDa and 65.48 kDa, respectively. For this, the technology of ultrafiltration membranes composed of cellulose acetate, formamide and acetone was used. Where two  $C_{A36.5}$  and  $C_{A28}$  membranes were produced with molecular exclusion limits of 65.48 kDa and 9.52 kDa. Ultrafiltration membrane technology was used, operating in diafiltration and concentration mode. The different membranes were prepared using the phase inversion method, using polymer solutions with different quantities of cellulose acetate (polymer), formamide (pore promoter) and acetone (solvent). Where were produced two membranes with molecular weight cut-off of 65.48 kDa and 9.52 kDa

The effluent and fractions obtained were quantified using the high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD), Folin-Ciocalteu (quantification of phenols), DPPH (antioxidant activity), TBARS (inhibition of lipid peroxidation) and the ability to inhibit acetylcholinesterase was also analyzed. The results of the heavy fraction were the ones that obtained better values,  $0.176 \pm 0.065$  mg/mg de extract of total phenols,  $0.085 \pm 0.009$  mg/mg de extract of tannins, an  $EC_{50}$  of  $21.97 \pm 6.38$   $\mu$ g/mL and an  $AC_{50}$  of  $0.342 \pm 3.449$  mg/mL. The compounds identified by HPLC-DAD were quinic, gallic, protocatechuic, carboxylic acid of brevifolia, vanillic, siringic, ellagic acid.

The cytotoxicity of the compounds and the potential protection against oxidizing agents ( $H_2O_2$  e TBHP) and physical (UV radiation) in cell lines of skin melanoma (A375), and the cytotoxicity of effluent and fractions on liver cancer cell lines, were analysed.

Finally, the A375 cells were visualized by scanning electron microscopy (SEM) and fluorescence.

**Keywords:** membranes, ultrafiltration, cork wastewater, wastewater fractions, phenolic compounds, antioxidant activity, acetylcholinesterase, photoprotection.

## Índice

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.       | Problemática .....   | 1  |
| 1.1.     | A Cortiça e o Processo de Extração.....                                      | 1  |
| 1.1.1.   | Efluente da Cortiça.....   | 3  |
| 1.1.2.   | Caracterização e Composição Química .....                                    | 3  |
| 1.1.2.1. | Compostos Fenólicos .....  | 5  |
| 1.2.     | Potenciais Biológicos dos Compostos Fenólicos.....                           | 8  |
| 1.2.1.   | Potencial Antioxidante .....   | 8  |
| 1.2.2.   | Potencial Protetor.....  | 10 |
| 1.2.2.1. | Dano Oxidativo Induzido pelo TBHP e pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... | 10 |
| 1.2.2.2. | Dano induzido pela radiação UVC.....   | 11 |
| 1.2.3.   | Potencial de Inibição da Enzima de Acetilcolinesterase .....                 | 12 |
| 1.2.4.   | Potencial Citotóxico em Culturas Celulares Humanas .....                     | 13 |
| 1.3.     | Tecnologia de Membranas.....   | 14 |
| 1.3.1.   | Breve História das Membranas .....   | 15 |
| 1.3.2.   | Classificação, Natureza e Estrutura das Membranas .....                      | 16 |
| 1.3.3.   | Modo de Operação.....  | 18 |
| 1.3.4.   | Problemas na Tecnologia de Membranas .....                                   | 19 |
| 1.4.     | Objetivos.....   | 20 |
| 2.       | Materiais e Métodos .....  | 21 |
| 2.1.     | Equipamentos .....   | 21 |
| 2.2.     | Reagentes.....   | 22 |
| 2.3.     | Preparação das Membranas .....   | 23 |
| 2.4.     | Caracterização das Membranas.....  | 24 |
| 2.4.1.   | Permeabilidade Hidráulica.....   | 24 |
| 2.4.2.   | Rejeição de Sais Monovalentes e Bivalentes .....                             | 25 |
| 2.4.3.   | Rejeição de Solventes Orgânicos.....   | 26 |
| 2.5.     | Fracionamento do Efluente da Cortiça por Tecnologia de Membrana              | 27 |

|   |    |
|---|----|
| 2.5.1. Fração Leve .....  | 27 |
| 2.5.2. Fração Pesada.....   | 28 |
| 2.5.3. Fração Média .....   | 28 |
| 2.6. Extração das Mucilagens por Precipitação com Etanol .....  | 29 |
| 2.7. Caracterização do efluente e frações .....   | 30 |
| 2.7.1. Quantificação dos fenóis totais.....   | 30 |
| 2.7.1.1. Quantificação de Taninos.....  | 31 |
| 2.7.2. Cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD) .....  | 31 |
| 2.7.3. Determinação da Atividade Antioxidante .....   | 32 |
| 2.7.3.1. Método Redução do Radical DPPH.....  | 32 |
| 2.7.3.2. Inibição da Peroxidação Lipídica .....   | 33 |
| 2.7.3.3. Inibição da Captura de Radicais de Óxido Nítrico.....  | 35 |
| 2.7.4. Inibição da Enzima Acetilcolinesterase.....  | 35 |
| 2.8. Cultura de Linhas Celulares Cancerígenas Humanas .....   | 37 |
| 2.8.1. Avaliação do Potencial Citotóxico.....   | 38 |
| 2.8.2. Avaliação do Poder Protetor da Fração Pesada.....  | 39 |
| 2.8.2.1. Metodologia de Superfície de Resposta – Design Experimental e<br>Construção do Modelo.....   | 39 |
| 2.8.2.2. Estudo do Efeito dos Agentes Oxidantes – TBHP e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , do<br>Tempo de Exposição e da Concentração da Fração Pesada..... | 41 |
| 2.8.2.3. Estudo do Efeito da Radiação UV, do Tempo de Exposição e da<br>Concentração da Fração Pesada .....   | 44 |
| 2.9. Observações por Microcopia.....  | 45 |
| 2.10. Análise de resultados e Estatística.....  | 46 |
| 3. Resultados e Discussão.....  | 47 |
| 3.1. Caracterização da Membrana .....   | 47 |
| 3.1.1. Permeabilidade Hidráulica.....   | 47 |
| 3.1.2. Rejeição Aparente de Sais Mono e Bivalentes .....  | 50 |
| 3.1.3. Rejeição a Solutos Orgânicos .....   | 51 |

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| 3.2.     | Fracionamento do Efluente pelas Membranas .....  | 53  |
| 3.2.1.   | Fração leve .....  | 53  |
| 3.2.2.   | Fração Pesada.....   | 54  |
| 3.2.3.   | Fração média .....   | 55  |
| 3.2.4.   | Comparação entre Frações e Efluente .....  | 57  |
| 3.3.     | Caracterização do Efluente e das Frações.....  | 58  |
| 3.3.1.   | Cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD) .....  | 59  |
| 3.3.2.   | Quantificação de fenóis totais e taninos .....   | 63  |
| 3.4.     | Potenciais Biológicos do Efluente e das Frações .....  | 65  |
| 3.4.1.   | Determinação da Atividade Antioxidante .....   | 65  |
| 3.4.1.1. | Método da Redução do Radical DPPH.....   | 65  |
| 3.4.1.2. | Inibição da Peroxidação Lipídica .....   | 69  |
| 3.4.1.3. | Inibição da Captura de Radicais de Óxido Nítrico.....  | 71  |
| 3.4.2.   | Inibição da Enzima Acetilcolinesterase.....  | 72  |
| 3.4.3.   | Citotoxicidade do Efluente e das Frações.....  | 76  |
| 3.4.4.   | Estudo do Efeito dos Agentes Oxidantes – TBHP e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , do Tempo de Exposição e da Concentração da Fração Pesada ..... | 80  |
| 3.4.5.   | Estudo do efeito da radiação UV, do tempo de exposição e da concentração da fração pesada.....   | 89  |
| 3.5.     | Observações de microscopia .....   | 92  |
| 4.       | Conclusões .....   | 97  |
| 5.       | Perspetivas Futuras .....  | 99  |
| 6.       | Referências Bibliografia .....   | 100 |
| 7.       | Anexos.....  | 110 |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.1</b> - Representação da percentagem da área mundial de sobro, correspondente a cada país. ....  | 1  |
| <b>Figura 1.2</b> - Modelo da estrutura da suberina proposto por Bernards.....   | 4  |
| <b>Figura 1.3</b> - Estrutura química do álcool cumarílico, álcool coniferílico e do álcool sinapílico, respetivamente, monómeros constituintes da lenhina. .... | 5  |
| <b>Figura 1.4</b> - Estrutura química de ácidos fenólicos.....   | 6  |
| <b>Figura 1.5</b> - Estrutura química de dois taninos hidrolisáveis, galotanino e elagitanino..  | 8  |
| <b>Figura 1.6</b> – Reação de hidrolise da acetilcolina, pela acetilcolinesterase (AChE).....  | 13 |
| <b>Figura 1.7</b> - Linha celular HEP-G2 do cancro do fígado .....   | 14 |
| <b>Figura 1.8</b> - Linha celular A375 do cancro da pele .....   | 14 |
| <b>Figura 1.9</b> – Esquema da tecnologia de membranas em modo de recirculação total e em modo de concentração.....  | 18 |
| <b>Figura 1.10</b> - Esquema da tecnologia de membranas em modo de diafiltração.....   | 18 |
| <b>Figura 2.1</b> – Faca.....  | 23 |
| <b>Figura 2.2</b> - Instalação de ultrafiltração, modelo Ray-Flow, Tech Sep.....   | 24 |
| <b>Figura 2.3</b> - Exemplo de representação gráfica para a determinação da $L_P$ . ....   | 25 |
| <b>Figura 2.4</b> - Exemplo de representação gráfica para a determinação do MWCO.....  | 26 |
| <b>Figura 2.5</b> - Esquema do processo de obtenção da fração leve, em modo de concentração. ....  | 28 |
| <b>Figura 2.6</b> - Esquema do processo de obtenção da fração pesada, em modo de diafiltração. ....  | 28 |
| <b>Figura 2.7</b> - Esquema do processo de obtenção da fração média, em modo de concentração e de diafiltração. ....   | 29 |
| <b>Figura 2.8</b> - Gráfico com a representação da variação de TFA (%) ao longo do tempo, HPLC-DAD. ....   | 32 |
| <b>Figura 2.9</b> - Esquema da reação do ácido Tiobarbitúrico com MDA, produzindo um aducto MDA:TBA (1:2) de coloração rosa.....                                 | 33 |
| <b>Figura 2.10</b> - Esquema da reação de hidrolise da acetiltiocolina e da reação da tiocolina com o DNTB. ....   | 36 |
| <b>Figura 2.11</b> - Gráfico de variação da absorvência em função do tempo.....  | 37 |
| <b>Figura 3.1</b> - Gráfico do $J_{P25}$ em função da pressão transmembranar, da membrana $CA_{28}$ . ....   | 49 |
| <b>Figura 3.2</b> - Representação gráfica do MWCO para a membrana $CA_{36,5}$ . ....   | 52 |
| <b>Figura 3.3</b> - Representação gráfica do MWCO para a membrana $CA_{28}$ . ....   | 52 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 3.4</b> - Representação gráfica da variação da condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ ) e da cor do permeado em função do diavolume, utilizando a membrana $C_{A36,5}$ . | 55 |
| <b>Figura 3.5</b> - Representação gráfica do fluxo volumétrico ( $J_P$ ) em função do diavolume, utilizando a membrana $C_{A36,5}$ .   | 55 |
| <b>Figura 3.6</b> - Representação gráfica da variação da condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ ) e da cor do permeado em função do diavolume, utilizando a membrana $C_{A28}$ .   | 57 |
| <b>Figura 3.7</b> - Representação gráfica do fluxo volumétrico ( $J_P$ ) (direita), utilizando a membrana $C_{A28}$ .  | 57 |
| <b>Figura 3.8</b> - Coeficientes de rejeição aparente relativamente a cor e a condutividade, tendo como base os valores do efluente.   | 58 |
| <b>Figura 3.9</b> - Cromatograma do Efluente e da Fração Pesada e Média (1 mg de massa seca/mL).   | 59 |
| <b>Figura 3.10</b> - Cromatograma do Efluente e da Fração Pesada e Média, sem mucilagens (1 mg de massa seca/mL).  | 60 |
| <b>Figura 3.11</b> - Cromatograma das mucilagens das frações (1mg/mL), em HPLC-DAD.  | 62 |
| <b>Figura 3.12</b> - Atividade Antioxidante (AA %) em função da concentração do efluente e das frações ( $\mu\text{g/mL}$ ).   | 66 |
| <b>Figura 3.13</b> - Gráfico de comparação dos valores obtidos da atividade antioxidante (AA %), para as amostras com mucilagens, sem mucilagens, e mucilagens.              | 68 |
| <b>Figura 3.14</b> - Inibição da peroxidação lipídica (%) em função da concentração da fração pesada ( $\text{mg/mL}$ ).   | 70 |
| <b>Figura 3.15</b> - Percentagem da inibição da peroxidação lipídica das amostras com concentração de 0,5 $\text{mg/mL}$ .   | 70 |
| <b>Figura 3.16</b> - Inibição da AChE em função da concentração do efluente e das frações ( $\text{mg/mL}$ ).  | 72 |
| <b>Figura 3.17</b> - Gráfico de comparação dos valores obtidos da inibição da AChE, para as amostras com mucilagens, sem mucilagens, e mucilagens.                           | 74 |
| <b>Figura 3.18</b> - Citotoxicidade do efluente e das restantes frações em função da concentração, em células Hep-G2.  | 76 |
| <b>Figura 3.19</b> - Gráfico de comparação da citotoxicidade das frações com e sem mucilagens.   | 77 |
| <b>Figura 3.20</b> - Citotoxicidade do efluente e das restantes frações em função da concentração, em células A375.  | 78 |
| <b>Figura 3.21</b> - Citotoxicidade dos padrões com concentração de 0,01 e 0,1 $\text{mg/mL}$ .  | 79 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 3.22</b> – Citotoxicidade em função da concentração de TBHP em linhas celulares A375, após 3 e 6 horas.....  | 80 |
| <b>Figura 3.23</b> - Citotoxicidade em função da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em linhas celulares A375, após 3 e 6 horas.....   | 80 |
| <b>Figura 3.24</b> - Gráfico de comparação da citotoxicidade em linhas celulares A375, controlo e quando incubadas inicialmente em fração pesada 1 mg/mL. Durante 3 e 6 horas. ....                                    | 81 |
| <b>Figura 3.25</b> - Gráfico de comparação da citotoxicidade em linhas celulares A375, controlo e quando incubadas inicialmente em fração pesada 1 mg/mL. Durante 3 e 6 horas. ....                                    | 82 |
| <b>Figura 3.26</b> - Variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação com o agente oxidante e concentração de TBHP, na ausência de pré-incubação com fração pesada.....                                      | 84 |
| <b>Figura 3.27</b> – Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação com o agente oxidante e concentração de TBHP, com concentração da fração pesada de 0,5 mg/mL. ....                        | 84 |
| <b>Figura 3.28</b> - Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação do agente oxidante e a concentração da fração pesada, com concentração de TBHP de 100 µM. ....                            | 85 |
| <b>Figura 3.29</b> - Variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação com o agente oxidante e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , na ausência de pré-incubação com fração pesada.....            | 86 |
| <b>Figura 3.30</b> - Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação com o agente oxidante e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , com concentração da fração pesada de 1 mg/mL..... | 87 |
| <b>Figura 3.31</b> - Simulação da variação da citotoxicidade em função da concentração da fração pesada e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , com tempo de incubação igual a 180 min....                   | 88 |
| <b>Figura 3.32</b> - Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação do agente oxidante e a concentração da fração pesada, com concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 100 µM.....    | 89 |
| <b>Figura 3.33</b> – Citotoxicidade em função do tempo de incubação ao abrigo da luz UV. ....  | 90 |
| <b>Figura 3.34</b> -Citotoxicidade em função da concentração da fração pesada, incubada em radiação UV durante 90 min. ....  | 90 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 3.35</b> – Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de exposição a radiação UV e em função da concentração da fração pesada. ....   | 92  |
| <b>Figura 3.36</b> – Microscopia ótica com ampliação de 400 x, fotos do lado esquerdo A375 controlo e imagens do lado direito A375 incubadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h. (x400). ....  | 93  |
| <b>Figura 3.37</b> - Microscopia em campo claro, imagem do lado esquerdo células A375 controlo e imagens do lado direito células A375 tratadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h. (x400) .....  | 94  |
| <b>Figura 3.38</b> – Microscopia de contraste por interferência diferencial (DIC) da mesma região das imagens da figura 3.36, do lado esquerdo células A375 controlo e do lado direito células A375 incubadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h. (x400) ...   | 95  |
| <b>Figura 3.39</b> - Microscopia em campo claro (cima), Microscopia de fluorescência (baixo), imagem do lado esquerdo células A375 controlo e imagens do lado direito células A375 incubadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h, células coradas com o corante Hoechst 33342 (10 min), radiação UV. (x400) ..... | 95  |
| <b>Figura 3.40</b> – Microscopia eletrónica de varrimento, SEM em diferentes ampliações, imagem do lado esquerdo células A375 controlo e imagens do lado direito células A375 incubadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h. (x500 e x1000) .....   | 96  |
| <b>Figura 7.1</b> - Reta de calibração do sal Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....   | 110 |
| <b>Figura 7.2</b> - Reta de calibração do sal NaCl.....   | 110 |
| <b>Figura 7.3</b> – Representação da área em função da concentração do PEG 3 000 g/mol. ....  | 110 |
| <b>Figura 7.4</b> - Representação da área em função da concentração do PEG 6 000 g/mol. ....  | 111 |
| <b>Figura 7.5</b> - Representação da área em função da concentração do PEG 10 000 g/mol. ....   | 111 |
| <b>Figura 7.6</b> - Representação da área em função da concentração do PEG 20 000 g/mol. ....   | 111 |
| <b>Figura 7.7</b> - Representação da área em função da concentração do PEG 70 000 g/mol. ....   | 112 |
| <b>Figura 7.8</b> - Representação da área em função da concentração do PEG 100 000 g/mol. ....  | 112 |
| <b>Figura 7.9</b> – Cromatograma do efluente, corrida em HPLC-DAD durante 1 hora, com ampliação no pico correspondente ao ácido quinico. ....   | 113 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 7.10</b> - Cromatograma da fração média, corrida em HPLC-DAD durante 1 hora, com ampliação no pico correspondente ao ácido quinico. .... | 113 |
| <b>Figura 7.11</b> - Cromatograma da fração média e das frações com uma concentração de 1 mg/mL, HPLC-DAD 1 hora.....                              | 114 |
| <b>Figura 7.12</b> - Cromatograma do ácido gálico 0,5 mg/mL.....   | 114 |
| <b>Figura 7.13</b> - Cromatograma do ácido quinico 0,5 mg/mL.....  | 115 |
| <b>Figura 7.14</b> - Cromatograma do ácido siríngico 0,5 mg/mL.....  | 115 |
| <b>Figura 7.15</b> - Cromatograma do ácido vanílico 0,5 mg/mL.....   | 116 |
| <b>Figura 7.16</b> - Cromatograma do ácido elágico 0,25 mg/mL.....   | 116 |
| <b>Figura 7.17</b> – Curva de calibração para a quantificação de fenóis totais e taninos, utilizando o ácido tânico como padrão.....               | 117 |
| <b>Figura 7.18</b> - Curva de calibração para a quantificação de fenóis totais e taninos, utilizando ácido gálico como padrão.....                 | 117 |
| <b>Figura 7.19</b> - Atividade Antioxidante (AA %) em função da concentração dos padrões (µg/mL).....  | 118 |
| <b>Figura 7.20</b> - Inibição da AChE (%) em função da concentração dos padrões (µg/mL).....   | 119 |

## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.1</b> - Valores limites de emissão na descarga de águas residuais .....  | 3  |
| <b>Tabela 1.2</b> – Processos de membranas cuja força motriz é a pressão .....   | 17 |
| <b>Tabela 2.1</b> – Valores dos fatores utilizados na determinação da proteção contra TBHP .....   | 42 |
| <b>Tabela 2.2</b> - Valores dos fatores utilizados na determinação da proteção contra H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....  | 42 |
| <b>Tabela 2.3</b> - Matriz do design experimental para os ensaios com TBHP e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....   | 43 |
| <b>Tabela 2.4</b> - Valores dos fatores utilizados na determinação da proteção contra a radiação UV.....   | 45 |
| <b>Tabela 2.5</b> - Matriz do design experimental, para os ensaios com a radiação UV .....   | 45 |
| <b>Tabela 3.1</b> - Valores obtidos do método da permeabilidade hidráulica, utilizando a membrana C <sub>A36,5</sub> e C <sub>A28</sub> .....  | 48 |
| <b>Tabela 3.2</b> - Valores de fluxo de permeação (Kg/h/m <sup>2</sup> ).....  | 49 |
| <b>Tabela 3.3</b> - Permeabilidade hidráulica (Kg/h/m <sup>2</sup> /bar) das membranas. ....   | 49 |
| <b>Tabela 3.4</b> - Valores de massa (g), temperatura (°C) e condutividade (µS/cm) do permeado e da alimentação, do ensaio com sais mono (NaCl) e bivalentes (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), com a membrana C <sub>A36,5</sub> ..... | 50 |
| <b>Tabela 3.5</b> - Valores de massa (g), temperatura (°C) e condutividade (µS/cm) do permeado e da alimentação, do ensaio com sais mono (NaCl) e bivalentes (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), com a membrana C <sub>A28</sub> .....   | 50 |
| <b>Tabela 3.6</b> - Concentração dos sais permeado e na alimentação, da membrana C <sub>A36,5</sub> e C <sub>A28</sub> .....   | 51 |
| <b>Tabela 3.7</b> - Coeficientes de rejeição de sais monovalentes e bivalentes de cada membrana .....  | 51 |
| <b>Tabela 3.8</b> - Coeficientes de rejeição de solutos orgânicos, para a membrana C <sub>A36,5</sub> . ..   | 52 |
| <b>Tabela 3.9</b> - Coeficientes de rejeição de solutos orgânicos, para a membrana C <sub>A28</sub> ... ..   | 52 |
| <b>Tabela 3.10</b> - Valores de MWCO obtidos para cada uma das membranas.....  | 53 |
| <b>Tabela 3.11</b> - Valores registados e obtidos para obter a fração leve, com a membrana C <sub>A28</sub> . em modo de concentração. ....  | 53 |
| <b>Tabela 3.12</b> Cor, condutividade (µS/cm), coeficientes de rejeição e quantidade de fenóis totais e taninos do efluente e da fração leve. ....   | 54 |
| <b>Tabela 3.13</b> - Cor, condutividade (µS/cm) e coeficiente de rejeição do efluente e da fração pesada em modo de diafiltração .....   | 54 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 3.14</b> - Valores registados e obtidos para obter a alimentação da fração média, com a membrana C <sub>A36,5</sub> , na etapa em modo de concentração. .... | 56  |
| <b>Tabela 3.15</b> - Cor, condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ ) e coeficiente de rejeição da alimentação da fração média e da fração média. ....                          | 56  |
| <b>Tabela 3.16</b> - Compostos identificados como estando presentes no efluente e nas restantes frações sem mucilagens. ....   | 61  |
| <b>Tabela 3.17</b> - Comparação da intensidade relativa dos picos dos compostos sem mucilagens (A) e das mucilagens (B). ....  | 62  |
| <b>Tabela 3.18</b> - Quantidade de fenóis e taninos presentes em cada fração e efluente, depois da liofilização. ....  | 64  |
| <b>Tabela 3.19</b> - Quantidade de fenóis e taninos presentes em cada fração e efluente sem mucilagens. ....   | 64  |
| <b>Tabela 3.20</b> - EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) da atividade antioxidante do efluente e frações. ....   | 66  |
| <b>Tabela 3.21</b> - EC <sub>50</sub> da atividade antioxidante dos padrões. ....  | 67  |
| <b>Tabela 3.22</b> - Percentagem de inibição da redução de radicais NO presentes na fração pesada. ....  | 71  |
| <b>Tabela 3.23</b> - AC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) da inibição da AChE (%) do efluente e frações. ....   | 73  |
| <b>Tabela 3.24</b> - Valores obtidos da inibição da AChE (%), para os padrões. ....  | 73  |
| <b>Tabela 3.25</b> - IC <sub>50,HEP-G2</sub> do efluente e das frações. ....   | 77  |
| <b>Tabela 3.26</b> - IC <sub>50,A375</sub> do efluente e das frações. ....   | 78  |
| <b>Tabela 3.27</b> - Valores de citotoxicidade dos padrões. ....   | 79  |
| <b>Tabela 3.28</b> - IC <sub>50,A375</sub> dos compostos TBHP e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> após 3 e 6 horas. ....   | 81  |
| <b>Tabela 7.1</b> - Áreas dos picos obtidos através do HPLC-IR e concentração obtida com a comparação com padrões, para a membrana C <sub>A36,5</sub> . ....           | 112 |
| <b>Tabela 7.2</b> - Áreas dos picos obtidos através do HPLC-IR e concentração obtida com a comparação com padrões, para a membrana C <sub>A28</sub> . ....             | 112 |
| <b>Tabela 7.3</b> - Valores obtidos da atividade antioxidante (AA %), para as amostras sem mucilagens e mucilagens. ....   | 118 |
| <b>Tabela 7.4</b> - Percentagem da inibição da peroxidação lipídica das amostras com concentração. ....  | 119 |
| <b>Tabela 7.5</b> - Valores obtidos da inibição da AChE (%), para as amostras sem mucilagens e mucilagens. ....  | 120 |
| <b>Tabela 7.6</b> – Matriz padrão do design experimental, com 3 fatores e 5 níveis. ....   | 120 |
| <b>Tabela 7.7</b> – Matriz padrão do design experimental, com 2 fatores e 5 níveis. ....   | 121 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 7.8</b> – Tabela de comparação da citotoxicidade induzida pelo TBHP em linhas celulares A375, controlo e quando incubadas inicialmente em fração pesada 1 mg/mL. Durante 3 e 6 horas. ....                           | 122 |
| <b>Tabela 7.9</b> - Matriz do design experimental e valores de citotoxicidade obtidos, para os ensaios com TBHP, de modo a obter as curvas de resposta. ....   | 122 |
| <b>Tabela 7.10</b> - Tabela de comparação da citotoxicidade induzida pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em linhas celulares A375, controlo e quando incubadas inicialmente em fração pesada 1 mg/mL. Durante 3 e 6 horas. .... | 123 |
| <b>Tabela 7.11</b> - Matriz do design experimental e valores de citotoxicidade obtidos, para os ensaios com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , de modo a obter as curvas de resposta.....   | 123 |
| <b>Tabela 7.12</b> - Matriz do design experimental e valores de citotoxicidade obtidos, para os ensaios com a radiação UV, de modo a obter a curva de resposta.....  | 124 |

## Lista de Abreviaturas

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>AA</b>                | Atividade antioxidante  |
| <b>A</b>                 | Área  |
| <b>ACh</b>               | Acetilcolina  |
| <b>AChE</b>              | Acetilcolinesterase   |
| <b>AChI</b>              | Acetiltiocolina   |
| <b>AC<sub>50</sub></b>   | Concentração que corresponde a 50 % de inibição da enzima acetilcolinesterase |
| <b>C<sub>A</sub></b>     | Concentração da alimentação   |
| <b>C<sub>A28</sub></b>   | Membrana constituída por 28 % de formamida                                    |
| <b>C<sub>A36.5</sub></b> | Membrana constituída por 36,5 % de formamida                                  |
| <b>C<sub>P</sub></b>     | Concentração do permeado  |
| <b>CC</b>                | Microscopia em campo claro  |
| <b>CBO</b>               | Carência Bioquímica de Oxigénio   |
| <b>CQO</b>               | Carência Química de Oxigénio  |
| <b>COT</b>               | Carbono Orgânico Total  |
| <b>DIC</b>               | Microscopia de contraste por interferência diferencial                        |
| <b>DMEM</b>              | <i>Dulbecco's Modifies Eagle Medium</i>                                       |
| <b>DNTB</b>              | Ácido 5-5'-ditiobis(2-ácidonitrobenóico)                                      |
| <b>DPPH</b>              | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical  |
| <b>EC<sub>50</sub></b>   | Concentração que corresponde a 50 % de atividade antioxidante                 |
| <b>ROS</b>               | Espécies Reativas de Oxigénio   |
| <b>RNS</b>               | Espécies Reativas de azoto  |
| <b>f</b>                 | Rejeição aparente   |
| <b>FBS</b>               | Soro fetal bovino   |
| <b>FC</b>                | Folin-Ciocalteu   |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>HO<sup>•</sup></b>   | Radical hidroxilo (espécie reativa de oxigénio)                      |
| <b>HPLC-DAD</b>         | Cromatografia líquida de elevada resolução com detetor de fotodíodos |
| <b>IC<sub>50</sub></b>  | Concentração que corresponde a 50 % de citotoxicidade                |
| <b>J<sub>P</sub></b>    | Fluxo de permeado  |
| <b>L<sub>P</sub></b>    | Permeabilidade hidráulica  |
| <b>LH<sup>•</sup></b>   | Radical alquilo lipídico   |
| <b>LH<sub>2</sub></b>   | Cadeia polinsaturada lipídica  |
| <b>LHOO<sup>•</sup></b> | Radical peroxilo   |
| <b>MDA</b>              | Malondialdeído   |
| <b>MeOH</b>             | Metanol  |
| <b>MF</b>               | Microfiltração   |
| <b>MTT</b>              | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio         |
| <b>MWCO</b>             | Limite de exclusão molecular   |
| <b>NF</b>               | Nanofiltração  |
| <b>OI</b>               | Osmose Inversa   |
| <b>ΔP</b>               | Pressão transmembranar   |
| <b>PBS</b>              | Tampão fosfato salino  |
| <b>PEG</b>              | Polietilenoglicol  |
| <b>PL</b>               | Peroxidação Lipídica   |
| <b>PVPP</b>             | Polivinilpolipirrolidona   |
| <b>Q</b>                | Caudal mássico   |
| <b>R<sup>•</sup></b>    | Radical livre  |
| <b>FO<sup>•</sup></b>   | Radical fenóxi   |
| <b>ROH</b>              | Composto fenólico  |
| <b>RSM</b>              | Metodologia de Superfície de Resposta                                |
| <b>SEM</b>              | Microscopia de Eletrónica de Varrimento de Superfície                |

|              |  |
|--------------|--|
| <b>SNP</b>   | Nitroprussiato de sódio                      |
| <b>TBA</b>   | Ácido tiobarbitúrico                         |
| <b>TBARS</b> | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| <b>TBHP</b>  | Hidroperóxido de ter-butilo                  |
| <b>TFA</b>   | Ácido trifluoracético                        |
| <b>Tris</b>  | Tris(hidroximetil)-aminometano               |
| <b>UF</b>    | Ultrafiltração                               |
| <b>UV</b>    | Radiação Ultravioleta                        |

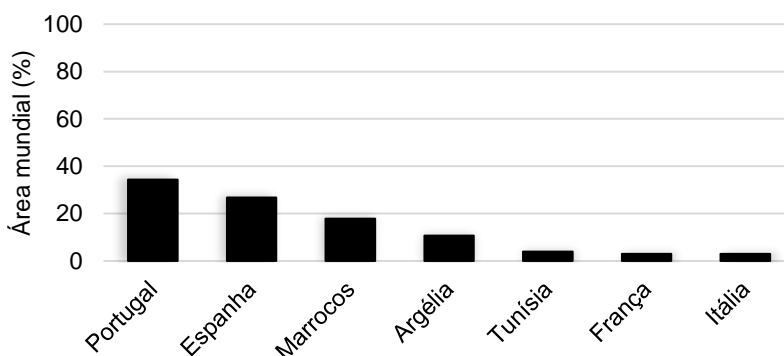
## 1. Problemática

Nos dias de hoje com a crescente preocupação com o meio ambiente, tem-se vindo a procurar novas formas de minimizar a pegada do Homem no mundo. Um dos exemplos consiste na abordagem descortinada na presente dissertação, o tratamento do efluente da cortiça, proveniente da indústria corticeira, com a utilização de membranas de ultrafiltração. Com o uso desta tecnologia foi possível, ainda, o isolamento de determinados compostos e de elevado valor acrescentado que possuem propriedades biológicas.

### 1.1. A Cortiça e o Processo de Extração

Estima-se que o sobreiro (*Quercus suber L.*) tenha aparecido há mais de 60 milhões de anos, com a formação da bacia do mediterrâneo, sendo que a cortiça é utilizada desde 1300 a.c., no Egito antigo para o fabrico de ferramentas domésticas, de pesca e para a isolamento de embarcações. <sup>[1]</sup>

O sobreiro apenas se desenvolve em determinadas zonas do mediterrâneo, mais propriamente, na parte ocidental (Portugal, Espanha, Sul de França, parte de Itália e no norte de África) e na China, uma vez que o mesmo necessita de uma combinação ambiental incomum, pouca chuva e elevada humidade, para o seu desenvolvimento, <sup>[2-3]</sup> conseguindo adaptar-se a verões secos longos e invernos suaves. <sup>[4]</sup>



**Figura 1.1** - Representação da percentagem da área mundial de sobreiro, correspondente a cada país. <sup>[5]</sup>

Atualmente Portugal é o país com maior área mundial de montado de sobreiro, concentrando 34 % da área mundial, como ilustra a figura 1.1, o que corresponde a uma área de 736 mil hectares, cerca de 23 % da área florestal portuguesa. Portugal retém ainda quase metade da produção mundial de cortiça, 49 %. A maior aplicação dos produtos de cortiça portuguesa tem como destino a indústria vinícola, produção de

rolhas, aproximadamente 72 %, seguindo do setor da construção civil para pavimentos, isolamentos e outras aplicações. [5]

A cortiça é o tecido protetor (casca) do sobreiro que separa as células vivas do ambiente externo [6], esta é usualmente retirada ciclicamente de 9 a 12 anos, dependendo da região onde se encontra e do seu diâmetro. O descasque em média ocorre entre 15 a 18 vezes por ciclo de vida do sobreiro, quando o diâmetro da casca ultrapassa os 25 cm. [2,5]

A primeira cortiça apenas pode ser removida após 25 anos, esta tiragem é denominada como cortiça virgem. Esta cortiça apresenta uma estrutura bastante irregular, acabando por ser utilizada apenas para isolamento. A cortiça secundeira como o nome indica, a segunda cortiça retirada, apesar de ser mais regular que a primeira ainda não é utilizada para o fabrico de rolhas, apenas no terceiro descortiçamento é que se obtém a cortiça com propriedades adequadas para a produção de cortiça de qualidade, denominada de cortiça de reprodução. [2,5]

O descortiçamento ocorre entre a primavera e o verão, mais propriamente, entre o fim de maio e o meio de agosto, quando o felogénio está na sua atividade máxima. Nesta altura as células recém-formadas apresentam paredes celulares finas e frágeis ainda não suberizadas, sendo por isso facilmente rompidas e permitindo assim a separação da cortiça dos tecidos subjacentes. [7] É também nesta altura que com temperaturas elevadas e tempo seco o sobreiro pode ficar exposto sem ser danificado. [8] Este processo apenas pode ser realizado por trabalhadores hábeis e com muita experiência, utilizando um machado pequeno, de modo a impedir a danificação da árvore. [1,7]

Após o descortiçamento a cortiça é deixada a repousar ao ar livre, durante mais de seis meses, com o objetivo de maturação da matéria-prima e estabilização das cortiças. [5,9-10] A etapa que se segue consiste no cozimento das pranchas em água a ferver, durante pelo menos uma hora a uma temperatura próxima dos 100 °C, de modo a limpar a cortiça, extrair as substâncias hidrossolúveis, aumentar a espessura e a elasticidade e amaciar as pranchas. [9] A água de cozedura pode ser, repetidamente, utilizada entre 20 a 30 vezes, [10] originando um efluente de baixa degradabilidade mas ricos em compostos ativos, como os compostos fenólicos [11], sendo considerados metabolitos secundários produzidos pelas plantas [12], ou seja, são compostos que não estão diretamente associados ao metabolismo e crescimento celular. [13] Por sua vez, a

decomposição dos compostos fenólicos não é muito fácil sendo eles poluentes orgânicos tóxicos e perigosos.<sup>[14]</sup>

### 1.1.1. Efluente da Cortiça

No processo industrial da cortiça, as primeiras etapas consistem na limpeza, desinfecção e umedecimento da cortiça crua, para tal a cortiça é cozinhada em água quente (~100°C), resultando na formação de água residual que contém uma mistura complexa de extratos vegetais com elevado conteúdo fenólico. <sup>[9,15]</sup>

O efluente da cortiça apresenta uma elevada carência química de oxigénio (CQO: 4500 - 5500 mg/L), elevada carência bioquímica de oxigénio (CBO: 1100 - 1800 mg/L), elevado conteúdo fenólico (600 - 900 mg/L) e um pH na ordem dos 5. Uma vez que estes parâmetros excedem os valores impostos pelo decreto-lei n: 236/98 de 1 de Agosto <sup>[16]</sup>, relativo a descarga de águas residuais (tabela 1.1), o efluente tem de sofrer um processo de tratamento antes de ser libertado para o meio ambiente. <sup>[10,17]</sup>

**Tabela 1.1** - Valores limites de emissão na descarga de águas residuais (adaptada). <sup>[16]</sup>

| Parâmetros              | Expressão de resultados               | Valores limite de emissão    |
|-------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| pH                      | Escala de Sorensen                    | 6.0-9.0                      |
| CQO                     | mg/L O <sub>2</sub>                   | 150                          |
| CBO <sub>5</sub> , 20°C | mg/L O <sub>2</sub>                   | 40                           |
| Fenóis                  | mg/L C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH | 0.5                          |
| Cor                     | -                                     | Não visível na diluição 1:20 |

### 1.1.2. Caracterização e Composição Química

A cortiça tem uma estrutura de elevada complexidade, constituída por células dispostas de modo compacto e de forma regular <sup>[18]</sup>, que tem vindo a ser bastante estudada por diferir entre amostras diferentes consoante a sua composição química. Por sua vez, fatores como a origem geográfica, clima, condições do crescimento, genética e a idade, fazem variar a composição química da cortiça. <sup>[2,6]</sup>

A parede celular da cortiça apresenta cinco camadas: duas de natureza celulósica que foram as cavidades celulares; duas mais interiores suberificadas e uma camada média lenhificada. As camadas suberificadas apresentam lamelas alternadas de suberina. <sup>[18]</sup> As camadas da cortiça têm um aspeto alveolar, cujas membranas celulares estão cheias de um gás, semelhante ao ar, que ocupa cerca de 90 % do volume. É um material leve, elástico e praticamente impermeável a líquidos e gases, isolante térmico,

elétrico, absorvedor acústico e vibratório, sendo também inócuo e praticamente imputrescível, apresentando a capacidade de ser comprimido sem expansão lateral. [5]

Os compostos constituintes da cortiça encontram-se divididos em dois tipos, componentes estruturais que não podem ser separados da parede celular da cortiça, constituídos por macromoléculas poliméricas e pelos componentes não estruturais que podem ser removidos da parede celular sem comprometer a sua estrutura, constituídos por compostos orgânicos de baixo peso molecular. Muitas das propriedades específicas da cortiça como a falta de reatividade tanto química como biológica e a sua resistência, proveem da sua composição química. [19] Apesar das diferentes composições químicas da cortiça, a composição da cortiça tem sido amplamente descrita, [20,21], sendo os principais constituintes celulares da cortiça a lenhina, a suberina, os polissacáridos e os extratáveis. Destes compostos o mais abundante é a suberina, constituindo cerca de 40 %, seguindo-se da lenhina 22 %, 18 % de polissacáridos e 15 % de extratáveis. [2] Além destes compostos, por vezes a cortiça também apresenta na sua composição cinzas e outros componentes, mas numa escala inferior. [2]

A suberina (figura 1.2) consiste num biopolímero presente nas paredes celulares de variadas espécies vegetais, a qual é composta por ácidos gordos hidroxilos de cadeia longa e ácidos fenólicos ligados entre si por grupos éster. É uma macromolécula que contém um domínio alifático e um aromático, tem uma função protetora, é o composto em maior quantidade na cortiça e o que confere a impermeabilidade da cortiça, não permitindo a passagem de água e de gases. [2,18,22-23]

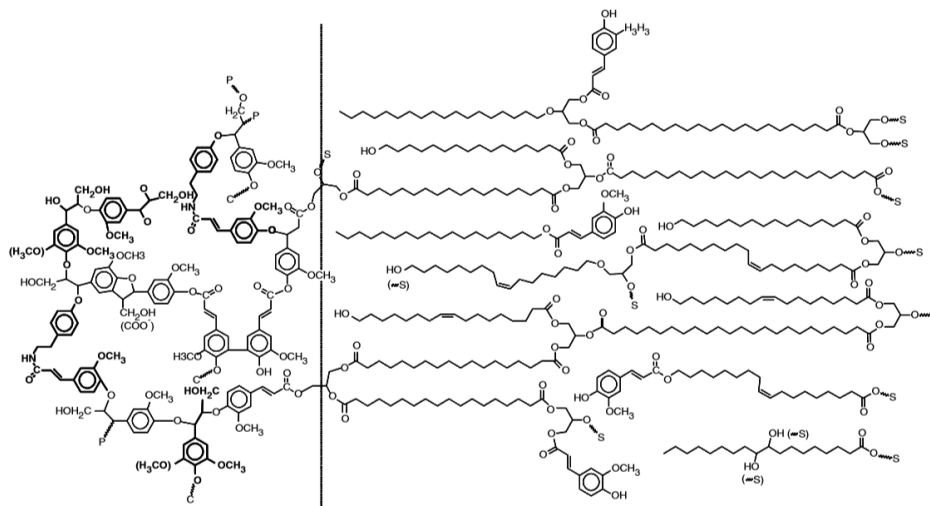
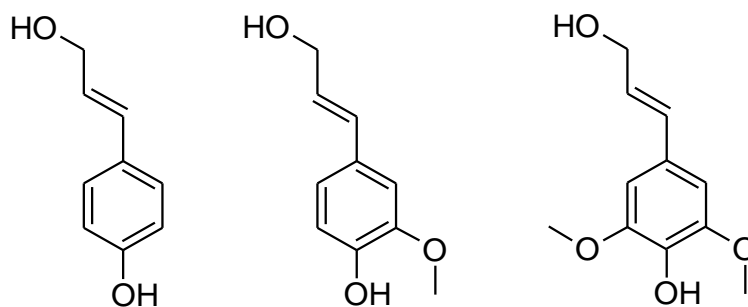


Figura 1.2 - Modelo da estrutura da suberina proposto por Bernards. [2]

A lenhina é das matérias-primas naturais mais abundante na natureza, no entanto é o segundo componente mais abundante na cortiça, cuja principal função é unir as fibras de celulose das plantas, conferindo-lhes rigidez e estrutura. É um produto polimérico aromático, constituído por três monómeros precursores: o álcool cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico (figura 1.3). [24].



**Figura 1.3** - Estrutura química do álcool cumarílico, álcool coniferílico e do álcool sinapílico, respetivamente, monómeros constituintes da lenhina.

Os outros componentes presentes na cortiça que estão em menor concentração são os polissacarídeos, ceras e extratáveis, componentes com massas moleculares mais baixas que apresentam importante influência tanto a nível das propriedades físicas como das químicas. Os polissacarídeos da cortiça são a celulose (homopolímero), e a hemicelulose (heteropolímero). A celulose é composta exclusivamente por monossacarídeos de glicose, ligados entre si de forma linear, por outro lado a hemicelulose pode conter na sua composição diferentes monossacarídeos e a apresenta uma estrutura ramificada. Estes polissacarídeos são os responsáveis pela estrutura rígida das células da cortiça, prevenindo que as mesmas colapsem. [2]

Os extratáveis são os componentes que apesar de fazerem parte da cortiça não se encontram ligados à sua estrutura principal, sendo facilmente extraídos com solventes, água ou outros solventes orgânicos. Os dois principais componentes que os compõem são: os compostos fenólicos e as ceras. As ceras são as responsáveis pela impermeabilidade da cortiça e são constituídas por compostos aromáticos e alifáticos, sendo extraídos por solventes apolares. [2] Tipicamente os compostos obtidos no efluente da cortiça por cozimento das pranchas em água tem como principal constituinte os compostos fenólicos.

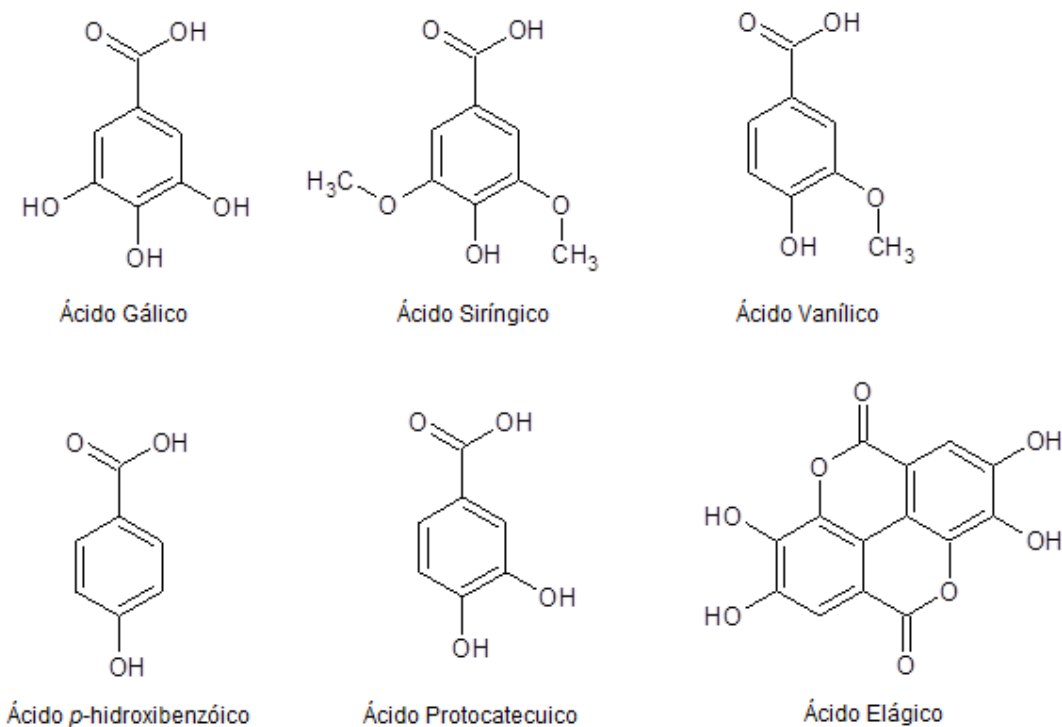
#### 1.1.2.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são os compostos minoritários presentes na constituição da cortiça. Os compostos fenólicos são facilmente extraídos por solventes caracterizados por apresentarem uma estrutura de baixo peso molecular [2], e por

possuírem anéis aromáticos funcionalizados com um ou mais grupos hidroxilo (figura 1.4). Esta família de compostos abrange não só os ácidos fenólicos mais simples como também, compostos polimerizados designados genericamente polifenóis com dois ou mais unidades fenólicas onde se incluem os flavonoides, taninos entre outros.

Como referido, a extração dos compostos fenólicos da cortiça pode ser realizada utilizando diferentes solventes. Na extração com água obtém-se um efluente constituído por moléculas com elevada polaridade e com maior conteúdo fenólico em comparação com a extração com outros solventes mais apolares.<sup>[25]</sup>

Apesar da composição fenólica da cortiça ter sido determinada pela primeira vez em 1998 utilizando HPLC, esta têm vindo a ser muito estudada.<sup>[26]</sup> Quanto aos compostos fenólicos presentes no efluente da cortiça vários estudos reportam que o principal composto presente na sua constituição é o ácido elágico, contendo ainda ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido quinico e ácido carboxílico de brevifolina (figura 1.4).<sup>[11,26-29]</sup>



**Figura 1.4** - Estrutura química de ácidos fenólicos.

Sendo estes metabolitos secundários, como dito anteriormente, muito abundantes nas plantas, despertam a atenção de investigadores, porque tem sido verificados que os compostos fenólicos apresentam elevada importância ao nível da saúde, contendo

propriedades antivirais<sup>[30]</sup>, anticancerígenas<sup>[11]</sup>, anti-inflamatórias<sup>[30]</sup>, antioxidantes<sup>[11,29,31]</sup> e antimicrobianas. <sup>[32]</sup> Para além destas propriedades os compostos fenólicos também alteram a atividade enzimática de várias enzimas e recetores celulares. <sup>[33]</sup>

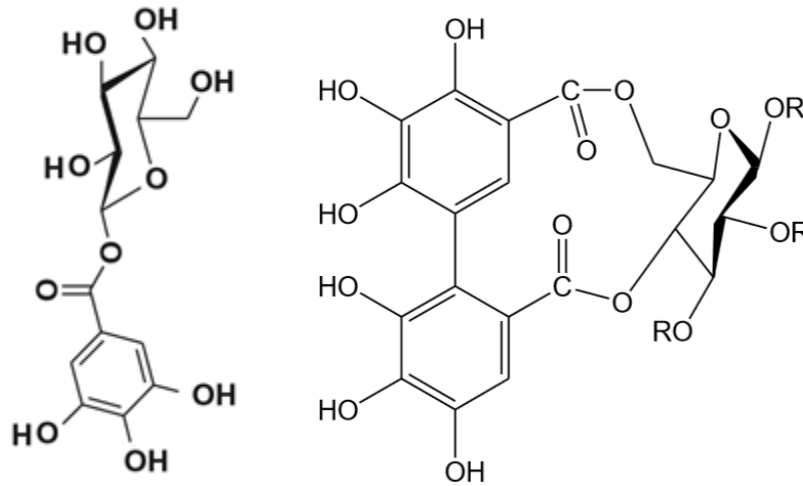
Por exemplo, em estudos já realizadas em linhas celulares do cancro do fígado (Hep-G2) verifica-se que o leite de soja, a maçã e o morango exercem atividade anticancerígena, devido a presença de determinados compostos como os flavonoides (quercetina e miricetina), derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido cafeico e ácido ferúlico) <sup>[31,34-35]</sup>. Relativamente a estudos em linhas celulares do cancro da pele (A375) verifica-se que o mel, devido a presença de flavonoides chrysin, tem propriedades anticancerígenas. <sup>[31,34,36]</sup>

### **Taninos**

Os taninos são bastante abundantes em várias espécies de plantas, em particular no sobreiro (*Quercus spp.*), podem estar presentes no fruto (bolota), na cortiça ou nas folhas, e pensa-se que protejam as plantas contra infeções. Os taninos apresentam massas moleculares entre os 300 e os 20 000 Da, e compreendem um grupo de componentes com uma grande diversidade, podendo ser classificados em dois tipos: não hidrolisáveis (condensados) e hidrolisáveis. <sup>[25,37]</sup>

Os Taninos condensados são compostos de alto peso molecular, consistindo nos flavonóides poliméricos ou oligómeros, que compreendem monómeros de catequinas (flavanol) e de leucoantocianidinas (flavandiol) ligados por pontes de carbono entre as várias sub-unidades do flavanol. <sup>[37,38]</sup>

Os taninos hidrolisáveis têm um peso molecular compreendido entre os 500 e os 5000 Da<sup>[39]</sup>, podem ser fracionados em componentes simples, através do seu tratamento com água quente ou enzimas. São considerados poliésteres de glucose, ou seja, contêm um núcleo de glicose ou outro álcool polí-ol com um ou mais ácidos polifenólicos ligados ao núcleo. <sup>[38,40]</sup> Subdividem-se em 2 categorias: os galotaninos, que resulta da esterificação do ácido gálico vulgarmente com a D-glucose e os elagitaninos<sup>[41]</sup> são os que estão representados em maior quantidade no que toca aos taninos presentes na cortiça, como o roburina, grandinina, castalagina e o vescalagina<sup>[12,25-26]</sup>, sendo que por hidrólise libertam ácido elágico que se apresenta em grande abundância no efluente da cortiça (figura 1.5). <sup>[11,26-29]</sup>



**Figura 1.5** - Estrutura química de dois taninos hidrolisáveis, galotanino<sup>[41]</sup> e elagitanino<sup>[11]</sup>.

Os taninos devido a sua estrutura química apresentam propriedades como a capacidade de ligação com: proteínas, compostos básicos, pigmentos, compostos moleculares grandes, iões metálicos e também apresentam atividades antioxidantes.<sup>[42]</sup>

Devido as suas características ácidas e adstrigentes, os taninos são compostos com valor comercial, tradicionalmente utilizados na indústria do couro permitindo transformar a pele em couro, através da sua ligação a proteínas da pele dos animais, por exemplo o colagénio, fazendo estas precipitar<sup>[43]</sup>, produzindo couro de elevada qualidade.<sup>[18,40]</sup> Tendo ainda aplicações noutras indústrias, como no tratamento de águas residuais, através da remoção de metais pesados e contaminantes orgânicos.<sup>[44]</sup>

## 1.2. Potenciais Biológicos dos Compostos Fenólicos

Os fitoquímicos, produtos químicos naturais provenientes de plantas, mais propriamente os produtos secundários contêm numerosas atividades e potenciais.<sup>[37]</sup> Neste trabalho será abordado o potencial antioxidante dos compostos fenólicos extraídos do efluente da cortiça como também a sua capacidade de proteção contra espécies oxidantes e radiação ultravioleta.

### 1.2.1. Potencial Antioxidante

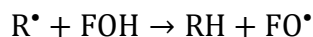
As espécies reativas de oxigénio (ROS) são produzidos naturalmente no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos, o excesso de ROS pode ser atenuado através da utilização de uma variedade de antioxidantes, que servem para contra balancearem o efeito do stress oxidativo, seja por retardamento ou inibição da

oxidação do substrato, por eliminação de radicais livres ou pela diminuição do stress oxidativo. [34,45]

Os radicais livres, o radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), ião superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), substâncias que contêm um ou mais eletrões desemparelhados apresentando elevada reatividade [40], e outros oxidantes não radicais como por exemplo o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), são uns dos grandes potenciadores de doenças como o cancro [46, 47], disfunções cerebrais [48] e diabetes [49-52], uma vez que em excesso levam ao stress oxidativo, ou seja, levam a oxidação de lípidos, de proteínas e do DNA. [45]

As plantas são bons produtores de antioxidantes com capacidade de controlar o stress oxidativo, tendo sido realizados inúmeros estudos utilizando os extratos naturais que contenham compostos fenólicos como o extrato de folhas e da cortiça, verificando que apresentam boas atividades antioxidantes. [11,31,53]

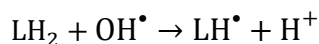
Os compostos fenólicos (FOH), são bons antioxidantes, por a sua estrutura química possuir um ou mais grupos hidroxilo ligados a pelo menos um anel aromático, tendo uma elevada capacidade de doar um átomo de hidrogénio a um radical livre ( $\text{R}^\cdot$ ), estabilizando o radical formando um radical fenóxi ( $\text{FO}^\cdot$ ). [31,34],



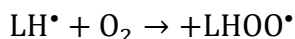
O radical fenóxi ( $\text{FO}^\cdot$ ) é relativamente estável por ressonância e uma nova cadeia não é facilmente iniciada. Mas o  $\text{FO}^\cdot$  tem a capacidade de reagir com outro radical livre ( $\text{R}^\cdot$ ), funcionando como terminador de cadeia, diminuindo a quantidade de espécies reativas e oxidantes. [34]



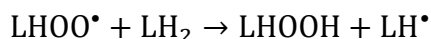
A peroxidação lipídica (PL) caracterizada pela deterioração oxidativa de ligações duplas carbono-carbono de um lípido, podendo ser diminuída com a utilização de antioxidantes. A PL começa com a extração de um átomo de hidrogénio de uma cadeia polisaturada de um lípido ( $\text{LH}_2$ ) por intermédio de uma espécie reativa de oxigénio, como o radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ) formando um radical alquilo lipídico ( $\text{LH}^\cdot$ ):



O radical alquilo lipídico ( $\text{LH}^\cdot$ ) por sua vez pode reagir com oxigénio molecular originando um radical peróxido ( $\text{LHOO}^\cdot$ ).



Este radical formado, pode ainda reagir com outros lípidos formando lípidos hidroperóxido (LHOOH) e um novo radical alquilo (LH<sup>•</sup>). [45]



Os radicais estão associados ao stress oxidativo, que como dito anteriormente, responsável por várias doenças. [46-52]

Relativamente ao efluente da cortiça, já foi analisado o seu potencial de inibição da peroxidação lipídica, onde foi verificado que esta apesar de conter compostos fenólicos com potencial antioxidante como o ácido elágico e o ácido gálico, este potencial quando analisado do efluente da cortiça não apresentou resultados conclusivos devido a uma possível interação com os açúcares presentes na amostra. [11,54]

As espécies reativas de azoto (RNS) também estão associadas ao stress oxidativo, são uma família de moléculas derivadas do óxido nítrico (NO) e o anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). O óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) é um radical livre que funciona na célula como molécula de sinalização, afetando a neurotransmissão, vasodilatação, e algumas funções cardiovasculares. [55] “Sozinho” o NO<sup>•</sup> não apresenta qualquer reatividade, mas reage rapidamente com o oxigénio molecular formando radicais de azoto, RNS. [56] Para além dos ROS é necessário também neutralizar os RNS, para evitar a oxidação das biomoléculas muitas vezes associadas a estados de doenças. A elevada formação desta espécie química pode dar origem ao stress nitrosamínico, que leva a formação de nitrosaminas, compostos cancerígenos, que interferem na função das proteínas e provocam fragmentação do DNA e oxidação lipídica, semelhante ao stress oxidativo. [57-58]

## **1.2.2. Potencial Protetor**

### **1.2.2.1. Dano Oxidativo Induzido pelo TBHP e pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

As espécies reativas de oxigénio (ROS), dentro de certos limites são essenciais para manter a homeostasia, tendo um papel importante no mecanismo de defesa do hospedeiro contra infeções estando ainda envolvidas na regulação da resposta proliferativa, e são utilizados como moléculas de sinalização participando em respostas do crescimento celular, diferenciação e apoptose. [44,59] Apesar do corpo humano apresentar mecanismos de defesas contra estas espécies, em quantidades excessivas o corpo deixa de poder controlar todas as espécies ocorrendo o stress oxidativo das células. [60]

Quando o stress oxidativo é muito excessivo, a sobrevivência das células depende da capacidade das mesmas para se adaptarem ou resistirem levando a reparação ou substituição das biomoléculas danificadas pelo stress. [59]

O hidroperóxido de *ter*-butilo (TBHP), é um hidroperóxido orgânico que é conhecido por causar stress oxidativo pois é produtor de ROS. Este composto quando libertado no ar, solo e água subterrânea durante a sua produção em estações de tratamento de águas residuais, causa desconforto gastrointestinal, irritação dos olhos e problemas a nível sistema respiratório, devido a sua toxicidade. [61]

A nível celular, tanto o TBHP como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) provocam uma rápida peroxidação lipídica e uma rápida perda da viabilidade celular, uma vez que estes compostos entram facilmente dentro das células devido a alta permeabilidade da membrana. [62,33]

Vários estudos sugerem que há efeitos benéficos dos compostos polifenólicos contra a toxicidade induzida pelo TBHP [63-65] e pelo  $H_2O_2$  [66], verificado que linhas celulares do cancro da medula óssea (SH-SY5Y) quando incubadas, inicialmente, com extrato da cortiça e depois com  $H_2O_2$  apresentam maior viabilidade celular em comparação aos ensaios sem proteção do extrato, ou seja, a cortiça apresenta propriedades protetoras contra ROS, mais propriamente contra o  $H_2O_2$ . [33 - 67]

### **1.2.2.2. Dano induzido pela radiação UVC**

A radiação ultravioleta (UV), é uma das causas do envelhecimento prematuro, disfunções do sistema imunitário e responsáveis por alguns tipos de cancro da pele, embora a pigmentação da pele auxilie na mitigação desses efeitos, a melanina não é totalmente protetora contra os raios UV. [68] O excesso de exposição a radiação UV é uma das causas de formação de ROS, perturbando o balanço redox normal das células levando ao stress oxidativo. [59,69]

O espectro da radiação solar ultravioleta, pode ser dividido em três segmentos: onda curta (UVC 200-290 nm); onda média (UVB 290-320 nm) e de onda longa (UVA 320-400 nm), que apresentam características diferentes no que toca ao limite de eficiência na penetração da pele. Neste trabalho foi utilizada a radiação ultravioleta de onda curta. UVC espectro caracterizado por conter enormes energias que podem potencialmente gerar ROS e induzir uma série de danos prejudiciais como mutações e danificação das moléculas de DNA. [68]

Como referido anteriormente, os compostos fenólicos apresentam elevadas atividades antioxidantes, é de esperar que os compostos fenólicos presentes no efluente da cortiça tenham a capacidade de proteger as células da pele, contra os efeitos adversos da radiação UV. [26] Estudos realizados foram verificados que polifenóis, flavonoides, carotenos, tocoferóis e vitaminas apresentam benefícios fotoprotetores [67,70], como por exemplo os polifenóis presentes no chá verde, a silimarina do cardo do leite e as proantocianidinas presentes nas sementes de uva. [68]

Para além da capacidade antioxidante dos polifenóis naturais estes por apresentarem cor, têm também a capacidade de absorver radiação UV quando aplicados topicamente como protetor solar, sendo que só tem capacidade de absorver parte da energia do espectro de UVC. [68]

### **1.2.3. Potencial de Inibição da Enzima de Acetilcolinesterase**

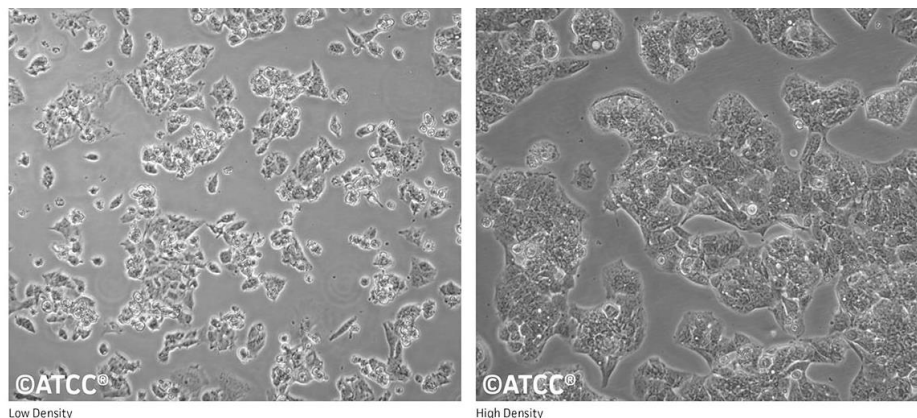
Portugal é dos países com maior prevalência de demência, onde em 2017 em cada mil pessoas 19,9 pessoas sofriam desse problema, apresentando um valor acima da média. Sendo que o Japão, o país com mais pessoas afetadas com a doença de Alzheimer (23,3 em cada 1 000 pessoas). [71]

A demência consiste na perda de funções cerebrais que ocorre em certas doenças, esta condição dificulta muitas funções mentais como a linguagem, a perceção, o comportamento emocional, e as capacidades cognitivas e de personalidade. [72]

A principal causa da demência irreversível é a doença de Alzheimer que consiste num transtorno neurodegenerativo progressivo e fatal que se manifesta pela deterioração cognitiva e da memória. Esta doença é uma doença multifactorial, no entanto é frequentemente associada a redução da atividade enzimática envolvida na síntese de acetilcolina (ACh) ou pela excessiva degradação da ACh por colinesterases, na fenda sináptica. [33,72-73] Sendo a acetilcolina um mediador químico com a função de transmitir informações entre neurónios, importante para a manutenção das funções fisiológicas humanas. [72-74]

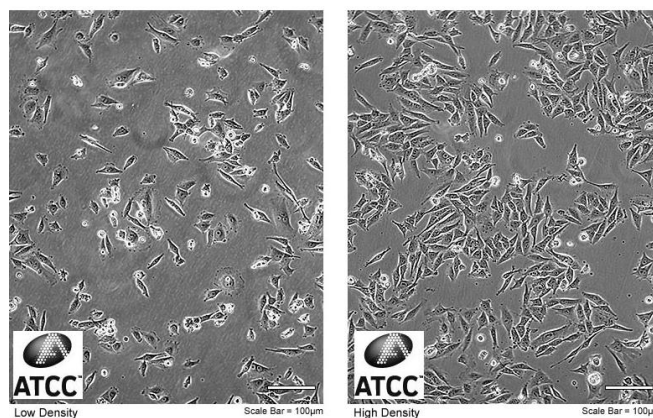
Apesar de não existir ainda cura para a doença de Alzheimer, os fármacos utilizados para o tratamento desta doença, são baseados na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). A AChE permite um aumento nos níveis cerebrais de acetilcolina, tendo como alvo as sinapses colinérgicas. Visto que a AChE é uma enzima acetilcolina hidrólase, com atividade esterase tendo como função hidrolisar o neurotransmissor de ACh (figura 1.6), nas sinapses colinérgicas presentes no sistema





**Figura 1.7** - Linha celular HEP-G2 do cancro do fígado. [77]

A linha celular A375, consiste numa linha celular humana do cancro da pele mais propriamente do melanoma maligno, de uma mulher de 54 anos (figura 1.8), utilizada como células modelo das células da pele saudáveis. [77]



**Figura 1.8** - Linha celular A375 do cancro da pele. [77]

Normalmente, os compostos fenólicos não demonstram toxicidade sobre as células. [11]

### 1.3. Tecnologia de Membranas

No processo industrial da cortiça, as primeiras etapas consistem na limpeza, desinfecção e humedecimento da cortiça crua, para tal a cortiça é cozinhada em água quente (~100°C), resultando na formação do efluente da cortiça que contém uma mistura complexa de compostos com elevado conteúdo fenólico. Existem nos dias de hoje alguns processos químicos de purificação deste efluente, de forma a poder ser libertada no meio ambiente, tais como, processos utilizando oxidantes, radiação UV e reagentes de Fenton. Contudo, devido ao elevado consumo e custo de reagentes tende-se a descobrir novas formas de tratamento. Uma destas novas abordagens consiste na

utilização da tecnologia de membranas que não só permitem a remoção dos compostos orgânicos com custos e impactos ambientais reduzidos, como também a sua separação para posterior valorização para aplicações. [15,78]

A tecnologia de membranas consiste num processo de filtração, que por sua vez é definido como o processo de separação de dois ou mais componentes de uma corrente de alimentação através da diferença de tamanho das partículas. Ao contrário dos restantes tipos de filtração, a filtração com membranas tem a capacidade de separar solutos dissolvidos em líquidos e misturas de gases. [79]

As membranas sintéticas consistem numa barreira permeável ou semipermeável, produzidas a partir de diferentes materiais, que restringem o transporte de várias espécies químicas de uma forma bastante específica. Levando a separação dessas substâncias que se encontram dissolvidos em líquidos ou suspensos. [80] Pressupõe a passagem de uma corrente de alimentação sobre uma membrana dando origem a outras duas correntes, uma denominada de concentrado e outra de permeado. A corrente de permeado é a corrente que contém os produtos com capacidade de atravessar a membrana, e por outro lado a corrente concentrado abrange os produtos que não conseguiram penetrar a mesma. [54,81]

### **1.3.1. Breve História das Membranas**

O transporte de água ou solventes através de uma membrana semipermeável, osmose, já é conhecido desde 1748 quando Abbé Nollet observou que a água difunde de uma solução diluída para uma mais concentrada quando separada por uma membrana semipermeável. Apesar de ser conhecido desde 1748 apenas em 1855 é que foi desenvolvida a primeira membrana sintética, feita de nitrocelulose. [83]

A primeira membrana comercial para aplicações práticas do processo de microfiltração foi manufaturada pela *Sartorius Company* na Alemanha em 1920, a nível de ultrafiltração em 1930, no entanto, estas membranas eram apenas utilizadas a escala laboratorial. A nível industrial, foram desenvolvidas em 1955 nos Estados Unidos da América, membranas de eletrodialise com aplicação na dessalinização, relativamente ao processo de ultrafiltração com função de concentrar macromoléculas em 1960. [79,82] Apesar de em 1960 se terem descoberto os elementos das membranas atuais, eram apenas utilizadas em pequenas utilizações industriais, visto que os processos com membranas sofriam de quatro grandes problemas: pouco confiáveis, demorados, pouco seletivos e muito caros. Só mais recentemente é que os problemas foram ultrapassados tornando o uso de membranas bastante comum. [83]

### **1.3.2. Classificação, Natureza e Estrutura das Membranas**

As membranas incluem variados materiais e estruturas, podendo ser homogéneas ou heterogéneas, grossas ou finas (100 nm – 1 cm), possuir uma estrutura simétrica ou assimétrica, podendo estar no estado sólido ou líquido ser neutras ou possuírem carga.

As membranas podem ser classificadas consoante o tipo de material, tipo de estrutura e tipo de fabrico.

Relativamente ao tipo de material que as constituem podem ser orgânicas e inorgânicas. As membranas orgânicas são normalmente feitas de vários polímeros, tais como: acetato de celulose (CA), poliamida (PA), polissulfona (PS) e polipropileno (PP). As inorgânicas, têm vindo a ser comercializadas desde 1980, devido as suas vantagens de elevada força mecânica e estabilidade térmica e química, por outro lado têm elevada fragilidade podendo ser facilmente danificadas. As matérias que as compõem são os vidros porosos, grafite, porcelanas e óxidos metálicos. <sup>[83]</sup> As membranas utilizadas neste trabalho são membranas orgânicas de acetato de celulose.

As estruturas das membranas podem variar entre dois tipos, microporosas (simétricas) e assimétricas. As membranas microporosas são caracterizadas pelos seus poros, este tipo de membrana tem como objetivo a rejeição de todas as espécies que contenham dimensões superiores ao diâmetro do poro, não querendo dizer que o tamanho do poro seja igual ao tamanho da menor partícula rejeitada, isto é, frequentemente é observado que os poros são muito maiores do que as partículas que retêm, devido à existência de outros mecanismos de transporte. As partículas de tamanho similar ao poro podem penetrar parcialmente neles bloqueando-os. <sup>[82,84]</sup>

A maior parte dos processos de ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa fazem uso de membranas assimétricas, que contêm uma camada densa fina (< 0,5 µm, camada ativa), que determina a taxa de transporte, suportada por uma subcamada porosa (50-200 µm) que atua apenas como suporte. Estas podem ser integrais ou compostas, consoante se a camada ativa e de suporte são constituídas ou não pelos mesmos materiais. São as mais utilizadas nos processos de separação, visto que apresentam elevadas capacidades de permeação, elevados coeficientes de rejeição e elevada resistência mecânica. Outras das grandes vantagens deste tipo de membrana é o facto de evitar melhor o fenómeno de colmatação. <sup>[54,79,84]</sup>

A porosidade de uma membrana depende, entre outros fatores, do método de preparação utilizado. A produção de membranas assimétricas utiliza o método de

inversão de fases. Este método foi desenvolvido em 1974 por Kunst e Sourirajan, o qual resulta da imobilização do gel de polímero antes da completa evaporação do solvente, ou seja, ao polímero é adicionado um solvente volátil e um promotor de poros, quando a solução é depositada numa placa de vidro permite que o solvente evapore, resultando no aumento da concentração de polímero na interfase entre a solução e o ar, formando uma fina camada de polímero sólido no topo. A seguir ao ser imersa num meio com um não solvente ocorre a solidificação do polímero. [79,85]

Tanto a natureza como a estrutura da membrana, são os fatores que determinam o tipo de aplicações a que a membrana pode ser utilizada, desde a separação de partículas microscópicas até a separação de moléculas de tamanho e formas similares.

Dependendo do tipo de processo utilizado as membranas podem ser classificadas como membranas de microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose inversa, eletrodialise, pervaporação e separação gasosa. Podem ainda ser utilizadas em diferentes módulos em módulos planos, tubulares, fibras ocas ou enrolados em espiral. [84] Em 1972 foi desenvolvido o processo de ultrafiltração, utiliza pressões baixas, que por sua vez é muito similar a microfiltração, o poro das membranas utilizada neste processo têm diâmetros da ordem dos 0.002 e os 0.1  $\mu\text{m}$ , este processo têm a capacidade de remover muitas espécies de bactérias e de remover macrossolutos, mas permite a passagem da maioria das espécies iónicas inorgânicas. [86]

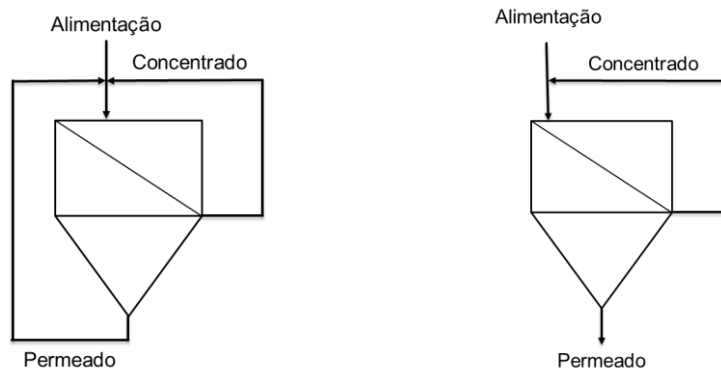
**Tabela 1.2** – Processos de membranas cuja força motriz é a pressão, tabela adaptada. [80,82,86]

| Processo de filtração      | Tipo de membrana            | Diâmetro da partícula         | Pressão       | Força motriz | Método de separação             | Aplicações   |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------|--------------|---------------------------------|--|
| <b>Microfiltração (MF)</b> | Microporosa                 | 0.1<br>10 $\mu\text{m}$       | 0.1<br>1bar   | Pressão      | Filtração                       | Esterilização<br>Clarificação                                      |
| <b>Ultrafiltração (UF)</b> | Assimétrica<br>Microporosa  | 0.002<br>0.1 $\mu\text{m}$    | 0.5<br>5 bar  | Pressão      | Filtração                       | Separação de macromoléculas em solução                             |
| <b>Nanofiltração (NF)</b>  | Assimétrica,<br>Filme denso | 0.0001<br>0.001 $\mu\text{m}$ | 10<br>40 bar  | Pressão      | Filtração<br>Solução<br>Difusão | Separação parcial de sais e solutos orgânicos com menos de 1000 Da |
| <b>Osmose Inversa (OI)</b> | Assimétrica,<br>Filme denso | <<br>0.001 $\mu\text{m}$      | 20<br>100 bar | Pressão      | Solução/Difusão                 | Separação de sais microsolutos                                     |

### 1.3.3. Modo de Operação

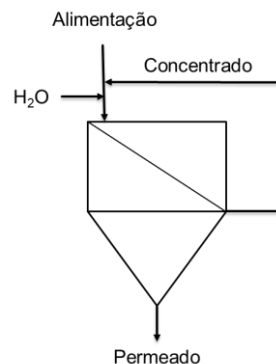
O sistema de membranas pode ser operado de diversas formas sendo elas, em modo de recirculação total, modo de concentração ou em diafiltração.

O modo de recirculação total (figura 1.9) ocorre quando tanto a corrente de permeado como de concentrado, são recirculadas para o tanque de alimentação. No modo de concentração (figura 1.9) apenas a corrente de concentrado volta à alimentação, enquanto que a corrente de permeado é recolhido, levando a saída dos compostos mais pequenos na corrente de permeado.



**Figura 1.9** – Esquema da tecnologia de membranas em modo de recirculação total (esquerda) e em modo de concentração (direita).

O modo de diafiltração (figura 1.10) é um modo similar ao anterior, com a diferença de que à medida que se remove permeado adiciona-se solvente à alimentação na mesma proporção, mantendo assim o elevado grau de seletividade através da manutenção do fluxo de permeação, este modo de operação leva a remoção de todos os compostos com a capacidade de atravessarem a membrana, ficando apenas na alimentação os compostos maiores dimensões. <sup>[54]</sup>



**Figura 1.10** - Esquema da tecnologia de membranas em modo de diafiltração.

#### **1.3.4. Problemas na Tecnologia de Membranas**

Os principais problemas quando se faz uso da tecnologia de membranas é a ocorrência do processo de colmatação e do processo de polarização de concentração. A colmatação é o processo que resulta da perda de performance das membranas, devido à deposição de substâncias dissolvidas ou suspensas na superfície externa da membrana, reduzindo a área ativa da membrana levando a redução do fluxo. Este processo pode ser reversível ou irreversível. <sup>[86]</sup>

Outro dos grandes problemas em utilizar-se membranas é a polarização de concentração que se refere à acumulação reversível de moléculas rejeitadas próximas da superfície da membrana. Este processo ocorre devido ao facto de os componentes da alimentação permearem a diferentes velocidades, formando um gradiente de concentração na fase fluída adjacente à membrana, fazendo com que a concentração de solutos na superfície da membrana seja maior do que no seio da alimentação. <sup>[83]</sup> A polarização por concentração é um fenómeno unicamente reversível, que pode ser reduzido através de alterações nas condições operacionais do sistema, levando à dispersão dos solutos retidos. <sup>[84]</sup>

## 1.4. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo a otimização do fracionamento do efluente da cortiça através da tecnologia de membranas de ultrafiltração, e na caracterização dos potenciais biológicos do efluente e das frações obtidas.

O plano de estudo passou inicialmente pela preparação das membranas de acetato de celulose pelo método da inversão de fases, seguindo da sua caracterização consoante a sua permeabilidade hidráulica, rejeição de sais e limite de exclusão molecular.

Após preparação e caracterização das membranas, procedeu-se ao fracionamento do efluente da cortiça, em modo de diafiltração e em modo de concentração, e identificação dos compostos presentes no efluente e nas respetivas frações através do método de cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD).

Por fim, foram determinados os potenciais antioxidantes e a toxicidade das diversas frações e do efluente em linhas celulares humanas do cancro do fígado (HEP-G2) e do do melanoma da pele (A375)

Adicionalmente foi analisado o potencial protetor da fração pesada que exibiu melhores resultados nos estudos anteriores contra o dano oxidativo induzido pelo TBHP e pelo  $H_2O_2$  e contra o dano por radiação UVC usando uma metodologia de superfície de resposta (RSM) com recurso ao design experimental (CCD).

Preliminarmente foram observadas as células do cancro da pele (A375), através da microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e de fluorescência, na presença e na ausência da fração.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Equipamentos

A instalação de ultrafiltração da ORM - tecnologia e ciência utilizada era constituída por uma bomba Leroy Somer<sup>®</sup>, um rotâmetro Georg Fischer e um porta membranas com área útil de membrana de 147,8 cm<sup>2</sup> e dois manómetros.

A condutividade das amostras foi lida através de um aparelho da WTW Multi 340i/SET e a cor através de um leitor da HACH DREL/2000.

De forma a desidratar/secar as amostras foi utilizado um liofilizador Heto<sup>®</sup> PowerDry LL 3000 com uma bomba Edwards RV3.

Na precipitação das mucilagens com etanol foi utilizado uma centrífugadora Beckman<sup>®</sup> J2-21M/E, com um rotor JÁ-20.1 e para evaporar o etanol das amostras foi utilizado um evaporador rotativo Büchi<sup>®</sup> Rotavapor R-200, constituído por um sistema de vácuo Büchi<sup>®</sup> B-169 e um banho Büchi<sup>®</sup> B-490.

A análise por cromatografia líquida de elevada resolução, HPLC-DAD, foi realizada utilizando um equipamento cromatográfico da Elite LaChrom<sup>®</sup> VWR Hitachi com um forno Column Oven L-2300, um detetor de fotodíodos Diode Array Detector L-2455 (VWR,EUA) e a separação através da coluna de fase reversa LiChroCART<sup>®</sup> 250-4 Lichrospher 100 RP-18 (5 µm).

No ensaio da quantificação de fenóis foi utilizada uma centrífuga Minispin<sup>®</sup> 5415D da Eppendorf<sup>®</sup>, na determinação da inibição da acetilcolinesterase foi utilizado um medidor de pH da WTW inoLab<sup>®</sup>. Para as leituras de absorvência foi utilizado um espectrofotómetro Shimadzu<sup>®</sup> UV-160A e um leitor de microplacas TECAN<sup>®</sup> Sunrise.

Ainda foram utilizadas duas balanças analíticas uma da Kern P8 para pesar os permeados e as alimentações recolhidas e outra da Sartorius<sup>®</sup> BP 110 S para os restantes ensaios. Foi usado um vortex Heidolph<sup>®</sup> REAX 2000, um ultra-sons Elma<sup>®</sup> Transsonic 460/H. E quando necessário incubar foi utilizado um banho GFL<sup>®</sup>1083 para temperaturas mais baixas e para as mais elevadas uma placa de aquecimento Ápis<sup>®</sup>.

Relativamente aos ensaios de proteção da radiação ultravioleta a lâmpada de UVC em uso foi da Philips TUV 11 W T5.

Por fim, o microscópio de varrimento utilizado foi o JEOL 5200LV com uma voltagem de 20 kV.

## 2.2. Reagentes

Para a produção das membranas foi utilizado acetato de celulose 30 000 g/mol da Sigma-Aldrich, acetona comercial e formamida da Scharlau. Na determinação da rejeição aos solventes orgânicos foi utilizado Dextrano 40 000 g/mol da Sigma-Aldrich (Dinamarca), Dextrano 70 000 g/mol da AppliChem (Darmstadt, Alemanha), Dextrano 100 000 g/mol e Polietilenoglicol (PEG) 20 000 g/mol da Fluka (Steinheim, Alemanha), Polietilenoglicol (PEG) de 3 000 g/mol, 6 000g/mol e 10 000 g/mol Merck (Hohenbrunn, Alemanha), Na rejeição de sais foi utilizado cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) da Fluka.

Na etapa da precipitação das mucilagens foi necessário etanol 96 % Carlo Erba.

Para a quantificação de Fenóis totais foi necessário o reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio decahidratado (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.10H<sub>2</sub>O) da Fluka, ácido tânico da Riedel-del Haën®, ácido gálico da Sigma e na quantificação dos taninos foi utilizado ainda polivinilpirrolidona (PVPP) da Sigma.

Na caracterização das amostras a partir do HPLC-DAD o Metanol (MeOH) utilizado foi da Riedel-de HaënTM, ácido trifluoroacético (TFA) da Merck® e água Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm, a 25 °C).

De forma a determinar a atividade antioxidante foi utilizado 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) da Sigma e Metanol da Riedel-del HaënTM. Na inibição da peroxidação lipídica foi utilizado ácido tiobarbitúrico, peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e 1-Butanol da Panreac, sulfato de sódio (FeSO<sub>4</sub>) e o ácido tricloroacético da Riedel-de HaënTM, hidróxido de sódio (NaOH) da J. T. Baker e tampão fosfato salino pH= 7,4 (PBS 1x, com NaCl 137 mM, fosfato 10 mM e KCl 2,7 mM). E na inibição de radicais de óxido nítrico foi utilizado reagente de Griess (1 % de sulfanilamina em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2 % e 0,1 % de hidrocloreto de N-1-naftilenediamine) e nitroprussiato de sódio (SNP) da VWR Chemicals.

Nos ensaios da inibição da acetilcolinesterase foi usada a enzima acetilcolinesterase (AChE), acetilcolina (AChI) e ácido 5-5'-ditiobis(2-ácidonitrobenóico) (DNTB) da Sigma, Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) e cloreto de sódio (NaCl) da Merck e cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) da Panreack.

Nos ensaios de cultura celular foi utilizado Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM com 4,5 g/L de glucose), Soro fetal bovino (FBS), L-glutamina (200 mM) e Tripsina (10 x) da Lonza, Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT)

e Azul de tripano da Sigma e antimicótico (100 U/mL de penicilina, 10 mg/mL Streptomycina, 25 µL/mL anfotericina B) da Sigma.

### 2.3. Preparação das Membranas

Na preparação das membranas, foi pesado acetato de celulose, formamida e acetona. As quantidades pesadas dependeram da porosidade que se pretendia obter na membrana, ou seja, quanto maior a quantidade de formamida maior a porosidade. Relativamente à membrana  $C_{A28}$ , foram pesados para um frasco rolhado 17 g de acetato de celulose, 28 g de formamida e 55 g de acetona, as quantidades pesadas para membrana  $C_{A36,5}$  foram 17 g, 36,5 g e 46,5 g, respetivamente. Valores otimizados da literatura. [11]

De modo, a impedir a evaporação da acetona, esta foi adicionada ao frasco em último lugar vedando-se de seguida com parafilme, antes deste ser colocado no agitador mecânico, durante aproximadamente 24 h. Passado esse tempo, verificou-se o conteúdo do frasco/polímero, uma vez que este continha bolhas, deixou-se repousar até ao desaparecimento das mesmas, até apresentar uma aparência homogénea, visto que a presença de bolhas aquando a preparação da membrana provoca irregularidades na mesma, o que não é desejável. Estando o polímero homogéneo, foi despejada uma pequena quantidade sobre a faca (figura 2.1) e fez-se arrastar a mesma de forma uniforme sobre uma placa de vidro. Tendo o cuidado de secar completamente o vidro, impedindo a formação de irregularidades. [11]

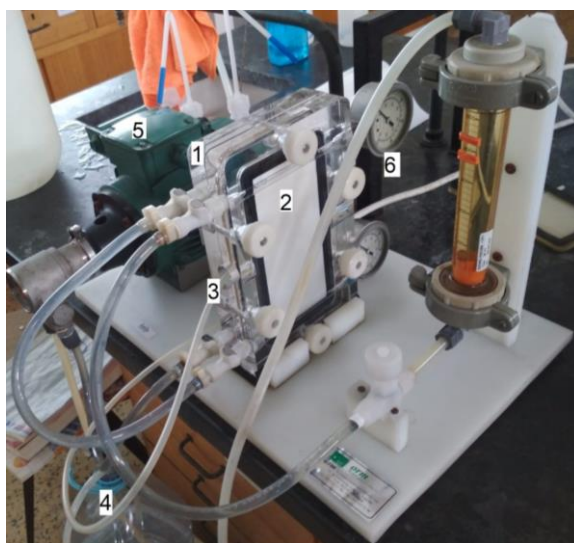


Figura 2.1 – Faca.

Estendida a membrana, esperou-se 30 s para a evaporação de parte da acetona e colocou-se o vidro num banho de água gelada (0 - 3 °C), verificando-se a solidificação do filme polimérico e conseqüente formação da membrana. Repetindo este procedimento até utilizar o polímero na sua totalidade.

## 2.4. Caracterização das Membranas

Preparadas as membranas através do procedimento descrito na alínea 2.3, procedeu-se a escolha das membranas de acetato celulose que apresentavam melhores características, ou seja, as mais uniformes/homogéneas, e cortaram-se do tamanho do suporte da membrana, podendo assim ser utilizadas na instalação de ultrafiltração (figura 2.2). Ao colocar a membrana no suporte teve-se o cuidado de colocar a camada ativa de cada membrana virada para o exterior. Procedendo a ligação da instalação de acordo com a figura 2.2.



**Figura 2.2-** Instalação de ultrafiltração, modelo Ray-Flow, Tech Sep. 1- Placas de contenções; 2- Membranas; 3- Saída do permeado; 4- Alimentação; 5- Bomba e 6- Manómetros.

Após a montagem das membranas na instalação procedeu-se à compactação das mesmas em modo de recirculação total, utilizando para tal água destilada, um caudal de 180 L/h, durante 2 h e a uma pressão de 3 bar.

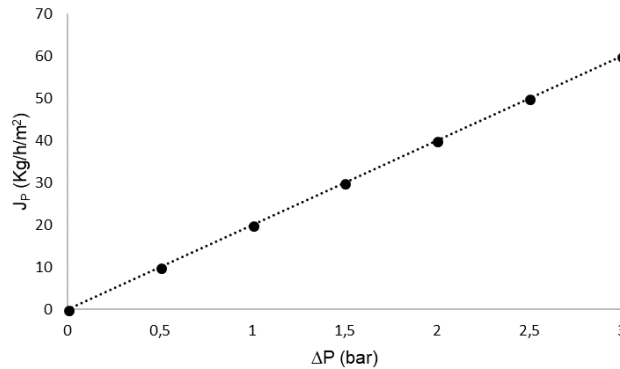
Compactadas as membranas começaram-se os ensaios de caracterização das membranas determinando, para cada membrana a permeabilidade hidráulica, limite de exclusão molecular, rejeição de sais e solutos orgânicos.

### 2.4.1. Permeabilidade Hidráulica

A permeabilidade hidráulica ( $L_P$ ) corresponde à capacidade de permeação da membrana à água pura, ou seja, é a quantidade de água que atravessa a membrana por unidade de tempo, de área superficial da membrana e de pressão transmembranar.

Para a determinação do valor de  $L_P$ , é necessário representar previamente o fluxo de permeado ( $J_P$ ) em função da pressão transmembranar ( $\Delta P$ ), obtendo-se uma

representação gráfica ilustrada na figura 2.3. Traçando o gráfico é possível determinar a equação da reta (equação 1), onde a permeabilidade hidráulica irá corresponder ao declive da reta.



**Figura 2.3** - Exemplo de representação gráfica para a determinação da  $L_P$ .

$$J_P = L_P \times \Delta P \quad (1)$$

A temperatura também provoca a variação da permeabilidade, e visto que ao longo do processo de permeação a mesma pode oscilar, devido a vários fatores como a temperatura ambiente e o aquecimento da bomba, é necessário corrigir o fluxo volumétrico tendo em conta a variação da viscosidade. Esta correção encontra-se representada na equação 2. [11,54,87-88]

$$J_P(25^\circ C) = \frac{J_P(\text{ensaio})}{0.901} \times e^{\left(-6.96 + \frac{2044}{273.15 + T(\text{ensaio})}\right)} \quad (2)$$

A permeabilidade hidráulica foi determinada, utilizando pressões transmembranares diferentes em cada ensaio (1, 1,5, 2, 2,5 e 3 bar), e um caudal fixo de 180 L/h. Recolhendo o permeado durante 1,5 minutos, para um erlenmeyer previamente tarado, sendo que se deixou estabilizar primeiro o sistema, durante 5 minutos.

Recolhido o permeado, procedeu-se à medição da sua temperatura e massa.

#### **2.4.2. Rejeição de Sais Monovalentes e Bivalentes**

O coeficiente de rejeição consiste na quantificação da capacidade de separação da membrana, sendo que a capacidade de uma membrana rejeitar preferencialmente um soluto/sal em detrimento de outro é designado por seletividade. Apesar de existirem três tipos de coeficientes de rejeição como o aparente, o intrínseco e o real, neste trabalho apenas foi determinado o aparente. Este é obtido experimentalmente e depende não só

do tipo de membrana em uso, como também do soluto, da pressão transmembranar e da hidrodinâmica do sistema. [11,88]

Matematicamente, a equação que relaciona o coeficiente de rejeição aparente ( $f$ ), com as concentrações do soluto, tanto a nível da alimentação ( $C_A$ ) como do permeado ( $C_P$ ), encontra-se descrita na equação 3. [11,88]

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

Preparando duas soluções mães de 3 L, uma utilizando um sal monovalente e outra utilizando um sal divalente, que neste caso experimental foram utilizados o cloreto de NaCl e o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respetivamente. Estas soluções foram dadas como alimentação ao sistema, o qual estava a ser operado a um caudal de 180 L/h, pressão de 1 bar e a temperatura ambiente. Deixando o sistema estabilizar durante cerca de 5 minutos.

Após estabilização do sistema mediu-se a condutividade e temperatura da alimentação e recolheu-se permeado durante 3 minutos, para um erlenmeyer previamente tarado, medindo a sua temperatura, condutividade e massa.

### 2.4.3. Rejeição de Solventes Orgânicos

O limite de exclusão molecular, MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) é um método de caracterização que descreve a distribuição do tamanho dos poros e capacidades de retenção da membrana. Está relacionado com o peso molecular de um soluto de referência cuja rejeição é superior a 90 %. Neste método ocorre a representação gráfica do  $\log(\frac{f}{1-f})$  em função dos pesos moleculares dos solutos de referência, nomeadamente de Polietilenoglicóis (PEG) e Dextranos, onde o MWCO corresponde ao peso molecular do soluto que é rejeitado a 90,9 %,  $\log(\frac{f}{1-f}) = 1$ . [11,54,87-88]

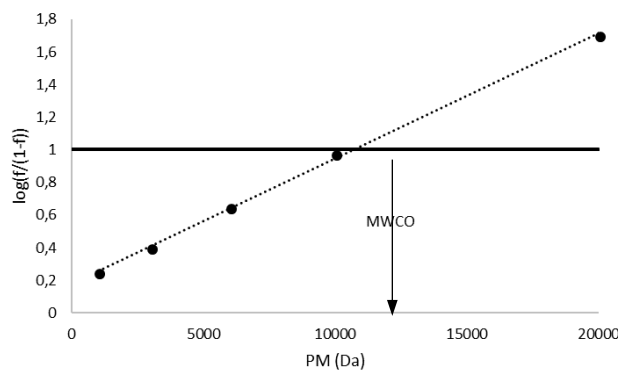


Figura 2.4 - Exemplo de representação gráfica para a determinação do MWCO.

Para determinar a rejeição aos solventes orgânicos, para a membrana C<sub>A36</sub> preparou-se 3 soluções de 3 L de Dextrano, uma de 40 000 g/mol, outra de 70 000 g/mol e por último de 100 000 g/mol, para a C<sub>A28</sub> utilizaram-se 5 soluções uma de Dextrano 40 000 g/mol, e quatro de Polietilenoglicol (PEG) com tamanhos de 3 000 g/mol, 6 000g/mol, 10 000 g/mol e 20 000 g/mol, apresentando cada solução uma concentração de 600 ppm. Utilizando as mesmas condições operatórias, que foram utilizadas para a determinação da rejeição de sais, e sendo a alimentação do sistema as soluções de Dextrano e Polietilenoglicol de 600 ppm. Após estabilização recolheu-se uma pequena quantidade da alimentação, de forma a determinar-se a sua temperatura e teor em soluto orgânico.

Recolhido o permeado mediu-se a sua temperatura, massa e o teor em soluto orgânico. Para determinar o teor em soluto orgânico de cada amostra, tanto de permeado como da alimentação, a sua deteção foi feita por índice de refração, uma vez que as amostras eram soluções binárias de água e soluto orgânico. Procedendo ainda a construção de curvas de calibração com os padrões de cada soluto orgânico, Dextranos e Polietilenoglicóis.

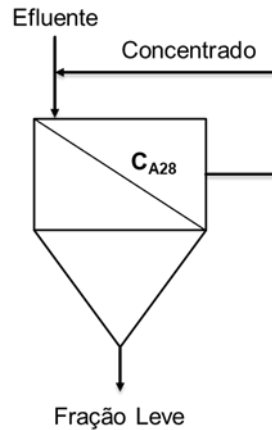
## **2.5. Fracionamento do Efluente da Cortiça por Tecnologia de Membranas**

Realizados os procedimentos para a caracterização da membrana, procedeu-se aos ensaios envolvendo o efluente da cortiça, obtendo a fração leve, média e pesada. Estes ensaios foram realizados a uma pressão de 2 bar e a um caudal de 180 L/h, utilizando a instalação representada na figura 2.2.

O efluente da cortiça (Montijo) consiste na água utilizada no cozimento de cargas de cortiça, sendo que cada carga é composta por cerca de 400 a 500 Kg de cortiça e por dia são cozidas 8 cargas, o efluente utilizado nesta atividade tinha sido usado durante 2 dias no cozimento de cerca de 6 400 a 8 000 Kg de cortiça.

### **2.5.1. Fração Leve**

Para a obtenção da fração leve, foi utilizada a membrana C<sub>A28</sub> e o efluente da cortiça como alimentação. O modo de operação do sistema foi em modo de concentração, onde se recolheu 350 mL da corrente de permeado (fração leve). Como ilustrado na figura 2.5.

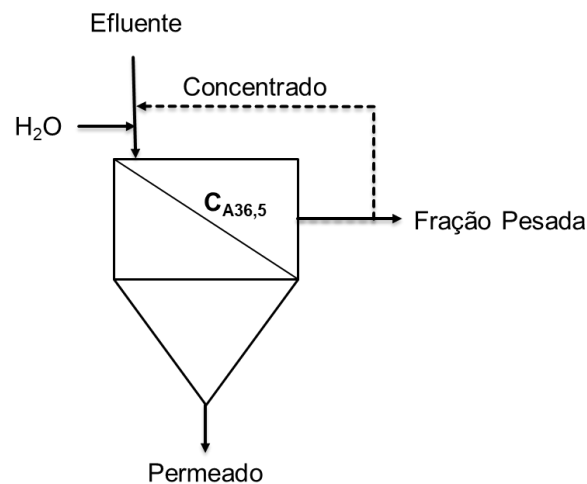


**Figura 2.5** - Esquema do processo de obtenção da fração leve, em modo de concentração.

### 2.5.2. Fração Pesada

O modo de operação do sistema de membranas utilizado para a obtenção da fração pesada, foi o modo de diafiltração, no qual à medida que foram removidos 200 mL de permeado foram adicionados 200 mL de água destilada à corrente de alimentação (efluente da cortiça). Ao ser recolhido o permeado, eram registados o tempo de recolha, a sua condutividade e a sua cor. Tendo o processo dado por terminado quando estes dois últimos parâmetros estabilizaram.

A fração pesada, consistiu na alimentação concentrada obtida.



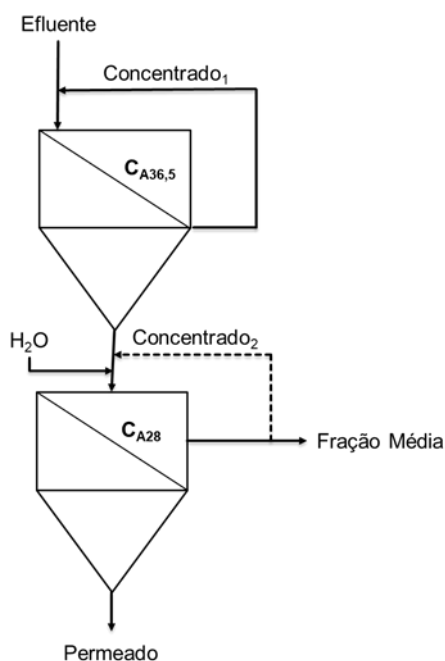
**Figura 2.6** - Esquema do processo de obtenção da fração pesada, em modo de diafiltração.

### 2.5.3. Fração Média

Diferentemente das duas frações anteriores, a fração média foi obtida utilizando as duas membranas, sequencialmente. Isto é, inicialmente foi recolhido 1,5 L de permeado usando a membrana  $C_{A36,5}$  e o efluente como alimentação. Seguidamente

esses 1,5 L de permeado foram utilizados como alimentação à membrana  $C_{A28}$  dando o concentrado origem à fração média.

Na primeira etapa de permeação utilizou-se o modo de concentração e na segunda um processo de diafiltração (figura 2.7).



**Figura 2.7** - Esquema do processo de obtenção da fração média, em modo de concentração e de diafiltração.

Para facilitar a conservação e a manipulação para a análise do potencial biológico, as frações e o efluente foram previamente congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e secas no liofilizador obtendo-se extratos secos.

## 2.6. Extração das Mucilagens por Precipitação com Etanol

Esta etapa teve como objetivo a separação das mucilagens (mistura de polissacáridos) dos restantes compostos presentes nas frações e no efluente de modo a concentrar os compostos fenólicos nos compostos recuperados após o fracionamento. A extração das mucilagens permitiu uma melhor caracterização do efluente e da fração leve, média e pesada através da cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD).

Para tal, foram preparadas soluções de 10 mg/mL em água destilada de cada fração e efluente, a seguir foi adicionado numa proporção de 1:5 de etanol a 96%, reservando a mistura em banho de gelo durante aproximadamente 2 min, a amostra foi então centrifugada durante 45 min a 4500 rpm.

Após centrifugação ocorreu a formação de duas fases uma de precipitado contendo as mucilagens e o sobrenadante contendo maioritariamente os compostos fenólicos. O sobrenadante retirado foi novamente sujeito ao mesmo tratamento de modo a ser removido o máximo de compostos fenólicos que pudessem ter ficado agarrados às fibras.

Concluídas as extrações, os sobrenadantes foram secos num evaporador rotativo, resultando nas frações e no efluente sem mucilagens, e o precipitado foi liofilizado, originando nas mucilagens do efluente e das frações.

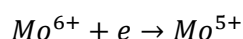
## **2.7. Caracterização do efluente e frações**

A caracterização do efluente e das frações, começou pela utilização de um método cromatográfico (cromatografia líquida de elevada resolução, HPLC-DAD), tanto das frações no seu estado natural como sem mucilagens e das suas mucilagens, estas últimas duas obtidas do procedimento descrito na alínea 2.6.

Foram ainda utilizados métodos como o do Folin-Ciocalteu para quantificação dos fenóis, o do DPPH, NO e dos TBARS na determinação do potencial antioxidante e por fim foi analisada a capacidade de inibição da acetilcolinesterase.

### **2.7.1. Quantificação dos fenóis totais**

O método de Folin-Ciocalteu (FC) baseia-se da transferência de eletrões que levam à redução do reagente de FC, constituído por Molibdênio (Mo) que sendo reduzido forma um complexo azul que absorve a 760 nm.<sup>[89]</sup>



Quanto mais compostos fenólicos existirem no efluente e nas frações maior será a coloração azul. Primeiro foi adicionado 200 µL de reagente de Folin-Ciocalteu 10 % (v/v), e 800 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> com uma concentração de 700 mM, a 1 mL do efluente ou frações fracionadas ou 1 mg extrato seco/mL do efluente ou das frações em água destilada. Deixando, de seguida, a mistura a agitar ao abrigo de luz. Passado, aproximadamente, 2 h de agitação registaram-se os valores de absorvência a um comprimento de onda de 760 nm. O mesmo procedimento foi realizado em duplicado.<sup>[11]</sup>

Por fim, foi construída uma curva de calibração utilizando várias concentrações de ácido tânico e ácido gálico e utilizando o procedimento descrito, possibilitando a quantificação dos fenóis totais em equivalentes de ácido tânico ou de ácido gálico.

### 2.7.1.1. Quantificação de Taninos

Como referido anteriormente, os taninos têm tendência a ligar-se às proteínas e outros polímeros<sup>[43]</sup>, tornando possível a sua quantificação com a separação dos mesmos dos restantes compostos fenólicos não tânicos, através da sua complexação com a polivinilpolipirrolidona (PVPP).

Para tal, a 100 mg de PVPP foi adicionado 2 mL do efluente ou frações fracionadas ou 2 mg extrato seco/ 2 mL do efluente ou das frações em água destilada. Com a adição do PVPP com o efluente ou frações, este foi conservado a 4 °C durante 15 minutos, e centrifugado a 12 000 g durante 10 minutos. Finalizada a centrifugação a mistura apresentava 2 fases (sobrenadante e precipitado) o precipitado consistia no complexo de PVPP com os taninos, e por sua vez os fenóis não taninos estavam presentes no sobrenadante. Com a separação das fases tornou-se possível a quantificação dos fenóis não taninos no sobrenadante utilizando o método descrito em 2.7.1, o método de Folin-Ciocalteu.

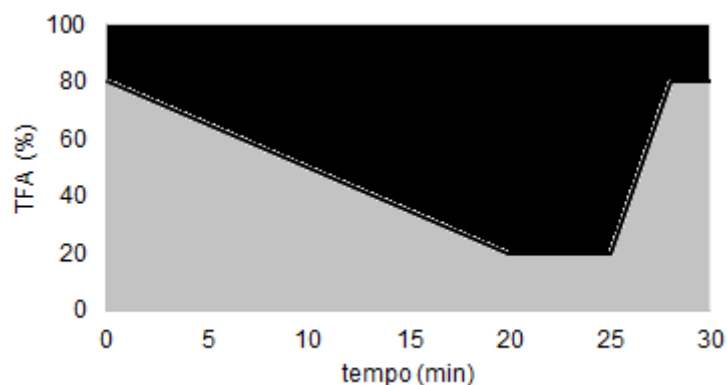
O cálculo dos taninos foi realizado através da equação 4.

$$\text{Taninos} = \text{Fenóis Totais} - \text{Fenóis Não Tânicos} \quad (4)$$

### 2.7.2. Cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD)

A análise por cromatografia líquida de elevada resolução, HPLC, por injeção automática das amostras tanto do efluente como das frações, foi efectuada num equipamento cromatográfico constituído por um forno a operar a 30 °C, um detetor de fotodíodos (DAD) que deteta entre os 200 nm e os 500 nm, numa coluna de fase reversa, um injetor automático e uma bomba.

As amostras analisadas continham uma concentração de 1 mg/mL, Com o injetor automático foram injetados 25 µL da amostra, num caudal de 0.8 mL/min de 2 solventes, o MeOH e o TFA numa proporção que ia variando com o tempo, começava com 20 % de MeOH e 80 % de uma solução de TFA e passados 20 min essa proporção apresentava um valor de 80 % de MeOH e 20 % de TFA, esta era mantida durante 5 minutos e de seguida gradualmente voltava-se a proporção inicial (figura 2.8).



**Figura 2.8** - Gráfico com a representação da variação de TFA (%) ao longo do tempo, HPLC-DAD.

Para determinar que compostos fenólicos se encontravam presentes no efluente e nas frações, foram obtidos os cromatogramas dos padrões de ácido vanílico, siríngico, gálico, elágico e o ácido quinico em concentrações de 1 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL.

De modo a melhorar a separação cromatográfica e identificação do ácido quinico e do gálico, no efluente e nas frações, foram mantidas as mesmas condições, mas dobrando o tempo de corrida em cada patamar.

### **2.7.3. Determinação da Atividade Antioxidante**

#### **2.7.3.1. Método Redução do Radical DPPH**

A avaliação da atividade antioxidante de um determinado composto ou mistura, pode ser realizada através do método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), radical livre estável devido a deslocalização de eletrões sobre a molécula, este método baseia-se na transferência de eletrões de um dador, composto com capacidade antioxidante, para o radical livre do DPPH, dando origem à sua forma reduzida estável, difenil-picrilhidrazina. O DPPH no seu estado natural devido a deslocalização de eletrões apresenta uma coloração púrpura que absorve a 517 nm e aquando sua redução na presença de agente antioxidantes, forma difenil-picrilhidrazina de coloração amarelada, podendo esta mudança de cor ser monitorizada através de métodos espectrofotométricos. <sup>[90-91]</sup>

Para tal, primeiro a solução de 0,002 % (m/v) de DPPH em Metanol foi preparada, tendo o cuidado de verificar se a absorvência da solução a um comprimento de onda de 517 nm se encontrava num valor de 0,7 UA, ajustando-se com DPPH ou Metanol. A 1 mL da solução de DPPH foram adicionados 25 µL da amostra a analisar, incubou-se ao abrigo de luz durante 30 min à temperatura ambiente, e por fim leram-se as absorvências a 517 nm.

De forma a determinar a atividade antioxidante foi necessário preparar também um controlo no qual se adicionou 25 µL de água destilada. As amostras de efluente e de fração foram preparadas com diferentes concentrações, entre os 3,5 - 0,25 mg/mL. A percentagem de atividade antioxidante (AA) foi determinada através da equação representada em baixo. No qual,  $A_{DPPH}$  corresponde a absorvência do controlo e a  $A_{amostra}$  a absorvência da amostra, sendo que a cada uma delas foi retirado o valor do branco.

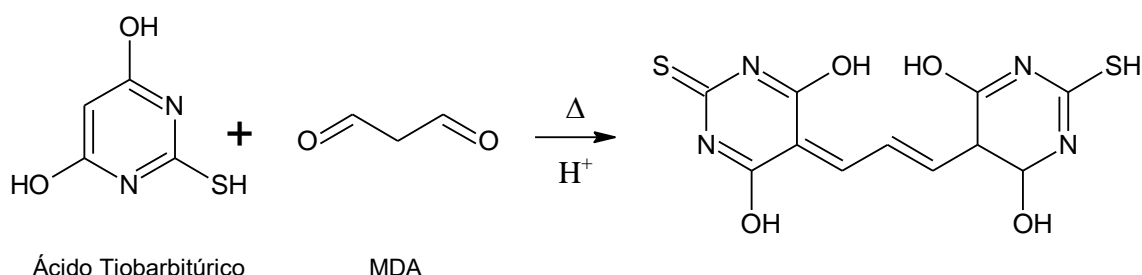
$$AA (\%) = \frac{100 \times (A_{DPPH} - A_{amostra})}{A_{DPPH}} \quad (5)$$

Após a determinação das atividades antioxidantes, foi calculado o  $EC_{50}$  que corresponde a concentração do composto que apresenta uma atividade antioxidante de 50 %. Com o objetivo de se comparar os valores obtidos com padrões, foi efetuado o mesmo procedimento para os padrões referidos.

### 2.7.3.2. Inibição da Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica (PL) é definida como a oxidação de lípidos contendo ligações duplas carbono-carbono.<sup>[92]</sup>

O processo de peroxidação lipídica dá origem a muitos aldeídos sendo o mais estudado o malondialdeído (MDA). Existem vários métodos para medir a quantidade de MDA, como a cromatografia gasosa, cromatografia líquida de elevada resolução e a eletroforese, onde o mais comum consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) ocorrendo a produção de um composto de cor rosa um aducto MDA:TBA (1:2), podendo este ser quantificado através de métodos espectrofotométricos a 535 nm.<sup>[52]</sup>



**Figura 2.9** - Esquema da reação do ácido Tiobarbitúrico com MDA, produzindo um aducto MDA:TBA (1:2) de coloração rosa.

O potencial antioxidante determinado através do método dos TBARS consiste na determinação e análise da concentração das amostras a testar que diminuem a

quantidade de substâncias reativas ao TBA por diminuição dos radicais resultantes da peroxidação lipídica.

Este método utilizado identifica a presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no efluente e nas frações, através da peroxidação lipídica induzida pelo ferro no salmão, dada pela reação de Fenton. [93]



Para o desenvolvimento deste método a 1 mL de amostra a analisar foram adicionados 10 mL de uma solução contendo 0,1 g de salmão/ mL de PBS 1x, e ainda 1 mL de  $\text{FeSO}_4$  15 mM e 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. Foram ainda preparados 2 controlos um com 0 % de oxidação e outro com 100 % de oxidação, no qual no de 0 % de oxidação foi adicionado 3 mL de PBS 1x e 1 mL da amostra, sem agentes oxidantes e no de 100 % de oxidação 0.5 mL de PBS 1x e 0.5 mL de água, e os agentes oxidantes nas quantidades referidas em cima, sem a amostra a analisar (efluente ou frações). As misturas foram então incubadas durante 1 hora a 37 °C.

Foram retirados 500  $\mu\text{L}$  da mistura reacional anterior e adicionados 250  $\mu\text{L}$  da solução contendo ácido tiobarbitúrico 1 % (em NaOH 0.05 M) e 250  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido tricloroacético 2.8 % (m/v) e incubadas em água a ferver durante 10 min. Após esse tempo arrefeceu-se num banho de gelo e foi adicionado posteriormente 2 mL de 1-Butanol. Com a adição do 1-Butanol verificou-se o aparecimento de 2 fases, onde a fase superior foi removida e registada a sua absorvência a um comprimento de onda de 535 nm.

Nas amostras a analisar, para a fração pesada prepararam-se diferentes concentrações de 10 a 1 mg/mL, mas para a fração leve, média e efluente foi determinado a inibição da PL de amostras com concentração de 10 mg/mL. Para determinar o valor de inibição da peroxidação lipídica das amostras de frações e efluente, foi utilizada a equação 6.

$$\text{Inibição PL (\%)} = 100 * \frac{A_{100\% \text{ oxidação}} - A_{\text{amostra}}}{A_{100\% \text{ oxidação}}} \quad (6)$$

Onde  $A_{100\% \text{ oxidação}}$  consiste no valor de absorvência do controlo com 100 % de oxidação e  $A_{\text{amostra}}$  a absorvência da amostra. Sendo que em cada valor foi subtraído o valor da absorvência do controlo com 0 % de oxidação.

Para a fração pesada foi determinado o valor de EC<sub>50</sub>, ou seja, concentração a qual a fração apresenta 50% de inibição de peroxidação lipídica, de forma a facilitar a análise dos valores obtidos.

### 2.7.3.3. Inibição da Captura de Radicais de Óxido Nítrico

O método de identificação da presença de nitratos e nitritos num determinado extrato segue a reação de diazotização de Griess. Esta reação foi descrita pela primeira vez por Johann Peter Griess<sup>[94]</sup>, baseada na reação de um ião nitrito e um grupo amina do ácido sulfanílico, originando um catião diazónio que ao reagir com a  $\alpha$ -naftilamina, origina um corante rosa. <sup>[95]</sup> O nitroprussiato de sódio (SNP) utilizado nesta reação vai gerar radicais de óxido nítrico em solução aquosa a pH 7,2, levando a competição dos sequestradores de NO com o oxigénio diminuindo a produção de iões de peroxinitrito.<sup>[55]</sup>

De forma a determinar a capacidade de inibição da captura de radicais NO<sub>x</sub>, foi preparada inicialmente uma solução de 5 mg/mL de fração pesada, a 500  $\mu$ L dessa solução foi adicionado 900  $\mu$ L de SNP 100mM, incubado durante 2,5 horas a uma temperatura de 25 °C. Após incubação dessa mistura foi adicionado 1mL de reagente de Griess. Por último, foi registada a absorvência de 1 mL de amostra a 540 nm.

Além dos ensaios com a fração pesada, também foram feitos 2 controlos um com 0 % de oxidação e outro com 100 % de oxidação, assim o 0% de oxidação foi feito com os 500  $\mu$ L de amostra e 900  $\mu$ L de água, sem a presença do SNP e o controlo de 100 % de oxidação com 500  $\mu$ L de água e 900  $\mu$ L de SNP 100mM, sem o efluente ou frações. A atividade antioxidante da fração pesada foi calculada, onde o valor do 0 % de oxidação foi retirado do valor da absorvência da amostra.

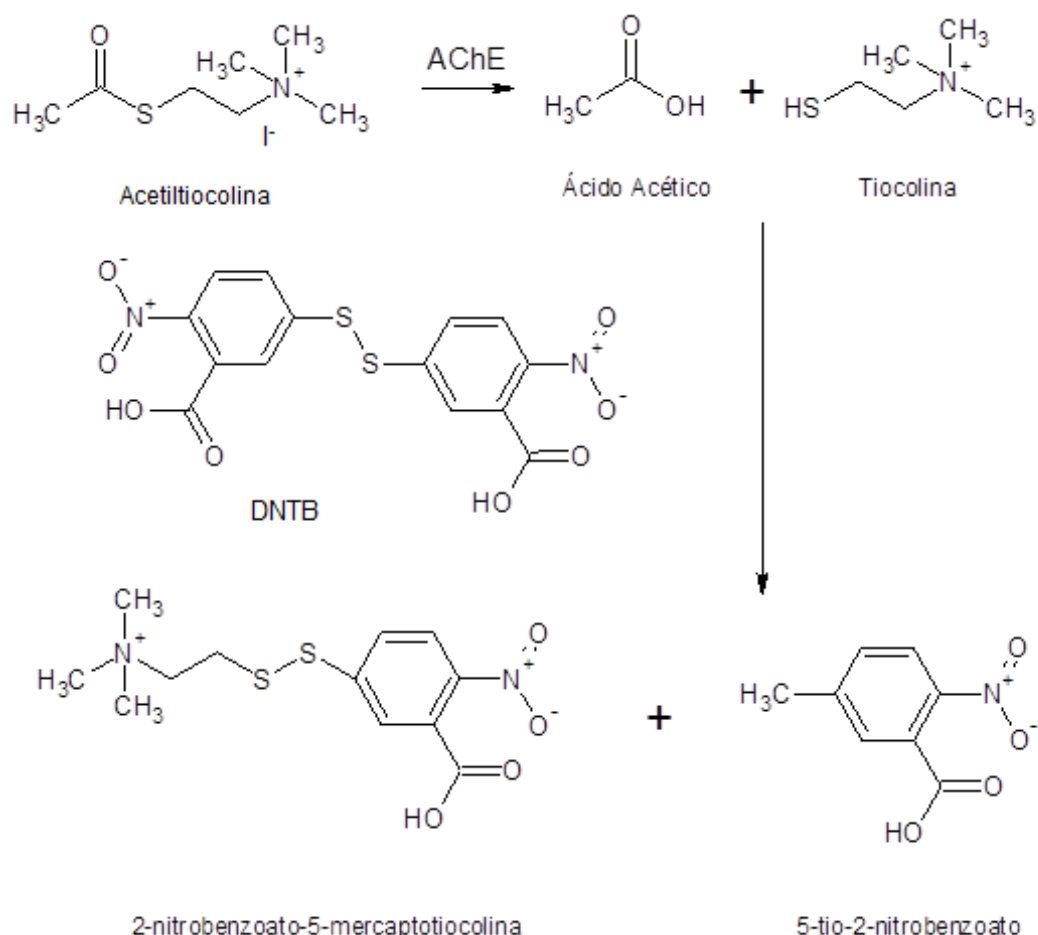
$$NO (\%) = 100 * \frac{A_{100\% \text{ oxidação}} - A_{amostra}}{A_{100\% \text{ oxidação}}} \quad (7)$$

### 2.7.4. Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas.

O método para determinar a atividade enzimática empregue neste trabalho é baseado no método de Ellman onde a hidrolise de um análogo à acetilcolina, a acetiltiocolina (AChI) pela AChE dando origem à Tiocolina que por sua vez reage com o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DNTB) presente na mistura reacional forma o 2-nitrobenzoato 5-mercaptotiocolina e um anião de coloração amarela o 5-tio-2-

nitrobenzoato que absorve a 405 nm e cuja taxa de formação permite quantificar a atividade enzimática.<sup>[96-97]</sup>



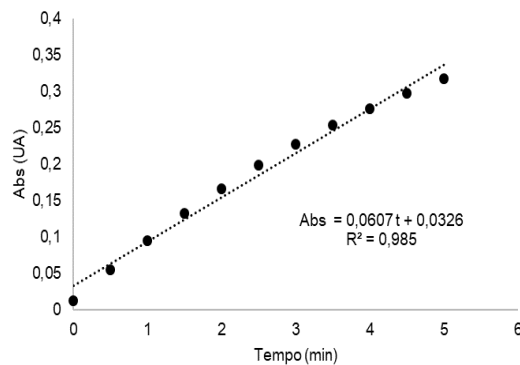
**Figura 2.10** - Esquema da reação de hidrólise da acetiltiocolina e da reação da tiocolina com o DNTB.

Na presença de uma amostra com potencial de inibição da AChE, a mistura reacional apresenta menor taxa de hidrólise da AChI e quanto maior o poder de inibição menor será essa taxa.

O método de determinação do potencial de inibição da AChE pelas amostras a testar começou pela avaliação da atividade enzimática na ausência das amostras a testar e posteriormente na presença de concentrações crescentes dessas amostras. Para tal, a 100  $\mu\text{L}$  de água destilada foi adicionado 325  $\mu\text{L}$  de tampão Tris s/sais (6,055 g/L e pH 8) e 25  $\mu\text{L}$  de AChE (a partir de uma solução de AChE *stock* constituída por 200  $\mu\text{L}$  de AChE mais 300  $\mu\text{L}$  de tampão Tris s/sais, com esse *stock* foi realizada uma diluição de 1:15 de tampão Tris s/sais) e agitou-se e deixou-se a repousar durante 15 min. Após esse tempo ocorreu a adição de 75  $\mu\text{L}$  do substrato AChI (partiu da solução

stock de AChI com uma concentração de 4,35 g/L, foi feito outro *stock* 7,5 %) e 475 µL de DNTB (1,2 g/L) em o tampão Tris com sais (2,928 g/L de NaCl e 4,338 g/L de MgCl<sub>2</sub>). Depois de adicionados estes dois últimos compostos, foram lidas as absorvências no espectrofotómetro a 405 nm durante 5 min. Simultaneamente, foi preparado o branco onde em vez da adição de 25 µL de AChE foi adicionado 25 µL de tampão Tris s/sais (6,055 g/L e pH 8).

Para avaliar a percentagem de inibição do efluente e das frações, foram substituídos os 100 µL de água por 100 µL da amostra a testar. Obtendo-se gráficos do género da figura 2.11.



**Figura 2.11** - Gráfico de variação da absorvência em função do tempo.

A partir do gráfico da figura 2.11 foram retirados os valores do declive da reta (velocidade de atuação da enzima, ou seja, velocidade que a AChE realiza a hidrolisar do substrato de acetilcolina presente no meio), e determinado a percentagem de inibição da AChE, equação 8.

$$\text{Inibição da AChE (\%)} = \frac{100 \times (m_{\text{amostra}})}{m_{\text{controlo}}} \quad (8)$$

Tendo os valores de inibição da AChE foram traçados gráficos, de variação da percentagem de inibição em função da concentração de efluente e fração utilizado. Possibilitando o cálculo do AC<sub>50</sub>, que corresponde a 50 % da inibição da enzima.

Com o objetivo de se comparar os valores obtidos com padrões, foi determinado o poder inibitório do ácido elágico, gálico, quinico, vanílico e siríngico, com concentrações de 10, 5, 2 e 1 mg/mL.

## 2.8. Cultura de Linhas Celulares Cancerígenas Humanas

As linhas celulares utilizadas neste trabalho foram as do cancro do fígado, adenocarcinoma hepático (Hep-G2) e do melanoma da pele (A375), estas foram incubadas a uma temperatura de 37 °C numa estufa com 5 % de CO<sub>2</sub>, em meio

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS), 0,1 % de L-glutamina (2 mM) e 0,1 % de antimicótico. Estas foram introduzidas em frascos T25 (25 cm<sup>2</sup>) e quando ocupavam cerca de 80% da superfície do frasco foram transferidas para frascos T75 (75 cm<sup>2</sup>), por tripsinização.

A tripsinização consiste na remoção do meio de cultura e a lavagem de pelo menos 2 vezes com PBS 1x, após lavagem é adicionado as células tripsina 2x 0.5 mL ou 1 mL dependendo do tamanho do frasco se este for T25 ou T75, respetivamente. Incuba-se durante 5 min a 37 °C num ambiente com 5 % de CO<sub>2</sub>, não ultrapassando este tempo de modo a não danificar as células. Quando as células se encontravam descoladas do frasco foi introduzido 2x o volume de cultura para a contagem de células.

Na contagem de células no hematocitómetro, utilizou-se numa câmara de contagem *Neubauer Improved*, que começa pela adição de azul de tripano numa proporção de 1:1 do meio contendo células. A mistura é então colocada na câmara e por sua vez ao microscópio ótico onde são contadas as células viáveis.

Nos ensaios utilizando linhas celulares do cancro do fígado (HEP-G2) foi usada a concentração de 75 x 10<sup>4</sup> células/mL, e nos ensaios com células do cancro da pele (A375) 20 x 10<sup>4</sup> células/mL, isto porque estas últimas tem uma taxa de crescimento superior às anteriores, para inoculação em microplacas de 96 poços ou 12 poços, dependendo do ensaio.

### **2.8.1. Avaliação do Potencial Citotóxico**

De forma a verificar a toxicidade do efluente e das restantes frações foi determinada a citotoxicidade dos compostos através do método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Em geral, os sais tetrazólio são compostos incolores ou levemente corados, mas ao sofrerem o processo de redução enzimática, resultam num produto (sal formazan) com cor intensa. No caso do MTT este em solução apresenta uma cor amarela e ao ser reduzido o que acontece em células viáveis forma cristais roxos.<sup>[98]</sup> Quanto mais intensa for a cor roxa formada maior número de células viáveis se encontra no meio e por sua vez menor a percentagem citotóxica dos compostos presentes nas amostras a analisar.

Após o crescimento das células durante 48 a 72 horas foi retirado o meio de cultivo da microplaca, sendo adicionado 100 µL por poço de variadas concentrações das soluções a testar (efluente e das frações, entre os 0,5 e 2,5 mg/mL) em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico, entre os 0.5 mg/mL e os

2.5 mg/mL. Foram ainda usados poços de controlo correspondentes a 0 % de citotoxicidade contendo apenas meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico. A microplaca foi incubada durante 24 horas a 37 °C e num ambiente com 5 % de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, foi retirado o meio que continha as amostras e colocado 100 µL por poço de 0.5 mg/mL de MTT em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico incubando durante 2,5 a 3 h até se visualizar a formação de cristais. De seguida removeu-se o meio e dissolveram-se os cristais em 200 µL de metanol e registou-se a absorvência a 595 nm e 630 nm num leitor de microplacas.

Com os valores de absorvência foram determinadas as percentagens de citotoxicidade e determinado o IC<sub>50</sub>, ou seja, concentração onde as soluções a testar apresenta metade da citotoxicidade.

Este método do MTT foi utilizado para avaliar o poder citotóxico das frações, efluente e dos padrões, durante 24 horas e para avaliar a viabilidade celular nos estudos e avaliação do potencial protetor.

### **2.8.2. Avaliação do Poder Protetor da Fração Pesada**

Para estudar o efeito protetor da fração pesada sobre a toxicidade induzida e sobre os efeitos nocivos da radiação UV, foi realizado um plano de experiências com base num *design* experimental de 5 níveis, foram definidos fatores a variar no estudo e a gama experimental da variação de cada um dos fatores, ou seja, os valores que os fatores podem assumir no design das experiências. Para cada experiência realizada foi determinada uma resposta por avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT da linha celular do melanoma da pele A375 sujeita a diferentes condições.

#### **2.8.2.1. Metodologia de Superfície de Resposta – Design Experimental e Construção do Modelo**

A metodologia de superfície de resposta (RSM) reúne técnicas matemáticas e estatísticas, baseadas no ajuste de uma equação polinomial, que deverá descrever o comportamento dos dados com o objetivo de fazer previsões. Este método pode ser aplicado quando a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis. E o objetivo é perceber quais são os níveis das variáveis para obter a melhor performance. A RSM é a técnica de multivariáveis mais relevante para a otimização de experiências. <sup>[99]</sup>

Antes de aplicar o RSM é necessário primeiramente escolher um design experimental que defina quais as experiências a ser executadas experimentalmente no estudo. [99]

Analisar os dados obtidos de uma experiência muitas vezes torna-se complicado, visto que os resultados podem mudar de ensaio para ensaio, e pode não se estar a considerar todos os efeitos provocados por cada uma das variáveis existentes. [75] O método mais comum de investigar os efeitos dos parâmetros em um processo passa por alterar apenas um fator de cada vez e observar a resposta, sendo um método fácil de aplicar, mas por apresentar um número muito grande de tentativas e não relacionar os vários fatores uns com os outros foi desenvolvido o design experimental. O papel do *design* experimental consiste em reduzir o número de ensaios experimentais através da alteração simultânea dos vários níveis dos fatores, possibilitando a observação da variação total dos resultados e levando a determinação da responsabilidade de cada um dos fatores, chegando-se aos resultados através da realização de ensaios estatísticos tentando descobrir que componentes influenciam a experiência de uma forma eficiente e económica. [100-101]

Existem vários tipos de *design* experimental que utilizam o conceito da rotação, ou seja, os ensaios selecionados encontram-se todos equidistantes do centro resultando numa igual precisão da estimativa em todas as direções. Neste trabalho foi utilizado o *Central Composite Design* (CCD). O CCD não contém o conceito de rotação, consiste sim num design fatorial fracionário que é aumentado com um grupo de pontos axiais que permitem uma estimativa em curvatura. Neste tipo de design são realizados ensaios ao ponto central que são incluídas para providenciar uma medida de estabilidade do processo, diminuindo o erro da predição, identificando qualquer variabilidade inerente. [102]

Para se realizar o *design* experimental, é definida a variável que vai ser medida, resposta, esta tem de ser contínua, precisa e fácil de medir. De seguida, é necessário definir os fatores e os seus níveis, os fatores tal como a variável de resposta têm de ser mensuráveis, tendo ainda de ser distinguíveis, independentes entre si e controláveis laboratorialmente, dado que o *design* irá dizer que combinações de fatores serão realizados e em que ordem. Por outro lado, o número de níveis de cada fator, região de interesse de cada um dos fatores, pode ser predeterminado e imutáveis, ou determinados a medida que se realizam os ensaios. [101]

Após determinação das variáveis, fatores e níveis desenvolve-se o *layout* do *design*, ou seja, decide-se de que maneira a experiência vai decorrer, assegurando que os valores estatísticos obtidos são os mais corretos possíveis. [100]

O número total de ensaios da experiência, onde  $k$  é o número de fatores e  $c$  o número de pontos centrais, é dada pela equação 9. [102]

$$2^k + 2 \times k + c \quad (9)$$

Após realização dos ensaios, os resultados obtidos são analisados através da correlação entre as respostas e as variáveis e ajustadas no modelo matemático baseado no modelo quadrático de segunda ordem, equação 10, de modo a determinar um ponto crítico (máximo ou mínimo)

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_{jj}^2 + \sum_{j=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (10)$$

Onde  $y$  é a variável de resposta,  $\beta_0$  é a interceção,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ij}$  e  $\beta_{ii}$  são os coeficientes de efeito linear, interações duplas,  $x_i$ ,  $x_j$  são as variáveis independentes ou fatores e  $\varepsilon$  é o erro. [99,103-104]

### **2.8.2.2. Estudo do Efeito dos Agentes Oxidantes – TBHP e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do Tempo de Exposição e da Concentração da Fração Pesada**

Para estudar a influência da incubação das células com diferentes concentrações de fração pesada na proteção contra os efeitos dos agentes antioxidantes e o tempo de exposição foram realizados ensaios preliminares, como o IC<sub>50.A375</sub> do TBHP e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a capacidade da fração pesada (1 mg/mL) de proteger as células contra esses agentes oxidantes num tempo de incubação de 3 e 6 horas.

Tendo os valores de citotoxicidade e de proteção foi então possível a determinação dos valores dos níveis experimentais, apresentados nas tabelas 2.1 e 2.2.

**Tabela 2.1** – Valores dos fatores utilizados na determinação da proteção contra TBHP

| <b>Níveis experimentais</b>            | <b>-2</b> | <b>-1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>2</b> |
|--|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| <b>TBHP (<math>\mu\text{M}</math>)</b> | 0         | 50        | 100      | 150      | 200      |
| <b>Fração Pesada (mg/mL)</b>           | 0         | 0,25      | 0,50     | 0,75     | 1        |
| <b>Tempo de incubação (min)</b>        | 0         | 45        | 90       | 135      | 180      |

**Tabela 2.2** - Valores dos fatores utilizados na determinação da proteção contra  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

| <b>Níveis experimentais</b>   | <b>-2</b> | <b>-1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>2</b> |
|---|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| <b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b> | 0         | 50        | 100      | 150      | 200      |
| <b>Fração Pesada (mg/mL)</b>  | 0         | 0,25      | 0,50     | 0,75     | 1        |
| <b>Tempo de incubação (min)</b>                                     | 0         | 60        | 120      | 180      | 240      |

Os planos experimentais aplicados após a análise preliminar são os representados na tabela 2.3, relativamente aos ensaios a efetuar para o TBHP e para o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com diferentes concentrações dos compostos e diferentes tempos de incubação com os agentes oxidantes.

**Tabela 2.3** - Matriz do design experimental para os ensaios com TBHP e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

|           | <b>Agente oxidante<br/>(<math>\mu</math>M)</b> | <b>Fração Pesada<br/>(mg/mL)</b> | <b>Tempo de incubação<br/>(min)</b> |
|-----------|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>1</b>  | 50   | 0,25                             | 45                                  |
| <b>2</b>  | 150  | 0,25                             | 45                                  |
| <b>3</b>  | 50   | 0,25                             | 135                                 |
| <b>4</b>  | 150  | 0,25                             | 135                                 |
| <b>5</b>  | 50   | 0,75                             | 45                                  |
| <b>6</b>  | 150  | 0,75                             | 45                                  |
| <b>7</b>  | 50   | 0,75                             | 135                                 |
| <b>8</b>  | 150  | 0,75                             | 135                                 |
| <b>9</b>  | 0  | 0,50                             | 90                                  |
| <b>10</b> | 200  | 0,50                             | 90                                  |
| <b>11</b> | 100  | 0                                | 90                                  |
| <b>12</b> | 100  | 1                                | 90                                  |
| <b>13</b> | 100  | 0,50                             | 0                                   |
| <b>14</b> | 100  | 0,50                             | 180                                 |
| <b>15</b> | 100  | 0,50                             | 90                                  |
| <b>16</b> | 100  | 0,50                             | 90                                  |
| <b>17</b> | 100  | 0,50                             | 90                                  |

Para a avaliação do potencial protetor inicialmente foi retirado o meio das células incubadas numa microplaca de 96 poços durante 48 a 72 horas, sendo adicionado 100  $\mu$ L por poço de fração pesada com diferentes concentrações de acordo com a tabela 2.3 em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico. Ainda foram deixados poços sem qualquer tipo de amostra apenas com meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico, poços de controlo correspondente a 0 % de citotoxicidade. A microplaca foi incubada durante 24 horas a 37 °C e num ambiente com 5 % de CO<sub>2</sub>. Passadas 18 horas, foi retirado o meio que continha as amostras e foram adicionados 100  $\mu$ L do agente oxidante nas concentrações da tabela 2.3, entre os 25  $\mu$ M e os 200  $\mu$ M, voltando estas a ser incubadas durante o tempo constante na tabela 2.3 a 37 °C e num ambiente com 5 % de CO<sub>2</sub>. Passado esse tempo foi analisada a viabilidade celular de acordo com o método do MTT.

### **2.8.2.3. Estudo do Efeito da Radiação UV, do Tempo de Exposição e da Concentração da Fração Pesada**

Para estudar a influência da incubação das células com diferentes concentrações de fração pesada na proteção contra os efeitos da radiação ultravioleta e o tempo de exposição foram realizados ensaios preliminares, como a determinação do potencial citotóxico da radiação UV, e a capacidade da fração pesada (entre os 0 e 1 mg/mL) de proteger as células contra este agente físico num tempo de incubação de 90 min.

Para a determinação do potencial de proteção da fração pesada contra a radiação ultravioleta foi necessário calcular os níveis do tempo de exposição a radiação ultravioleta. Começando pela determinação da citotoxicidade da radiação UV, para isso, as células que incubaram numa microplaca de 96 poços, durante 48 a 72 horas, foram expostas a radiação UV durante 0 min, 45 min, 40 min, 90 min, 135 min e 180 min. Passado esse tempo foi analisada a viabilidade celular de acordo com o método do MTT

De modo a determinar qual o efeito da proteção da fração pesada com diferentes concentrações, para os mesmo minutos de exposição a radiação UV. Foi retirado o meio que se encontrava nas células que incubaram numa microplaca durante 48 a 72 horas, sendo adicionado 100 µL por poço de concentrações variadas de frações pesada em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico, entre os 0 mg/mL e os 1 mg/mL. Ainda foram deixados poços sem qualquer tipo de amostra apenas com meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico, poços de controlo correspondente a 0 % de citotoxicidade. A microplaca foi incubada durante 18 horas a 37 °C e num ambiente com 5 % de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, a microplaca foi exposta a radiação UV durante 90 min. Passado esse tempo foi analisada a viabilidade celular de acordo com o método do MTT.

Os planos experimentais aplicados após a análise preliminar são os representados nas tabelas 2.4.

**Tabela 2.4** - Valores dos fatores utilizados na determinação da proteção contra a radiação UV.

| Níveis experimentais     | -2 | -1   | 0    | 1    | 2   |
|--------------------------|----|------|------|------|-----|
| Fração Pesada (mg/mL)    | 0  | 0,25 | 0,50 | 0,75 | 1   |
| Tempo de incubação (min) | 0  | 60   | 120  | 180  | 240 |

Sabendo os valores correspondes a cada nível de cada fator, foram realizados os ensaios representados na matriz da tabela 2.5, seguindo o procedimento descrito em cima, com diferentes tempos de exposição a radiação e diferentes concentrações da fração pesada.

**Tabela 2.5** - Matriz do design experimental, para os ensaios com a radiação UV

|    | Fração Pesada (mg/mL) | Tempo de exposição (min) |
|----|-----------------------|--------------------------|
| 1  | 0,25                  | 60                       |
| 2  | 0,75                  | 60                       |
| 3  | 0,25                  | 180                      |
| 4  | 0,75                  | 180                      |
| 5  | 0                     | 120                      |
| 6  | 1                     | 120                      |
| 7  | 0,5                   | 0                        |
| 8  | 0,5                   | 240                      |
| 9  | 0,5                   | 120                      |
| 10 | 0,5                   | 120                      |
| 11 | 0,5                   | 120                      |
| 12 | 0,5                   | 120                      |
| 13 | 0,5                   | 120                      |

## 2.9. Observações por Microcopia

As células A375 cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico e na presença da fração pesada foram observadas ao microscópio.

Para o crescimento celular a linha celular foi incubada em 2 mL de meio com  $5 \times 10^4$  células/mL, em microplacas de 12 poços com lamelas próprias para microscopia, durante 48 – 72 horas a 37 °C num ambiente com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo foi substituído o meio no controlo por meio novo e nos poços da amostra com fração pesada

0,5 mg/mL em meio DMEM, deixando a 37°C num ambiente com 5 % de CO<sub>2</sub> durante, aproximadamente 24 horas. No dia seguinte, foram retiradas as lamelas dos poços e lavadas com PBS 1x. Sendo que as lamelas com as células foram posteriormente tratadas com métodos diferentes consoante o tipo de microscopia a utilizar, microscopia eletrónica, microscopia de fluorescência e microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

Para a microscopia de fluorescência as lamelas com as células foram depositadas em meio de 3 % de PFA durante 10 min, e lavadas depois com PBS 1x, seguida da coloração das células com corante Hoechst 33342 (solução 1.1 µg/mL (2µM), diluída de 1:100), durante 10 minutos.

Na microscopia eletrónica de varrimento (SEM), as células foram inicialmente secas na lamela, através da passagem das mesmas por soluções de etanol com concentrações gradualmente maiores, entre 5 a 10 minutos cada etapa, deixando-se depois no excicador durante um dia. As lamelas foram cobertas com uma fina camada de ouro e as amostras foram observadas num microscópio de varrimento JEOL 5200LV com uma voltagem de 20 kV.

Utilizou-se ainda a técnica de microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC).

## **2.10. Análise de resultados e Estatística**

O tratamento de resultados foi realizado recorrendo ao software Excell e GraphPadPrism 5.0, valores apresentados ao longo do trabalho encontram-se na forma de média ± desvio padrão, onde o desvio padrão foi determinado utilizando o software GraphPadPrism 5.0.

### 3. Resultados e Discussão

Neste trabalho começou-se pela preparação das membranas de acetato de celulose pelo método da inversão de fases, seguindo da sua caracterização das membranas consoante a sua permeabilidade hidráulica, rejeição de sais e limite de exclusão molecular.

Após preparação e caracterização das membranas, procedeu-se ao fracionamento do efluente da cortiça, e identificação dos compostos presentes no efluente e nas respetivas frações através do método de cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD).

De seguida, procedeu-se a caracterização das frações e do efluente determinando-se os seus potenciais antioxidantes, inibição enzimática (AChE) e citotóxicos em linhas celulares humanas do cancro do fígado (Hep-G2) e do melanoma da pele (A375).

Devido a exibição da fração pesada dos melhores resultados foi analisado o potencial protetor da fração pesada contra o dano oxidativo induzido pelo TBHP e pelo  $H_2O_2$  e contra o dano por radiação UVC usando uma metodologia de superfície de resposta (RSM) com recurso ao design experimental (CCD).

Por fim, foram observadas as células do cancro da pele (A375), através da microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e de fluorescência, na presença e ausência da fração.

#### 3.1. Caracterização da Membrana

As membranas  $C_{A36,5}$  e  $C_{A28}$  utilizadas nesta atividade experimental foram preparadas e caracterizadas seguindo os procedimentos descritos em 2.3 e 2.4, utilizando um sistema de membranas com uma área de membranas utilizadas de 147,84  $cm^2$ . De seguida, serão apresentados os valores obtidos e determinados ao longo das atividades experimentais, tanto a nível da permeabilidade hidráulica, rejeição de sais como de limite de exclusão molecular, relativamente as membranas  $C_{A36,5}$  e  $C_{A28}$ .

##### 3.1.1. Permeabilidade Hidráulica

A Permeabilidade Hidráulica consiste na capacidade de permeação da membrana a água pura. Com a variação da pressão entre os 3 e o 1 bar, utilizando água destilada e com um tempo de recolha de 1,5 minutos de permeado, obtiveram-se os seguintes valores (tabela 3.1) referentes a massa de permeado e a temperatura do mesmo.

**Tabela 3.1** - Valores obtidos do método da permeabilidade hidráulica, utilizando a membrana C<sub>A36,5</sub> e C<sub>A28</sub>.

| Pressão<br>(bar) | C <sub>A36,5</sub> |                     | C <sub>A28</sub> |                     |
|------------------|--------------------|---------------------|------------------|---------------------|
|                  | Permeado<br>(g)    | Temperatura<br>(°C) | Permeado<br>(g)  | Temperatura<br>(°C) |
| 1,00             | 129,62             | 17,20               | -                | -                   |
| 1,35             | -                  | -                   | 49,51            | 19,70               |
| 1,50             | 113,72             | 17,10               | 41,93            | 19,70               |
| 2,00             | 87,31              | 17,30               | 31,71            | 19,70               |
| 2,50             | 72,97              | 17,50               | 21,00            | 19,70               |
| 3,00             | 47,41              | 17,30               | 20,75            | 19,80               |

De acordo com os dados apresentados na tabela acima, verifica-se que quanto maior a pressão transmembranar do sistema, maior a quantidade de água que atravessa a membrana num intervalo de tempo igual.

Tendo a massa do permeado e sabendo que o tempo de recolha deste, foi possível o cálculo do fluxo de permeado ( $J_P$ ) (equação 11), onde o Q corresponde ao caudal mássico do permeado, A é a área das membranas utilizadas,  $m_P$  a massa do permeado e t ao tempo de recolha.

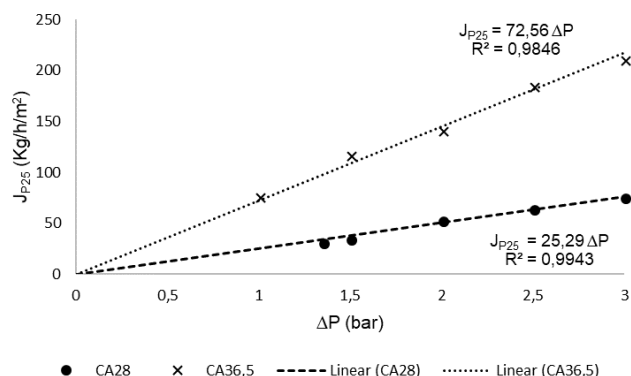
$$J_P = \frac{Q}{A} = \frac{m_P}{t \cdot A} \quad (11)$$

Como dito na alínea 2.4.1, é necessário corrigir o valor do fluxo obtido com a equação 2, visto que a permeabilidade da membrana dependente da temperatura à qual o processo foi realizado. Estando os valores obtidos representados na tabela 3.2.

**Tabela 3.2** - Valores de fluxo de permeação (Kg/h/m<sup>2</sup>).

| Pressão<br>(bar) | C <sub>A36,5</sub>                       |  | C <sub>A28</sub>                         |  |
|------------------|--|--|--|--|
|                  | J <sub>P</sub><br>(Kg/h/m <sup>2</sup> ) | J <sub>P25</sub><br>(Kg/h/m <sup>2</sup> ) | J <sub>P</sub><br>(Kg/h/m <sup>2</sup> ) | J <sub>P25</sub><br>(Kg/h/m <sup>2</sup> ) |
| 1,00             | 175,35                                   | 210,78                                     | -  | -  |
| 1,35             | -  | -  | 66,98                                    | 75,82                                      |
| 1,50             | 153,84                                   | 185,38                                     | 56,72                                    | 64,21                                      |
| 2,00             | 118,11                                   | 141,64                                     | 46,97                                    | 53,17                                      |
| 2,50             | 98,71                                    | 117,80                                     | 31,10                                    | 35,21                                      |
| 3,00             | 64,14                                    | 76,91                                      | 28,07                                    | 31,70                                      |

Corrigidos os fluxos de permeação procedeu-se a construção do gráfico, representado na figura 3.1.



**Figura 3.1** - Gráfico do J<sub>P25</sub> em função da pressão transmembranar, da membrana CA<sub>28</sub>.

Traçadas as retas, obtiveram-se coeficientes de correlação de 0.9943 e 0.9846. Uma vez que os declives das retas representadas na figura 3.1 correspondem ao valor da permeabilidade hidráulica ( $L_P$ ), obtêm-se os seguintes valores expressos na tabela 3.3.

**Tabela 3.3** - Permeabilidade hidráulica (Kg/h/m<sup>2</sup>/bar) das membranas.

|   | C <sub>A36,5</sub> | C <sub>A28</sub> |
|---|--------------------|------------------|
| <b>L<sub>P</sub> (Kg/h/m<sup>2</sup>/bar)</b> | 72,56              | 25,29            |

Analisando os valores da permeabilidade hidráulica, verifica-se que quanto maior a quantidade de formamida maior a permeabilidade da membrana a água, o que era de esperar uma vez que a formamida tem como função promover a formação dos poros.

### 3.1.2. Rejeição Aparente de Sais Mono e Bivalentes

No procedimento da rejeição de sais, ao contrário da permeabilidade hidráulica foi apenas utilizada uma pressão pré-definida, que neste caso foi de 1 bar e as alimentações utilizadas foram soluções de sais de NaCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Onde foi recolhido permeado durante 3 minutos e foram lidas as temperaturas e condutividades ( $\sigma$ ) da alimentação e do permeado, como descrito na alínea 2.4.2.

Estando na tabela 3.4 os valores obtidos na utilização da membrana C<sub>A36,5</sub> e na tabela 3.5 os da membrana C<sub>28</sub>.

**Tabela 3.4** - Valores de massa (g), temperatura (°C) e condutividade ( $\mu$ S/cm) do permeado e da alimentação, do ensaio com sais mono (NaCl) e bivalentes (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), com a membrana C<sub>A36,5</sub>.

| C <sub>A36,5</sub> |                                     | NaCl  | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|--------------------|-------------------------------------|-------|---------------------------------|
| Permeado           | Massa (g)                           | 93,73 | 91,90                           |
|                    | Temperatura (°C)                    | 16,80 | 16,50                           |
|                    | Condutividade ( $\mu$ S/cm)         | 1036  | 810                             |
| Alimentação        | Condutividade inicial ( $\mu$ S/cm) | 1154  | 917                             |
|                    | Condutividade final ( $\mu$ S/cm)   | 1039  | 845                             |

**Tabela 3.5** - Valores de massa (g), temperatura (°C) e condutividade ( $\mu$ S/cm) do permeado e da alimentação, do ensaio com sais mono (NaCl) e bivalentes (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), com a membrana C<sub>A28</sub>.

| C <sub>A28</sub> |                                     | NaCl  | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|------------------|-------------------------------------|-------|---------------------------------|
| Permeado         | Massa (g)                           | 42,33 | 40,96                           |
|                  | Temperatura (°C)                    | 19,70 | 19,40                           |
|                  | Condutividade ( $\mu$ S/cm)         | 1088  | 746                             |
| Alimentação      | Condutividade inicial ( $\mu$ S/cm) | 1116  | 874                             |
|                  | Condutividade final ( $\mu$ S/cm)   | 1115  | 873                             |

Com os dados da massa e da temperatura, foi possível determinar o fluxo de permeação a 25 °C, tal como alínea anterior, com a equação 2.

Por outro lado, para calcular a concentração de sais presentes na alimentação e no permeado foi necessário, primeiramente, a construção de retas de calibração. Onde, para o NaCl a relação da concentração com a condutividade é de 0,467 e do Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,765.

**Tabela 3.6** - Concentração dos sais permeado e na alimentação, da membrana C<sub>A36,5</sub> e C<sub>A28</sub>.

| Permeado    |         | C <sub>A36,5</sub> |  | C <sub>A28</sub> |  |
|-------------|---------|--------------------|--|------------------|--|
|             |         | NaCl<br>(ppm)      | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>(ppm) | NaCl<br>(ppm)    | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>(ppm) |
|             |         | 483,40             | 619,65                                   | 507,66           | 570,69                                   |
| Alimentação | Inicial | 538,46             | 701,51                                   | 520,73           | 668,61                                   |
|             | final   | 484,80             | 646,43                                   | 520,26           | 667,85                                   |

Sabendo a concentração de sais presentes no permeado e na alimentação foi possível o cálculo do coeficiente de rejeição aparente de sais monovalentes como de sais bivalentes, através da equação 3.

**Tabela 3.7** - Coeficientes de rejeição de sais monovalentes e bivalentes de cada membrana

|   | C <sub>A36,5</sub> | C <sub>A28</sub> |
|---|--------------------|------------------|
| NaCl - f (%)                            | 0,29               | 2,42             |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - f (%) | 4,14               | 14,55            |

Analisando a tabela 3.7, conclui-se que as membranas poliméricas tem uma maior capacidade de rejeitar sais bivalentes do que sais monovalentes, visto que os coeficientes de rejeição de sais monovalentes são significativamente menores do que os dos bivalentes. É possível concluir que os sais têm uma maior facilidade de atravessar a membrana com poros de maior tamanho, ou seja, com maior quantidade de formamida.

Por último, conclui-se que estamos na presença de um sistema que trabalha em ultrafiltração, devido ao facto dos valores destes coeficientes serem baixos.

### 3.1.3. Rejeição a Solutos Orgânicos

A rejeição a solutos orgânicos, permite o cálculo do limite de exclusão molecular de cada membrana. Para tal, utilizaram-se soluções de Polietilenoglicol (PEG) e Dextrano de 600 ppm com massas moleculares diferentes. Após passagem nas membranas foi recolhido permeado e alimentação e medido a sua temperatura, peso e quantidade de carbono orgânico total (COT), como descrito na aliena 2.4.3.

Com as áreas dos picos obtidos através da passagem das amostras pelo aparelho de índice de refração, determinou-se a concentração de cada uma delas e, por conseguinte, o coeficiente de rejeição aos solutos orgânicos, utilizando a equação 3. Obtendo os valores dos coeficientes representados nas tabelas 3.8 e 3.9.

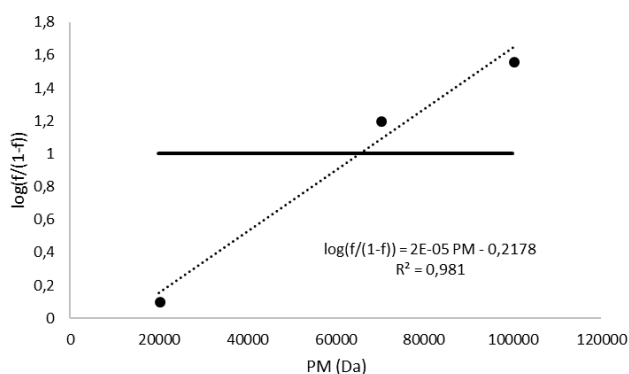
**Tabela 3.8** - Coeficientes de rejeição de solutos orgânicos, para a membrana C<sub>A36,5</sub>.

| Membrana           | PEG 20 000<br>f (%) | Dextrano 70 000<br>f (%) | Dextrano 100 000<br>f (%) |
|--------------------|---------------------|--------------------------|---------------------------|
| C <sub>A36,5</sub> | 56,28               | 94,12                    | 97,37                     |

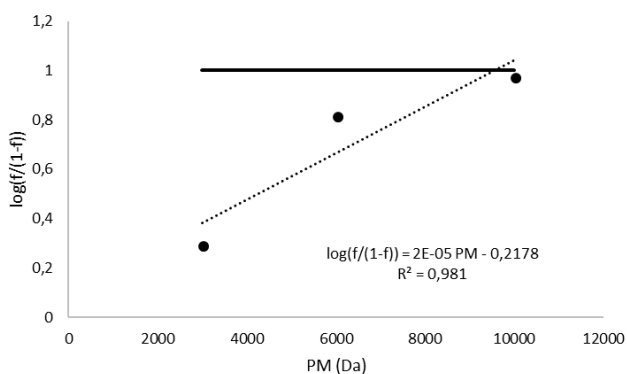
**Tabela 3.9** - Coeficientes de rejeição de solutos orgânicos, para a membrana C<sub>A28</sub>.

| Membrana         | PEG 3 000 g/mol<br>f (%) | Dextran 6 000 g/mol<br>f (%) | Dextran 10 000 g/mol<br>f (%) |
|------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| C <sub>A28</sub> | 66,29                    | 86,78                        | 90,44                         |

Tendo os valores dos coeficientes de rejeição, foi possível a determinação do limite de exclusão molecular das membranas, através da construção de uma reta de calibração, calculando posteriormente o  $\log\left(\frac{f}{1-f}\right) = 1$ . Na figura 3.2 e 3.3 estão representados esses mesmo gráficos e na tabela 3.10 os valores de MWCO de cada uma das membranas poliméricas.



**Figura 3.2** - Representação gráfica do MWCO para a membrana C<sub>A36,5</sub>.



**Figura 3.3** - Representação gráfica do MWCO para a membrana C<sub>A28</sub>.

**Tabela 3.10** - Valores de MWCO obtidos para cada uma das membranas.

|                   | <b>C<sub>A36,5</sub></b> | <b>C<sub>A28</sub></b> |
|-------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>MWCO (kDa)</b> | 65,48                    | 9,56                   |

Analisando a tabela 3.10, é possível concluir que a membrana C<sub>A36,5</sub>, por apresentar poros de maior tamanho, comparativamente a membrana C<sub>A28</sub>, permite a passagem de moléculas também elas de maiores dimensões. Onde esta membrana, rejeita (> 91 %) apenas os solutos orgânicos que apresentem tamanhos superiores a 65,48 kDa. Por outro lado, a membrana C<sub>A28</sub>, tem um limite de exclusão molecular muito mais baixo, do que a anterior, conseguindo apenas atravessá-la, partículas com tamanhos inferiores a 9,56 kDa.

### 3.2. Fracionamento do Efluente pelas Membranas

Após a caracterização das membranas, prosseguiu-se o estudo dessa tecnologia utilizando efluente de cortiça e dividindo este em várias frações: leve, média e pesada.

#### 3.2.1. Fração leve

A fração leve, foi a fração obtida utilizando o efluente como alimentação e a membrana com poros mais pequenos, ou seja, a C<sub>A28</sub>. Onde esta fração corresponde ao permeado obtido desse ensaio. Sabendo que a membrana C<sub>A28</sub> tem um limite de exclusão molecular de 9,56 kDa, em princípio os compostos presentes nesta fração têm dimensões inferiores a 9,56 kDa.

Na tabela 3.11 estão representadas as condições operatórias e na tabela 3.12 as características da fração leve e da alimentação que lhe deu origem. Onde os fenóis totais e taninos foram determinados através dos métodos descrito na alínea 2.7.1.

**Tabela 3.11** - Valores registados e obtidos para obter a fração leve, com a membrana C<sub>A28</sub>. em modo de concentração.

|   | <b>Fração leve</b> |
|---|--------------------|
| <b>Pressão (bar)</b>                    | 2                  |
| <b>Temperatura (°C)</b>                 | 18,7               |
| <b>Tempo (min)</b>                      | 40                 |
| <b>Quantidade (L)</b>                   | 0,350              |
| <b>Q (L/h)</b>                          | 0,525              |
| <b>J<sub>p</sub>(L/h/m<sup>2</sup>)</b> | 17,76              |

**Tabela 3.12** Cor, condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ ), coeficientes de rejeição e quantidade de fenóis totais e taninos do efluente e da fração leve.

|  | <b>Alimentação<br/>Efluente</b> | <b>Permeado<br/>Fração leve</b> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Cor</b>   | 24700                           | 1950                            |
| <b>f<sub>cor</sub> (%)</b>                         | 92                              |                                 |
| <b>Condutividade (<math>\mu\text{S/cm}</math>)</b> | 1950                            | 1228                            |
| <b>f<sub>Cond.</sub> (%)</b>                       | 37                              |                                 |
| <b>Fenóis Totais (mg/mL)</b>                       | 0,307 $\pm$ 0,028               | 0,159 $\pm$ 0,015               |
| <b>Taninos (mg/mL)</b>                             | 0,160 $\pm$ 0,011               | 0,132 $\pm$ 0,011               |

Da análise da tabela 3.12, foi verificado que ocorreu uma diminuição de 92 % da cor e de 37 % da condutividade.

### 3.2.2. Fração Pesada

A fração pesada, diz respeito a fração obtida através da passagem de efluente (alimentação) pela membrana maior ( $C_{A36,5}$ ), sendo esta fração correspondente à alimentação concentrada, após estabilização da condutividade e da cor. Utilizando o processo de diafiltração. Esta ao contrário da fração leve, deverá apresentar compostos na sua constituição com maiores dimensões, superiores a 65,48 kDa, uma vez, que são os compostos que não conseguiram transpor a membrana.

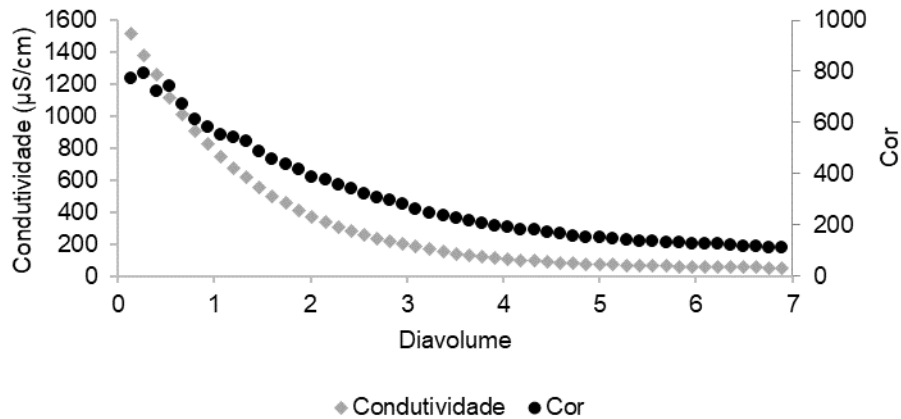
Na tabela 3.13 estão representadas as características da fração pesada e da alimentação que lhe deu origem.

**Tabela 3.13** - Cor, condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ ) e coeficiente de rejeição do efluente e da fração pesada em modo de diafiltração

|  | <b>Alimentação<br/>Efluente</b> | <b>Concentrado<br/>Fração Pesada</b> |
|--|---------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Cor</b>   | 24700                           | 8400                                 |
| <b>f<sub>cor</sub> (%)</b>                         | 69                              |                                      |
| <b>Condutividade (<math>\mu\text{S/cm}</math>)</b> | 1950                            | 1440                                 |
| <b>f<sub>Cond.</sub> (%)</b>                       | 26                              |                                      |
| <b>Fenóis Totais (mg/mL)</b>                       | 0,307 $\pm$ 0,028               | 0,240 $\pm$ 0,005                    |
| <b>Taninos (mg/mL)</b>                             | 0,160 $\pm$ 0,011               | 0,153 $\pm$ 0,011                    |

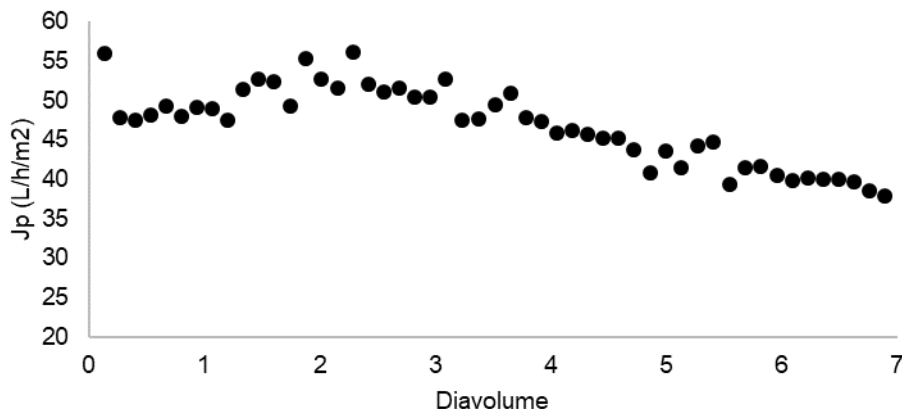
O processo de diafiltração foi realizado até a estabilização dos valores de condutividade e cor do permeado, verificando que tanto a condutividade como a cor do

permeado diminuíram gradualmente até estabilizarem (figura 3.4). Isto ocorreu, uma vez que à medida que a experiência decorre a quantidade de compostos na alimentação vai diminuindo com a remoção de compostos no permeado.



**Figura 3.4** - Representação gráfica da variação da condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e da cor do permeado em função do diavolume, utilizando a membrana  $C_{A36,5}$ .

De modo a verificar de que forma o fluxo de permeado variava, foi construído a figura 3.5.



**Figura 3.5** - Representação gráfica do fluxo volumétrico ( $J_p$ ) em função do diavolume, utilizando a membrana  $C_{A36,5}$ .

Analisando a figura 3.5 é possível notar que o fluxo volumétrico, diminui com o tempo, isto devido ao facto que a medida que se vai recolhendo permeado, a alimentação vai ficando cada vez mais concentrada, apresentando uma crescente percentagem de compostos com maiores dimensões, dificultando a filtração.

### 3.2.3. Fração média

Ao contrário das restantes frações, esta foi a única obtida através da utilização das duas membranas, ou seja, primeiro utilizando a  $C_{A36,5}$ , para remover os compostos

de maiores dimensões do efluente, e de seguida utilizando o permeado obtido desse processo como alimentação da membrana C<sub>A28</sub>. Onde a segunda etapa de filtração consistia num processo de diafiltração. A fração média em princípio será constituída por compostos de dimensões entre os 9,52 kDa e os 65,48 kDa.

Na tabela 3.14 estão os valores das condições operatórias e na tabela 3.15 estão representadas as características da fração média e da alimentação que lhe deu origem.

**Tabela 3.14** - Valores registados e obtidos para obter a alimentação da fração média, com a membrana C<sub>A36,5</sub>, na etapa em modo de concentração.

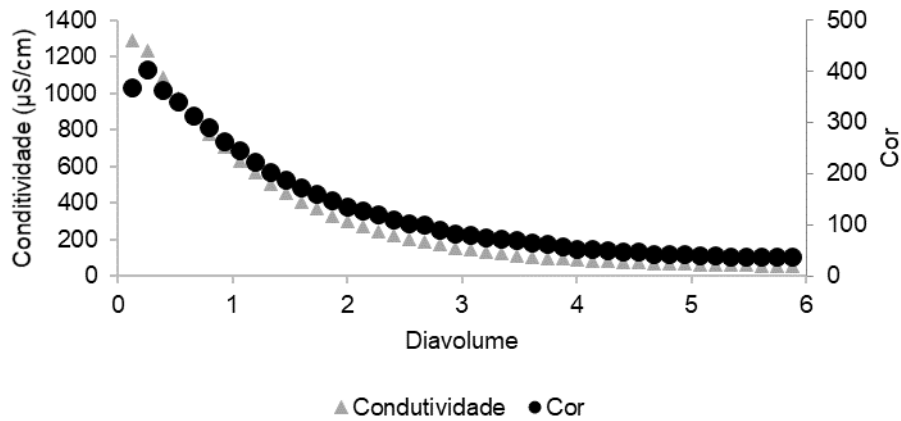
|   | <b>Permeado Efluente C<sub>A36,5</sub></b> |
|---|--|
| <b>Pressão (bar)</b>                    | 2  |
| <b>Temperatura (°C)</b>                 | 20,93                                      |
| <b>Tempo (min)</b>                      | 97   |
| <b>Quantidade (L)</b>                   | 4  |
| <b>Q (L/h)</b>                          | 2,47                                       |
| <b>J<sub>P</sub>(L/h/m<sup>2</sup>)</b> | 83,54                                      |

**Tabela 3.15** - Cor, condutividade (μS/cm) e coeficiente de rejeição da alimentação da fração média e da fração média.

|                              | <b>Alimentação<br/>Permeado Efluente C<sub>A36,5</sub></b> | <b>Concentrado<br/>Fração Média</b> |
|------------------------------|--|-------------------------------------|
| <b>Cor</b>                   | 1900   | 580                                 |
| <b>f<sub>cor</sub> (%)</b>   | 69   |                                     |
| <b>Condutividade (μS/cm)</b> | 1719   | 123                                 |
| <b>f<sub>Cond.</sub> (%)</b> | 93   |                                     |
| <b>Fenóis Totais (mg/mL)</b> | -  | 0,090 ± 0,034                       |
| <b>Taninos (mg/mL)</b>       | -  | 0,079 ± 0,042                       |

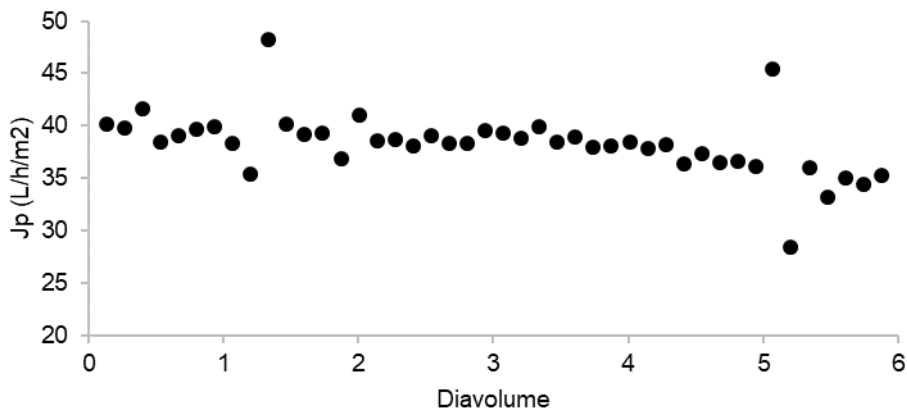
Tal como na alínea 3.2.2., para a fração média também foram registados os valores de condutividade e de cor do permeado ao longo da diafiltração, estando os valores

obtidos representados na figura 3.6. E os valores do fluxo de permeado na figura



**Figura 3.6** - Representação gráfica da variação da condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ ) e da cor do permeado em função do diavolume, utilizando a membrana  $C_{A28}$ .

Como na diafiltração anterior, nesta foi observado também que a condutividade e a cor diminuíram ao longo da atividade.

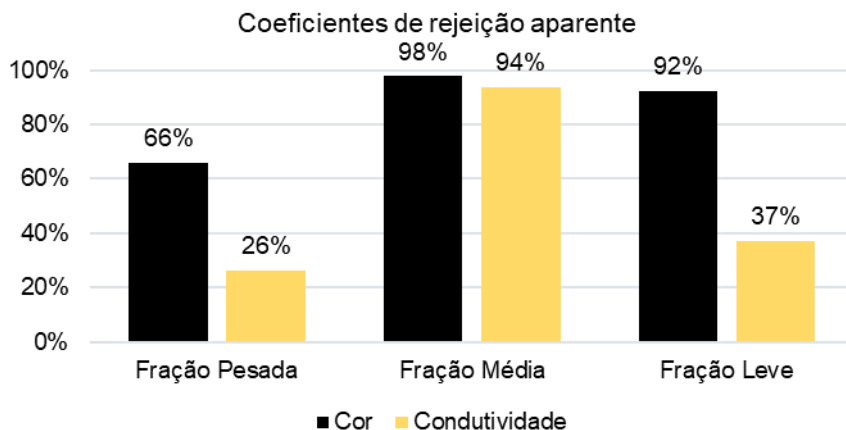


**Figura 3.7** - Representação gráfica do fluxo volumétrico ( $J_p$ ) (direita), utilizando a membrana  $C_{A28}$ .

Analisando a figura 3.7 observa-se que o fluxo se manteve praticamente constante à medida que o diavolume aumentava. Esta membrana ao conter poros de dimensões mais pequenas, quando comparada com a membrana  $C_{A36,5}$  não é tão afetada pelo fenómeno de polimerização por concentração o que fez com que o fluxo volumétrico não sofresse tantas alterações.

### 3.2.4. Comparação entre Frações e Efluente

Para uma melhor observação dos coeficientes de rejeição aparente relativamente a cor e a condutividade, de forma a analisar a descontaminação do efluente, foi construído o gráfico da figura 3.8.



**Figura 3.8** - Coeficientes de rejeição aparente relativamente a cor e a condutividade, tendo como base os valores do efluente.

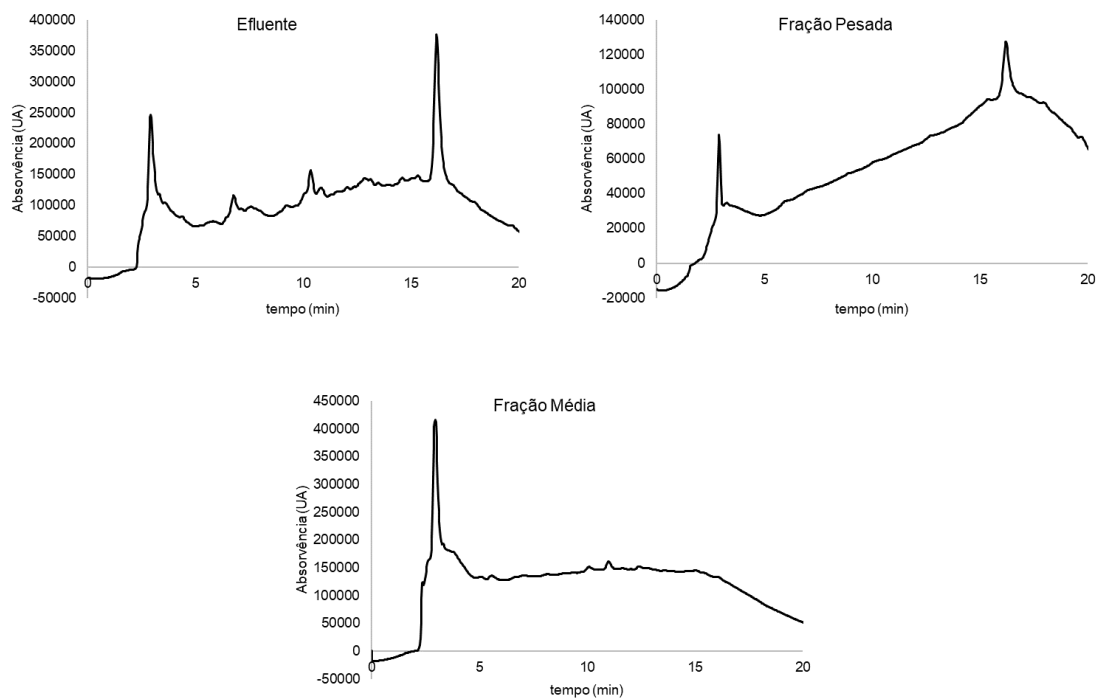
Através da figura 3.8 nota-se que a fração que apresenta valores mais distantes em termos de cor e de condutividade é a fração média, ou seja, a fração que foi obtida a partir do modo de concentração e do modo de diafiltração utilizando os dois tipos de membranas. Ainda se verifica que a fração obtida apenas pelo modo de diafiltração com a membrana  $C_{A36.5}$  é a que apresenta coeficientes mais baixos.

### 3.3. Caracterização do Efluente e das Frações

O objetivo da etapa anterior consistiu no isolamento de compostos em diferentes frações, utilizando a tecnologia de membranas que serão seguidamente caracterizadas. Através da identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes em cada composto como também os fenóis totais e taninos.

### 3.3.1. Cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD)

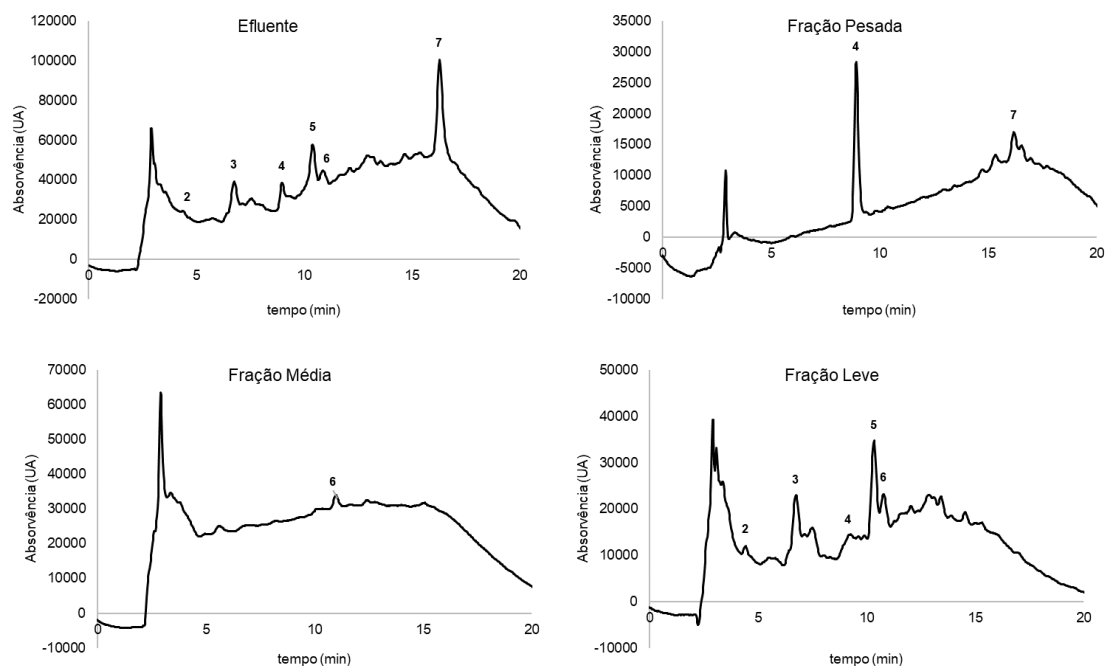
As corridas de cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD), descritas na alínea 2.7.2 do efluente e das frações permitiram obter os cromatogramas representados na figura 3.9.



**Figura 3.9** - Cromatograma do Efluente e da Fração Pesada e Média (1 mg de massa seca/mL).

Pode verificar-se que os cromatogramas representados na figura 3.9 apresentavam linhas de base muito elevadas, impossibilitando uma fácil identificação e quantificação dos compostos presentes em cada uma das frações e no efluente, devido à presença mucilagens<sup>[43]</sup>, mistura de polissacarídeos e outros polímeros presentes nas plantas e cujo fracionamento pelas membranas não eliminou na totalidade.<sup>[91]</sup> Tendo por isso sido extraídas as mucilagens através do processo de extração com etanol, descrito na alínea 2.6 e analisadas após a extração no HPLC-DAD.

Obtendo assim os cromatogramas do efluente e das frações sem mucilagens, ilustrados na figura 3.10.



**Figura 3.10** - Cromatograma do Efluente e da Fração Pesada e Média, sem mucilagens (1 mg de massa seca/mL).

Visto o objetivo ser a recuperação de compostos do efluente da cortiça, foi possível verificar de acordo com os cromatogramas (figura 3.10) que nas frações pesada e média se obteve isolamento de alguns compostos do efluente quando comparado com a fração leve, cujo perfil cromatográfico é mais similar ao efluente. Por outro lado, as frações pesada e média são constituídas por um número mais reduzido de compostos tornam-se muito diferentes da composição do efluente, o que era pretendido nesta etapa.

Com os cromatogramas obtidos e representados na figura 3.10, foi possível a determinação dos compostos presentes em cada uma das frações e do efluente, como também a sua quantificação, através da construção de curvas de calibração utilizando os padrões, estando os valores esquematizados na tabela 3.16. Uma vez que não se tinha o padrão de ácido protocatecuico e do ácido carboxílico de Brevifolina, não foi possível a sua identificação, mas fazendo a comparação a partir dos cromatogramas obtidos com cromatogramas de estudos já realizados e publicados foi possível a sua identificação.<sup>[11,54,105]</sup> Devido a isso, a sua quantificação relativa, foi classificada consoante a sua intensidade relativa, com sinais de + e -. Onde os picos maiores estão representados com o sinal + e os menores com o sinal -.

O ácido quinico (1) por ser dos primeiros compostos a ser separado e sair perto do pico da injeção, foi necessário fazer um ajuste na separação cromatográfica já

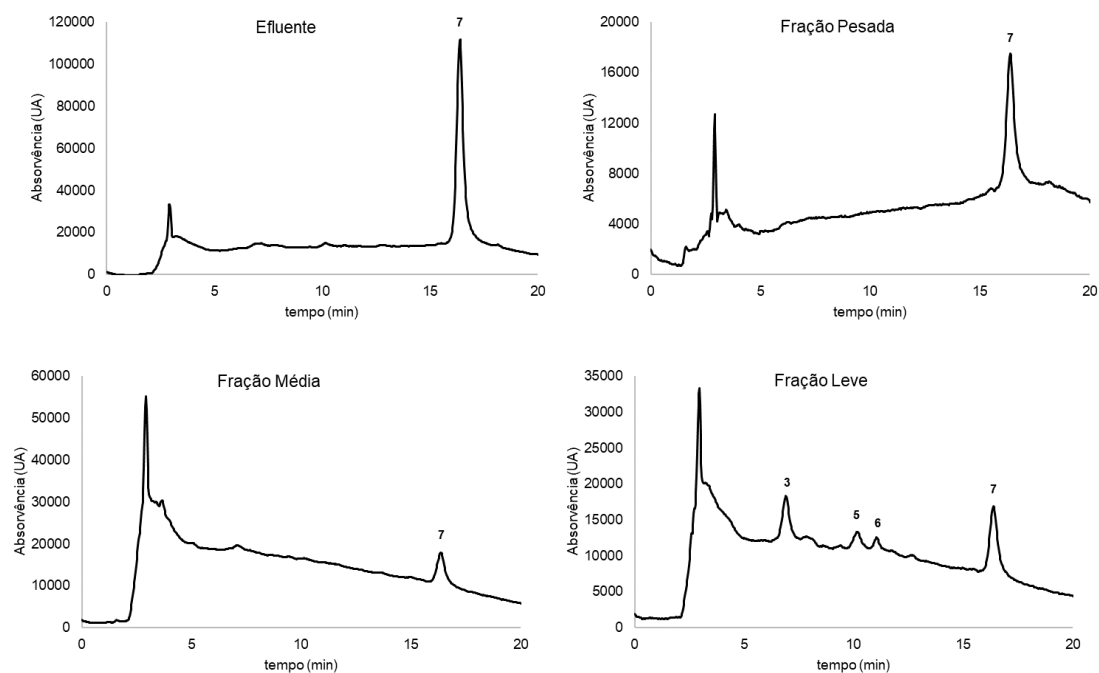
descrito em 2.7.2 possibilitando assim a quantificação do ácido quinico (1) presente nas frações e efluente. Os cromatogramas e as curvas de calibração estão disponíveis em anexo.

**Tabela 3.16** - Compostos identificados como estando presentes no efluente e nas restantes frações sem mucilagens. NA: não apresenta.

| <b>Pico</b> | <b>Composto</b>  | <b>Efluente</b> | <b>Fração Pesada</b> | <b>Fração Média</b> | <b>Fração Leve</b> |
|-------------|--|-----------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| <b>1</b>    | Ácido Quínico ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )                    | 102,63          | NA                   | 119,85              | 134,54             |
| <b>2</b>    | Ácido Gálico ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )                     | 1,11            | NA                   | NA                  | 2,13               |
| <b>3</b>    | Ácido Protocatecuico ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )             | -               | NA                   | NA                  | +                  |
| <b>4</b>    | Ácido carboxílico de Brevifolina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) | +               | ++                   | NA                  | -                  |
| <b>5</b>    | Ácido Vanílico ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )                   | 6,45            | NA                   | 0,84                | 3,54               |
| <b>6</b>    | Ácido Sirígico ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )                   | 1,52            | NA                   | NA                  | 1,34               |
| <b>7</b>    | Ácido Elágico ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )                    | 80,38           | 5,48                 | NA                  | NA                 |

Foram injetados ainda no HPLC-DAD as mucilagens que tinham sido removidas das frações e do efluente de modo a determinar se tinham sido removidos compostos fenólicos importantes para as etapas seguintes.

Após obtenção dos cromatogramas das mucilagens presentes nas amostras, traçaram-se os seguintes gráficos de comparação, presentes na figura 3.11.



**Figura 3.11** - Cromatograma das mucilagens das frações (1mg/mL), em HPLC-DAD.

**Tabela 3.17** - Comparação da intensidade relativa dos picos dos compostos sem mucilagens (A) e das mucilagens (B).

| Pico | Composto                         | Efluente |    | Fração Pesada |    | Fração Média |    | Fração Leve |    |
|------|----------------------------------|----------|----|---------------|----|--------------|----|-------------|----|
|      |                                  | A        | B  | A             | B  | A            | B  | A           | B  |
| 1    | Ácido Quínico                    | +        | -  | NA            | +  | +            | NA | +           | NA |
| 2    | Ácido Gálico                     | +        | -  | NA            | NA | NA           | NA | +           | -  |
| 3    | Ácido Protocatecuico             | +        | NA | NA            | NA | NA           | NA | +           | -  |
| 4    | Ácido carboxílico de Brevifolina | -        | NA | +             | NA | NA           | NA | +           | NA |
| 5    | Ácido Vanílico                   | +        | NA | NA            | NA | NA           | NA | +           | -  |
| 6    | Ácido Sirígico                   | +        | NA | NA            | NA | +            | NA | +           | -  |
| 7    | Ácido Elágico                    | -        | +  | -             | +  | NA           | +  | NA          | +  |

Analisando os cromatogramas presentes na figura 3.11 e 3.12 construiu-se a tabela 3.17, onde foi verificado que com a precipitação das mucilagens ocorreu também a precipitação de alguns compostos fenólicos, sendo que o ácido elágico (7), foi um dos compostos que saiu maioritariamente nas mucilagens.

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que a maioria dos compostos isolados do efluente da cortiça e identificados no HPLC-DAD são compostos fenólicos. Dos compostos identificados por HPLC-DAD, o efluente e a fração leve são constituídos maioritariamente pelo ácido quinico (1), pelo ácido gálico (2), ácido protocatecuico (3), ácido carboxílico de Brevifolina (4), ácido vanílico (5), ácido siríngico (6) e pelo ácido elágico (7). A fração pesada é constituída pelo ácido carboxílico de Brevifolina (4) e pelo ácido elágico (7). Por último, a fração média apresenta o ácido quinico (1), o ácido carboxílico de Brevifolina (4), o ácido siríngico (6) e o ácido elágico (7).

A fração leve e o efluente não apresentavam diferenças a nível da sua constituição, isto é, devido ao facto de a fração leve ter sido obtida apenas com a utilização da membrana  $C_{A28}$  em modo de concentração, esta membrana possui o limite de exclusão molecular mais baixo de 9,52 kDa, o que permite recuperar do efluente a maioria dos compostos com dimensões em princípio inferiores a 9,52 kDa. Concluindo que os compostos fenólicos na sua maioria apresentam dimensões inferiores fazendo parte da composição da fração leve. No entanto, verifica-se que a utilização da membrana de poros maiores,  $C_{A36.5}$ , é a mais eficaz no que toca ao isolamento de compostos na fração pesada e média não por limites de exclusão molecular, mas porque possivelmente em modo de diafiltração se acumulam mais polímeros à superfície da membrana o que pode levar à retenção das pequenas moléculas por fenómenos de colmatação.<sup>[11]</sup> por outro lado, a fração média apresentava menor quantidade de mucilagens do que a fração pesada.

### **3.3.2. Quantificação de fenóis totais e taninos**

Os compostos fenólicos, são os compostos responsáveis pelo potencial antioxidante e protetor das amostras. De forma a determinar a quantidade total destes no efluente e nas frações, utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu, seguindo o procedimento descrito na alínea 2.7.1. Onde foram obtidos os valores da tabela 3.18.

**Tabela 3.18** - Quantidade de fenóis e taninos presentes em cada fração e efluente, depois da liofilização.

|                                      | <b>Efluente</b> | <b>Fração Pesada</b> | <b>Fração Média</b> | <b>Fração Leve</b> |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| <b>Fenóis totais (mg/mg extrato)</b> | 0,290±0,048     | 0,176±0,065          | 0,178±0,019         | 0,064±0,007        |
| <b>Taninos (mg/mg extrato)</b>       | 0,147±0,037     | 0,085±0,009          | 0,119±0,006         | 0,034±0,007        |

Com os valores da tabela 3.18 foi possível verificar que o efluente é o que apresenta uma maior quantidade de fenóis e taninos, o que era de esperar, uma vez que as outras amostras são frações desta. Relativamente às frações, denota-se que as frações média e pesada apresentam valores muito similares a nível de fenóis totais, diferenciando na quantidade de taninos, podendo isto ser devido a facto de nenhuma das duas apresentar em princípio compostos com tamanho inferior a 9,56 kDa, e possivelmente devido ao uso do modo de diafiltração. A fração leve por sua vez por ter sido obtida através da membrana com poros mais reduzidos, com um limite de exclusão molecular de 9,56 kDa, é a que apresenta na sua constituição menor quantidade de compostos fenólicos, tanto no global como em relação a quantificação dos taninos, apesar de apresentar na sua composição um maior diversidade de compostos fenólicos diferentes na sua composição, como demonstrado na alinea 3.3.1. Talvez porque a utilização do modo de diafiltração concentre os compostos de maior dimensão que podem ajudar ao isolamento de maior quantidade de compostos fenólicos.

Foi ainda determinado a quantidade de fenóis totais presentes nas amostras, após remoção das mucilagens presentes nelas.

**Tabela 3.19** - Quantidade de fenóis e taninos presentes em cada fração e efluente sem mucilagens.

|                                      | <b>Efluente</b> | <b>Fração Pesada</b> | <b>Fração Média</b> | <b>Fração Leve</b> |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| <b>Fenóis totais (mg/mg extrato)</b> | 0,269±0,034     | 0,310±0,013          | 0,294±0,019         | 0,265±0,052        |

Com base na tabela 3.19 observa-se que ao serem retiradas as mucilagens as frações apresentam na sua constituição maior quantidade de fenóis, o que era de esperar, visto que ao serem retiradas as mucilagens na pesagem de 1 mg de extrato as frações e efluente vão ter na sua constituição maior percentagem de fenóis relativa. Esta metodologia demonstra assim ser adequada para concentrar os compostos fenólicos

presentes no efluente e nas frações, apesar de como se pode constatar na figura 3.11 haver alguma perda de compostos nas mucilagens.

### **3.4. Potenciais Biológicos do Efluente e das Frações**

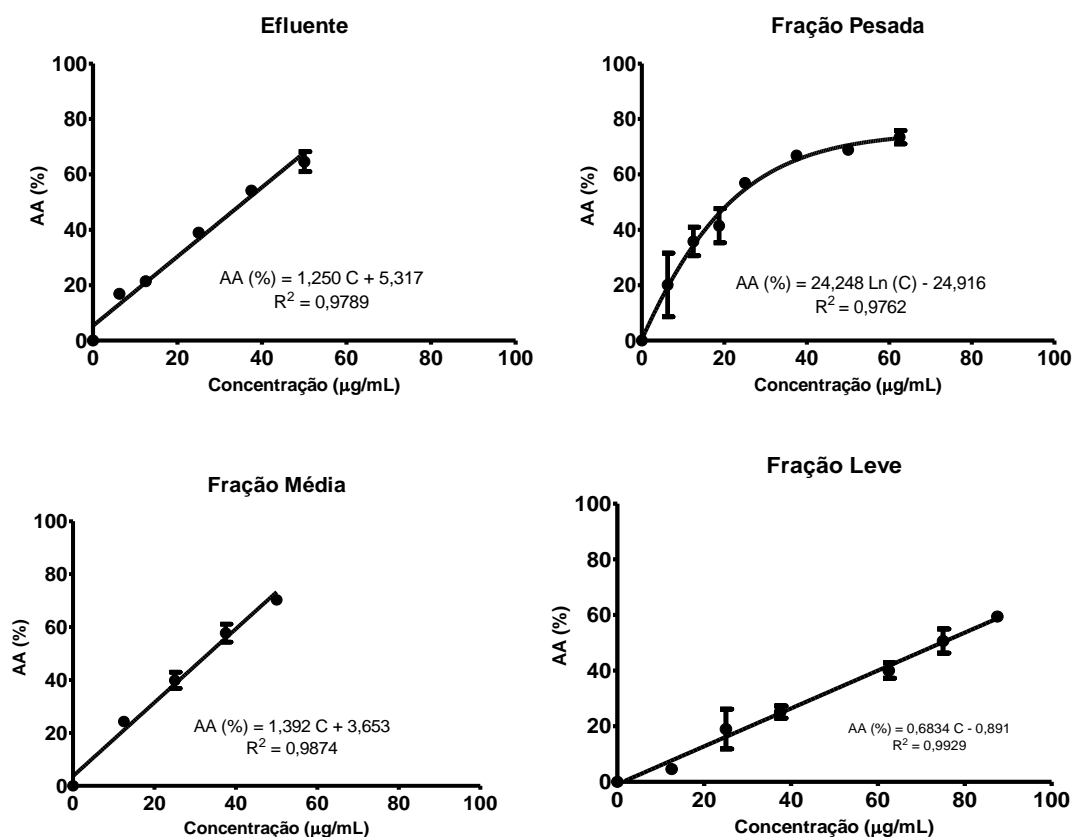
Relativamente aos potenciais biológicos, foi determinado o potencial antioxidante por três métodos diferentes, o potencial de inibição da enzima AChE e o potencial protetor contra agentes oxidantes e físico.

#### **3.4.1. Determinação da Atividade Antioxidante**

A atividade antioxidantes do efluente e das frações foi determinado a partir de três métodos diferentes o da redução do DPPH, o da inibição da peroxidação lipídica e o da inibição da captura de radicais de oxido nítrico.

##### **3.4.1.1. Método da Redução do Radical DPPH**

Utilizando o método do DPPH, descrito na alínea 2.7.3.1, foram obtidos valores de atividade antioxidante de eliminação do radical DPPH para diferentes concentrações de efluente e frações recuperados e que foram utilizados para a construção da figura 3.12 e de modo a possibilitar o cálculo do  $EC_{50}$  do efluente e das frações pesada, média e leve.



**Figura 3.12** - Atividade Antioxidante (AA %) em função da concentração do efluente e das frações (µg/mL).

A partir da figura 3.12 observa-se que a atividade antioxidante aumenta com o aumento da concentração de extrato utilizado, uma vez que quanto maior é concentração maior é o seu potencial antioxidante. Na tabela 3.20 encontram-se os valores do EC<sub>50</sub> obtidos.

**Tabela 3.20** - EC<sub>50</sub> (µg/mL) da atividade antioxidante do efluente e frações.

| Amostra       | EC <sub>50</sub> (µg/mL) |
|---------------|--------------------------|
| Efluente      | 35,73 ± 1,73             |
| Fração Pesada | 21,97 ± 3,48             |
| Fração Média  | 33,31 ± 1,19             |
| Fração Leve   | 74,47 ± 3,26             |

A fração que contém maior poder antioxidante é a fração pesada, uma vez que é a que necessita de menor quantidade de fração para atingir 50 % de atividade antioxidante.

Determinou-se ainda o potencial antioxidante de padrões disponíveis comercialmente, sendo eles o ácido quinico (1), ácido gálico (2), ácido vanílico (5), ácido siríngico (6) e ácido elágico (7). Na tabela 3.21 estão representados os EC<sub>50</sub> dos padrões.

**Tabela 3.21** - EC<sub>50</sub> da atividade antioxidante dos padrões.

| <b>Amostra</b>             | <b>EC<sub>50</sub> (µg/mL)</b> |
|----------------------------|--------------------------------|
| <b>Ácido Gálico (2)</b>    | 0,957 ± 0,044                  |
| <b>Ácido Siríngico (6)</b> | 2,340 ± 0,095                  |
| <b>Ácido Elágico (7)</b>   | 0,785 ± 0,041                  |

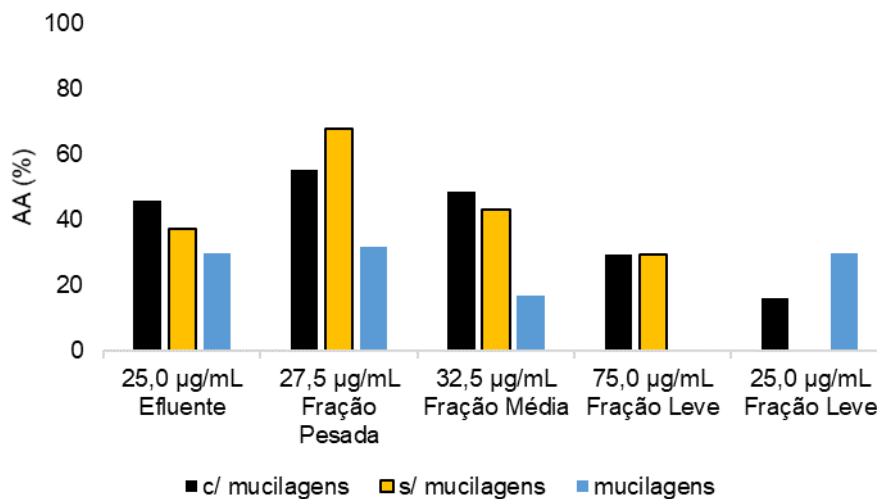
Tanto o ácido quinico como o ácido vanílico apresentavam atividades antioxidantes muito reduzidas, numa amostra com a concentração de 62,5 µg/mL o ácido quinico (1) apenas correspondia a 7,61 % ± 1,96 e o ácido vanílico (5) a 15,31 % ± 1,30, não tendo por isso sido determinado o EC<sub>50</sub> destes dois compostos.

Em particular de cada fração, a fração pesada é a que apresenta um maior poder antioxidante isto deve-se ao facto de esta ser constituído por três compostos pelo ácido quinico (1), ácido carboxílico de brevifolina (4) e pelo ácido elágico (7), uma vez que, o ácido elágico contém um grande poder antioxidante.

A fração média por ser constituída pelo ácido quinico (1), ácido elágico (7) e ácido siríngico (6) fornecem um bom poder antioxidante a fração. Isto porque, o ácido siríngico (6) e o elágico (7) só por si tem uma boa atividade antioxidante e, por outro lado, o ácido quinico apesar de não ser um bom antioxidante, na presença de outros compostos tem a capacidade de potenciar o poder antioxidante de outros compostos, através de um fenómeno de sinergismo.<sup>[11,54,106]</sup>

A fração leve por ser constituída por ácido quinico (1) e ácido vanílico (5), compostos com pouca atividade antioxidante faz com que esta fração apresente baixa atividade antioxidante. Tal como na fração leve, o efluente também apresenta na sua constituição maiores quantidades de ácido quinico (1) e ácido vanílico (5), mas por apresentar uma grande quantidade de ácido elágico (7) apresenta maior poder antioxidante do que a fração leve. A fração leve por conter pouca quantidade de fenóis totais em comparação com o efluente e a fração pesada e média, resulta também no seu potencial antioxidante mais fraco.

Para determinar de que forma as mucilagens afetam a atividade antioxidante procedeu-se a determinação das AA das amostras sem mucilagens e das mucilagens recuperadas para os valores da concentração que correspondem a, aproximadamente os EC<sub>50</sub> obtidos anteriormente. Uma vez que não se tinha quantidades suficientes de mucilagens da fração leve para quantificar a sua percentagem de capacidade antioxidante para 75 µg/mL, foi determinado a atividade antioxidante utilizando apenas 25 µg/mL. Comparado esse valor com o obtido da fração leve total, ou seja, com mucilagens na sua constituição. Por outro lado, não se pode comparar o valor obtido das mucilagens da fração leve com o a fração leve sem mucilagens, porque mais uma vez não se tinha quantidades suficientes de fração sem mucilagens para realizar o ensaio.



**Figura 3.13** - Gráfico de comparação dos valores obtidos da atividade antioxidante (AA %), para as amostras com mucilagens, sem mucilagens, e mucilagens.

Tendo por base a figura 3.13, verifica-se que para a mesma concentração as amostras com mucilagens, barras pretas, apresentam valores de atividade antioxidante, significativamente, maiores em comparação com as amostras sem mucilagens, barras amarelas, com exceção da fração pesada, onde a fração pesada sem mucilagens apresenta melhores valores de atividade antioxidante quando comparadas com os valores de AA (%) da mesma fração com mucilagens e mucilagens da fração. Pode também constatar-se que os compostos presentes nas mucilagens (barras azuis) já identificados por HPLC-DAD (Figura 3.11) fazem com que estas apresentem alguma atividade antioxidante, sendo bastante relevante na fração leve em comparação com a fração total, o que poderá ser devido à quantidade de compostos fenólicos que

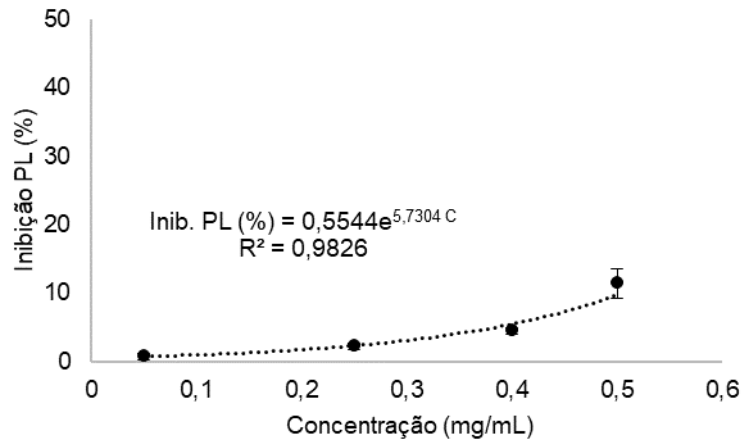
precipitaram junto com as mucilagens no tratamento desta fração, nomeadamente o ácido protocatecuico (3), o ácido vanílico (5), o ácido siríngico (6) e o ácido elágico (7).

Para uma mesma concentração a fração pesada sem mucilagem apresenta melhor atividade antioxidante em comparação com as fração leve e média sem mucilagens, isto pode ser explicado, como se pode observar na figura 3.10, pelo facto da fração pesada sem mucilagens ao contrário das restantes apresentar uma grande quantidade de ácido carboxílico de brevifolina (4). Por outro lado, as mucilagens da fração pesada, figura 3.11, por serem constituídas apenas por ácido elágico (7) e ácido quinico (1), apesar de poder ocorrer o fenómeno de sinergismo, não chega para apresentarem atividades antioxidantes tão grandes como a atividade antioxidante apresentada pela fração normal e pela fração sem mucilagens, que contêm o ácido carboxilo de brevifolina (4) e que não tem o ácido quinico (1). O facto de a fração pesada sem mucilagens ter uma melhor capacidade antioxidante é devido a esta apresentar uma maior quantidade de fenóis totais em comparação a fração pesada normal, como mostrado na tabela 3.18.

Comparando os valores de  $E_{C50}$  obtidos do efluente e dos compostos com valores de outros estudos verifica-se que ao se utilizar membranas com limites de exclusão molecular de 65,48 kDa em vez de 74 kDa<sup>[11]</sup> obtém-se uma fração pesada com melhores valores de atividade antioxidante. Por outro lado, utilizando o método de extração de soxhlet e fragmentos de placas de cortiça triturados<sup>[29]</sup> em vez do efluente da cortiça, consegue-se obter melhores valores do que os obtidos utilizando a tecnologia de membranas, mas estas extrações envolvem tecnologias menos limpas com utilização de solventes orgânicos e um menor isolamento dos compostos fenólicos.<sup>[29]</sup>

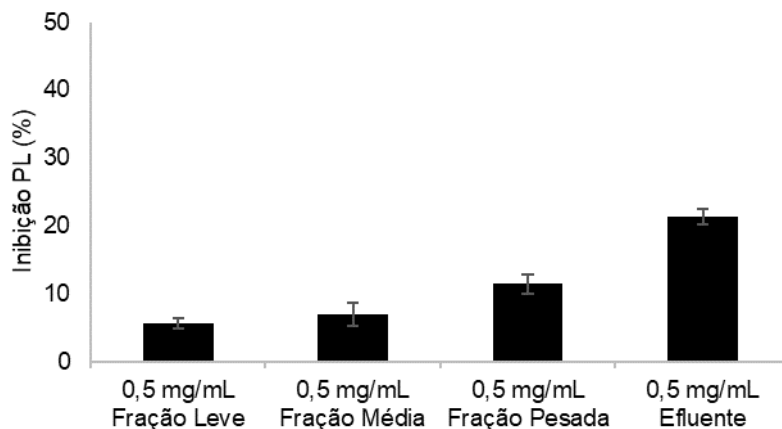
#### **3.4.1.2. Inibição da Peroxidação Lipídica**

Com a análise anterior da atividade antioxidante verificou-se que a fração pesada era a que apresenta melhores valores de AA. Por conseguinte, a inibição da PL começou pela análise da fração pesada a diferentes concentrações, tendo obtido o gráfico representado na figura 3.14.



**Figura 3.14** - Inibição da peroxidação lipídica (%) em função da concentração da fração pesada (mg/mL).

Na figura acima, é possível verificar que com o aumento da concentração da fração pesada ocorre um aumento da inibição da PL. Por outro lado, verifica-se que para uma concentração de 0,5 mg/mL, o valor de inibição continua a ser, significativamente, baixo 11,43 %  $\pm$  2,9, comparativamente ao valor padrão da concentração do ácido ascórbico que tem a capacidade de inibir metade da peroxidação lipídica (0,38 mg/mL).<sup>[107]</sup> Após cálculo da inibição PL para a fração pesada, prosseguiu-se a determinação das inibições da PL para as restantes frações e efluente a uma concentração de 0,5 mg/mL, verificando que o efluente apesar de ser o que apresenta uma maior inibição, continua a apresentar valores muito reduzidos de capacidade de inibição, quando comparado com o ácido ascórbico.



**Figura 3.15** - Percentagem da inibição da peroxidação lipídica das amostras com concentração de 0,5 mg/mL.

O efluente apresenta um maior potencial de inibição da peroxidação lipídica, quando comparada com as restantes frações, devido à presença de ácido gálico (2) e

da grande quantidade de ácido elágico (7). Que demonstrado noutro trabalho apresentam boas capacidades de inibição da peroxidação lipídica, tendo o ácido gálico um valor de  $0,42 \pm 0,02$  mg/mL, que é a concentração que corresponde a 50 % da inibição da peroxidação, e o ácido elágico  $0,67 \pm 0,05$  mg/mL. [54]

Os baixos valores obtidos já eram esperados podendo resultar da interação de açúcares presentes no efluente e nas amostras. [54,108]

### 3.4.1.3. Inibição da Captura de Radicais de Óxido Nítrico

A fração pesada por ser a que apresentava melhores valores de atividade antioxidante, foi testada pelo seu potencial de inibição da captura de radicais NO e foi verificado que apresentava uma baixa capacidade inibitória mesmo para uma elevada concentração de fração, tabela 3.22.

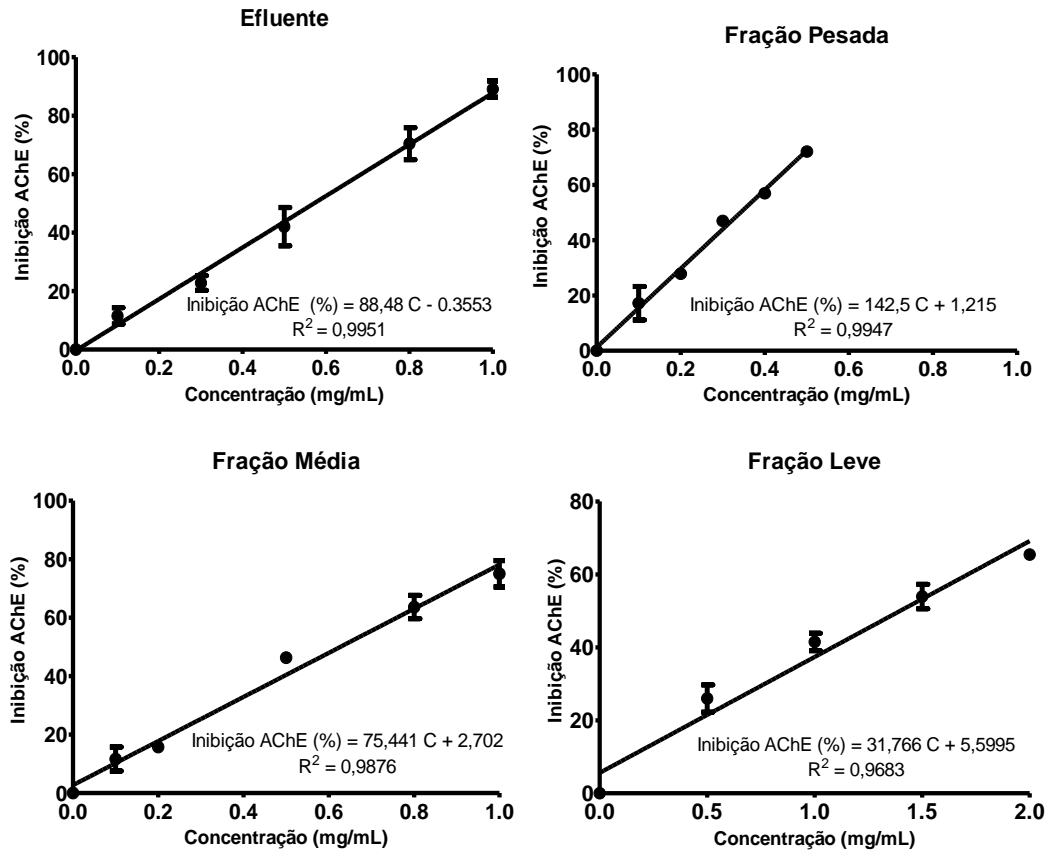
**Tabela 3.22** -Percentagem de inibição da redução de radicais NO presentes na fração pesada.

| Amostra                   | Inibição da captura de radicais NO <sub>x</sub> (%) |
|---------------------------|---|
| Fração Pesada (2,5 mg/mL) | 24,40   |

Uma vez que a fração pesada não apresentava um valor de inibição significativo, quando comparado com o valor padrão da concentração do ácido ascórbico que tem a capacidade de inibir a captura de metade dos radicais NO ( $0,0455$  mg/m)<sup>[55,109]</sup>, não se testou a capacidade das outras frações nem do efluente.

### 3.4.2. Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

Seguindo o procedimento enunciado no ponto 2.7.4, foi determinado a capacidade do efluente e das restantes frações de inibirem a acetilcolinesterase. Para tal foi determinada a percentagem de inibição da AChE com diferentes concentrações de efluente e de frações, onde foram obtidas as curvas da figura 3.16.



**Figura 3.16** - Inibição da AChE em função da concentração do efluente e das frações (mg/mL).

A partir das equações das retas obtidas e representadas na figura 3.16, foi determinado a concentração de fração ou efluente a que corresponde a 50 % de inibição da AChE,  $AC_{50}$ , das amostras, representadas na tabela 3.23.

**Tabela 3.23** - AC<sub>50</sub> (µg/mL) da inibição da AChE (%) do efluente e frações.

| <b>Amostra</b>       | <b>AC<sub>50</sub> (mg/mL)</b> |
|----------------------|--------------------------------|
| <b>Efluente</b>      | 0,561 ± 0,047                  |
| <b>Fração Pesada</b> | 0,342 ± 0,012                  |
| <b>Fração Média</b>  | 0,627 ± 0,050                  |
| <b>Fração Leve</b>   | 1,397 ± 0,037                  |

Após determinação dos AC<sub>50</sub> de cada uma das amostras foi verificado que a amostra que apresenta um maior potencial de inibição da AChE é a fração pesada e a que apresenta inibição inferior é a fração leve. Classificando em termos do potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase, ou seja, em potencial potente (>50 %) moderado (30 – 50 %) baixo ou inativo (< 30 %) para uma concentração de 1 mg/mL, apenas a fração leve se encontra no moderado e as restantes tem um potencial elevado. [33; 110]

De seguida foi determinado o AC<sub>50</sub> da inibição da AChE dos padrões disponíveis comercialmente, de modo a possibilitar a justificação da capacidade de inibição da AChE do efluente e das frações.

**Tabela 3.24** - Valores obtidos da inibição da AChE (%), para os padrões.

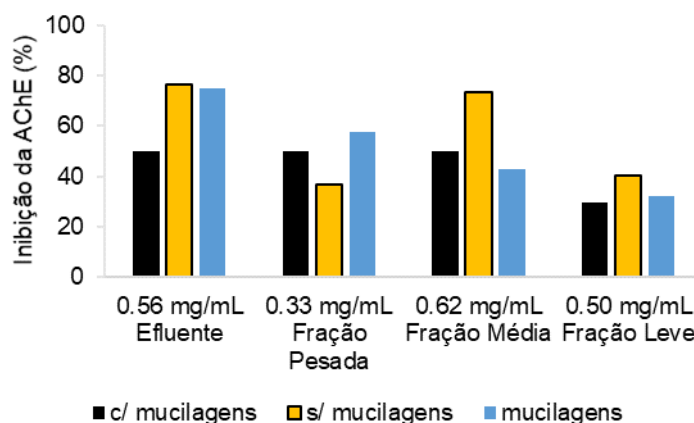
| <b>Amostra</b>            | <b>AC<sub>50</sub> (mg/mL)</b> |
|---------------------------|--------------------------------|
| <b>Ácido Quínico (1)</b>  | 1,362 ± 0,145                  |
| <b>Ácido Gálico (2)</b>   | 0,381 ± 0,150                  |
| <b>Ácido Vanílico (5)</b> | 0,947 ± 0,190                  |
| <b>Ácido Sirínico (6)</b> | 0,376 ± 0,020                  |
| <b>Ácido Elágico (7)</b>  | 0,112 ± 0,007                  |

De acordo com a tabela 3.24 o ácido elágico (7), o ácido sirínico (6) e o ácido gálico (2) são os compostos fenólicos presentes no efluente e nas frações que têm maior poder inibitório. Por outro lado, o ácido quínico (1) e o ácido vanílico (5) são os que apresentam pior atividade de inibição da AChE. A nível da literatura, o ácido gálico (2) é dos compostos fenólicos que apresenta maior AC<sub>50</sub>, sendo que o ácido elágico (7) um valor de AC<sub>50</sub> superior. [111, 112] Relativamente ao ácido sirínico (6) este apresenta um valor de inibição da AChE similar ao do ácido gálico (2). [113]. Mas todos os compostos fenólicos a excepção do ácido quínico apresentam potencial elevado. [33; 110].

A fração leve apresenta menor capacidade de inibição da enzima AChE possivelmente devido ao facto de apresentar menores quantidade de fenóis totais na

sua constituição, como visto na tabela 3.18, e não apresentar na sua constituição ácido elágico (7). Por sua vez, a fração média e o efluente apresentam valores superiores de  $AC_{50}$  possivelmente devido a sua composição fenólica elevada. A fração pesada é a que apresenta um maior potencial de inibição da enzima AChE possivelmente devido ao ácido elágico (7).

Mais uma vez, foi testado de que forma a remoção das mucilagens e as mucilagens afetavam a capacidade de inibição da AChE, para tal foram preparadas soluções com as concentrações correspondentes ao  $AC_{50}$ , determinados anteriormente. A exceção da fração leve, visto não haver quantidade de massa seca suficiente onde foi utilizado uma concentração de apenas 0,50 mg/mL que na fração leve apresenta um potencial de inibição de 29,81 %. Os valores de inibição obtidos nos diferentes tipos de fração usados foram representados na figura 3.17.



**Figura 3.17** - Gráfico de comparação dos valores obtidos da inibição da AChE, para as amostras com mucilagens, sem mucilagens, e mucilagens.

Analisando a figura 3.17, foi verificado que na maioria dos casos na ausência de mucilagens (barra amarela), à exceção da fração pesada, obtêm-se maiores valores de inibição da AChE relativamente à fração com mucilagens (barra preta), isto pode dever-se ao facto das frações sem mucilagens apresentarem uma maior composição fenólica.

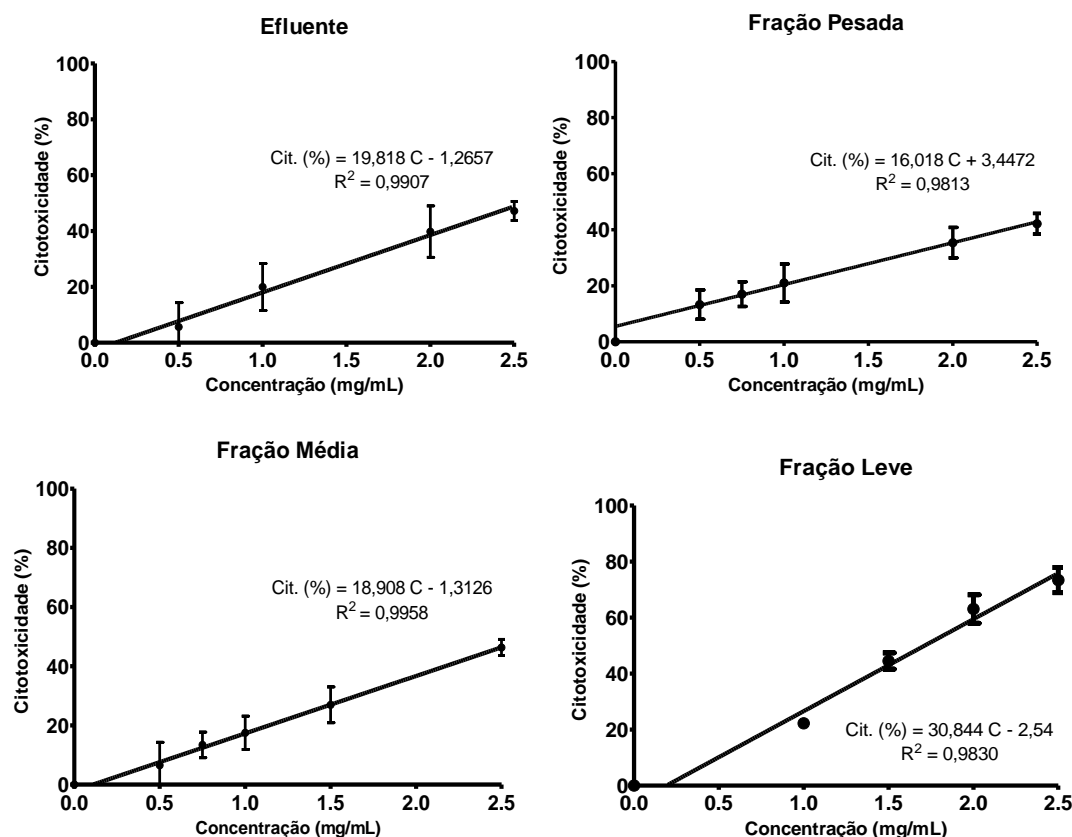
Por outro lado, visualiza-se que as mucilagens (barras azuis) no efluente e na fração pesada apresentam valores maiores de inibição relativamente ao efluente e fração com mucilagens (barra preta), isto pode ter a ver às mucilagens dessas duas frações serem constituídas em grande parte por ácido elágico (7), o composto fenólico que revelou maior capacidade de inibição da AChE.

Relativamente a fração pesada, comparando os valores figura 3.17 com os compostos fenólicos que a constituem, verifica-se que o facto da fração pesada sem mucilagens (barra preta) apresentar uma percentagem mais baixa resulta possivelmente da perda de ácido elágico (7) nas mucilagens. No caso do efluente sem mucilagens e fração média sem mucilagens (barras amarelas) uma vez que apresentam ácido sirínico (6) pode justificar apresentarem maior inibição de AChE.

Comparando os valores obtidos neste trabalho com valores de outros estudos, verifica-se que se obteve uma melhor inibição de atuação da enzima acetilcolinesterase utilizando o processo descrito neste trabalho, ou seja utilizando o efluente da cortiça e a tecnologia de membranas em vez de se utilizar as folhas, as bolotas e a cortiça do sobreiro utilizando o método de extração de soxhlet, onde uma amostra 10 mg/mL apresentava apenas  $19,7 \pm 2,4$  % de inibição da AChE.<sup>[29]</sup>

### 3.4.3. Citotoxicidade do Efluente e das Frações

A avaliação da citotoxicidade permitiu determinar que o efluente e as frações não apresentam qualquer toxicidade por estudos efetuados em linhas celulares humanas do cancro do fígado (Hep-G2) e do melanoma da pele (A375). Relativamente às linhas celulares do fígado (Hep-G2), foram obtidas as variações presentes na figura 3.18.



**Figura 3.18** - Citotoxicidade do efluente e das restantes frações em função da concentração, em células Hep-G2.

Com as figuras 3.18, foi possível observar que quanto maior é a concentração das frações e do efluente, maior é a morte celular, sendo a fração leve a que apresenta o declive de citotoxicidade mais elevado ocorrendo maior morte celular para as mesmas concentrações em comparação com os restantes, apesar de não ser muito diferente entre as várias frações e efluente.

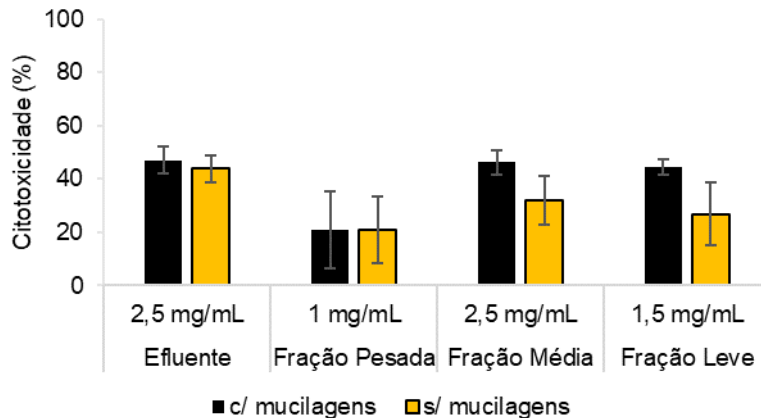
Foram determinados os valores do  $IC_{50,HEP-G2}$  de cada uma das frações e efluente, ou seja, foi determinado o valor da concentração que resulta em 50 % de morte celular. Estando esses valores expressos na tabela 3.25.

**Tabela 3.25** - IC<sub>50,HEP-G2</sub> do efluente e das frações.

| Amostra       | IC <sub>50,HEP-G2</sub> (mg/mL) |
|---------------|---------------------------------|
| Efluente      | > 2,5                           |
| Fração Pesada | > 2,5                           |
| Fração Média  | > 2,5                           |
| Fração Leve   | 1,70 ± 0,08                     |

Analisando a tabela 3.25 verificou-se que a fração leve apresenta valores citotóxicos maiores, no entanto para qualquer dos casos e, visto que as concentrações dos IC<sub>50,HEP-G2</sub> são superiores a 0,1 mg/mL nenhuma das frações ou efluente é considerado citotóxico, e neste caso como estamos a falar de células do fígado pode-se genericamente concluir que as frações e o efluente não exibem hepatotoxicidade. Dado que os compostos só são considerados tóxicos para células humanas se a concentração que provoca 50 % da morte celular for igual ou inferior a 0,1 mg/mL, o que não é o caso. [114]

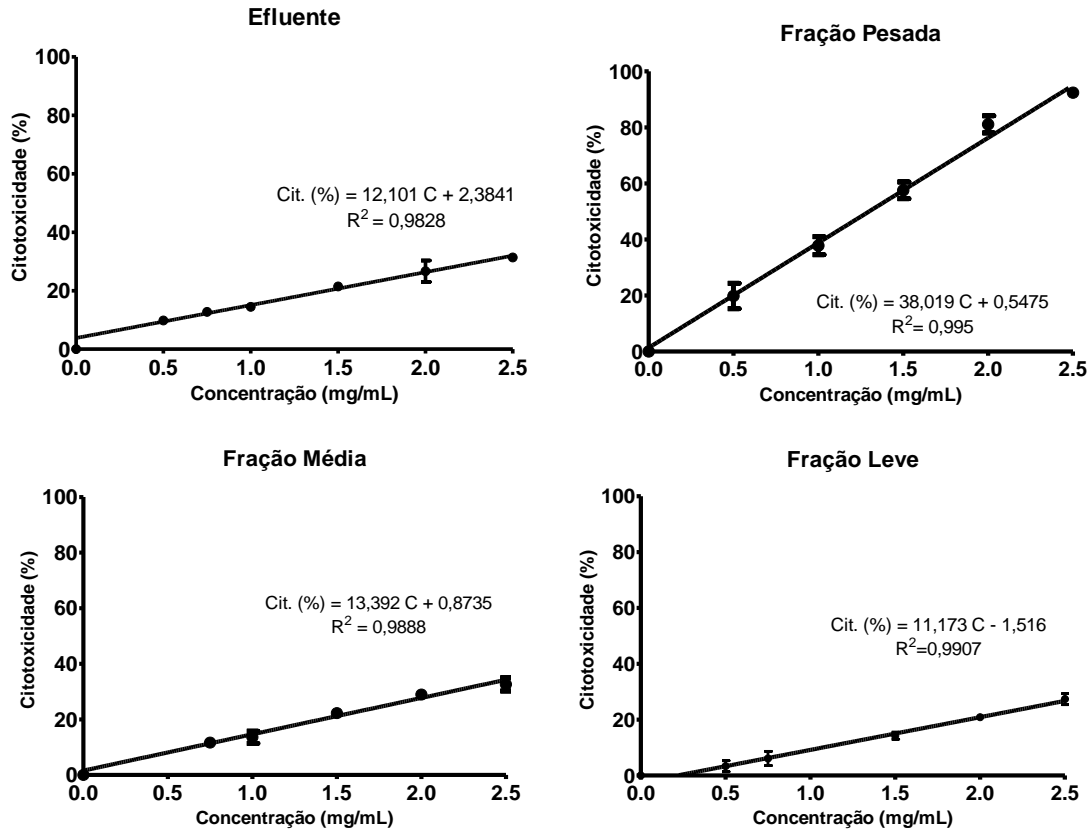
Foi adicionalmente avaliado o efeito citotóxico para o efluente e a fração após remoção das mucilagens e a figura 3.19 representa os resultados obtidos.



**Figura 3.19** - Gráfico de comparação da citotoxicidade das frações com e sem mucilagens.

Todas as frações e efluente apresentam valores de morte celular muito semelhantes apesar de, no geral as frações sem mucilagem apresentarem valores um pouco menores. Podendo concluir que na ausência das mucilagens, apesar de aumentar no geral a concentração de compostos fenólicos presente nas frações, isto não conduziu a que o efluente ou as frações tivessem hepatotoxicidade.

Após análise da citotoxicidade em linhas celulares do cancro do fígado, foi ainda avaliado no que diz respeito à toxicidade das frações e do efluente em linhas celulares humanas do melanoma da pele, A375.



**Figura 3.20** - Citotoxicidade do efluente e das restantes frações em função da concentração, em células A375.

Apesar de na figura 3.20 se denotar que quanto maior é a concentração de amostra utilizada maior é a sua capacidade citotóxica e que na linha celular A375 a fração pesada é a que apresenta maior capacidade citotóxica, foi determinado o  $IC_{50}$  destas amostras (tabela 3.26) onde se verificou que nenhum dos compostos é considerado tóxico, visto o valor do  $IC_{50}$  ser superior a 0,1 mg/mL.<sup>[114]</sup>

**Tabela 3.26** -  $IC_{50,A375}$  do efluente e das frações.

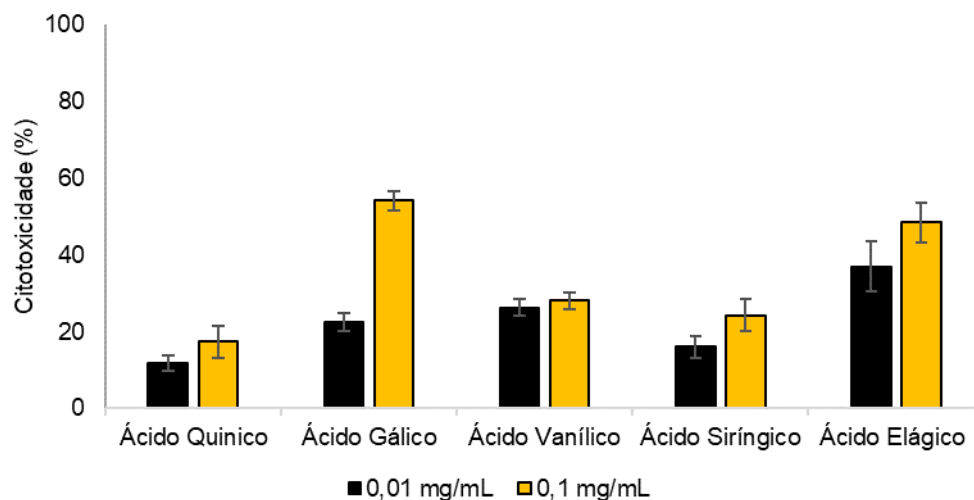
| Amostra       | $IC_{50,A375}$ (mg/mL) |
|---------------|------------------------|
| Efluente      | > 2,5                  |
| Fração Pesada | 1,30 ± 0,089           |
| Fração Média  | > 2,5                  |
| Fração Leve   | > 2,5                  |

A fração pesada é a que apresenta maior valor de  $IC_{50.A375}$  ( $1,301 \pm 7,85$  mg/mL), e portanto, foi estabelecido este limite de concentração da fração pesada a utilizar nos ensaios posteriores de design experimental, presentes na alínea 2.8.2 e 2.9.

Para uma melhor compreensão das substâncias responsáveis pelo poder citotóxico presentes em cada uma das frações e do efluente, foi determinada a citotoxicidade dos padrões comercialmente disponíveis na linha celular A375, estando os valores obtidos ilustrados na figura 3.21 e na tabela 3.27.

**Tabela 3.27** - Valores de citotoxicidade dos padrões.

| Amostra              | Citotoxicidade (%) |                  |
|----------------------|--------------------|------------------|
|                      | 0,01 mg/mL         | 0,1 mg/mL        |
| Ácido Gálico (1)     | $22,58 \pm 1,98$   | $54,23 \pm 4,06$ |
| Ácido Quínico (2)    | $11,96 \pm 2,38$   | $17,38 \pm 2,51$ |
| Ácido Siríntrico (5) | $16,01 \pm 2,19$   | $24,32 \pm 2,17$ |
| Ácido Vanílico (6)   | $26,34 \pm 2,88$   | $28,10 \pm 4,09$ |
| Ácido Elágico (7)    | $37,02 \pm 6,43$   | $48,56 \pm 5,20$ |



**Figura 3.21** - Citotoxicidade dos padrões com concentração de 0,01 e 0,1 mg/mL.

Com a observação da figura 3.21 é possível verificar que apenas o ácido gálico (2) apresenta alguma toxicidade, os restantes padrões apresentam valores de  $IC_{50.A375}$  superiores a 0,1 mg/mL.<sup>[114]</sup> Ainda é de notar que o ácido quínico (1) é o que apresenta menor citotoxicidade numa concentração tanto de 0,1 mg/mL como de 0,01 mg/mL.

A presença de ácido elágico (7) na composição da fração pesada poderá justificar os resultados obtidos para aos valores de IC<sub>50</sub> desta fração ainda assim que não seja considerada tóxica.

### 3.4.4. Estudo do Efeito dos Agentes Oxidantes – TBHP e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do Tempo de Exposição e da Concentração da Fração Pesada

A viabilidade celular da linha celular A375 foi analisada quando na presença de dois agentes oxidantes o hidroperóxido de *ter*-butilo (TBHP) e do peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Na figura 3.22 e 3.23 estão representados os gráficos obtidos da citotoxicidade em função da concentração da substância oxidante durante 3 e 6 horas de incubação com os compostos.

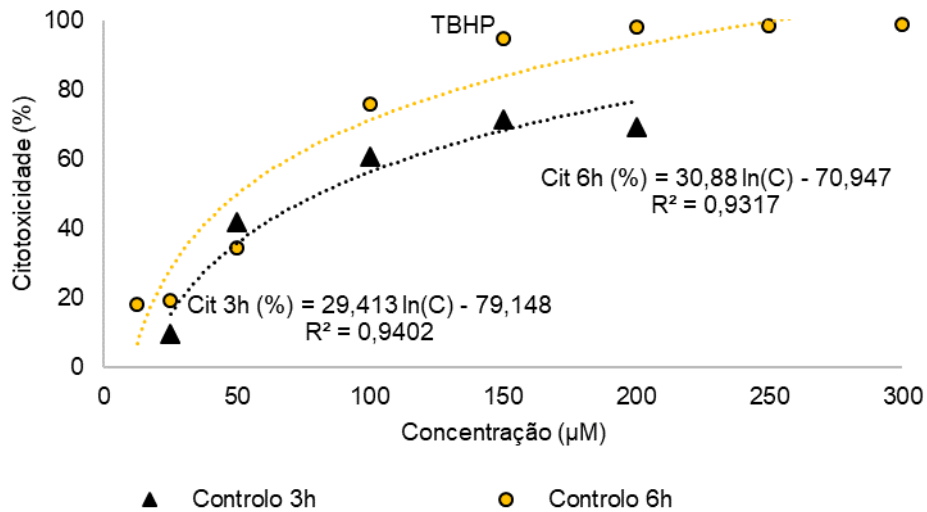


Figura 3.22 – Citotoxicidade em função da concentração de TBHP em linhas celulares A375, após 3 e 6 horas.

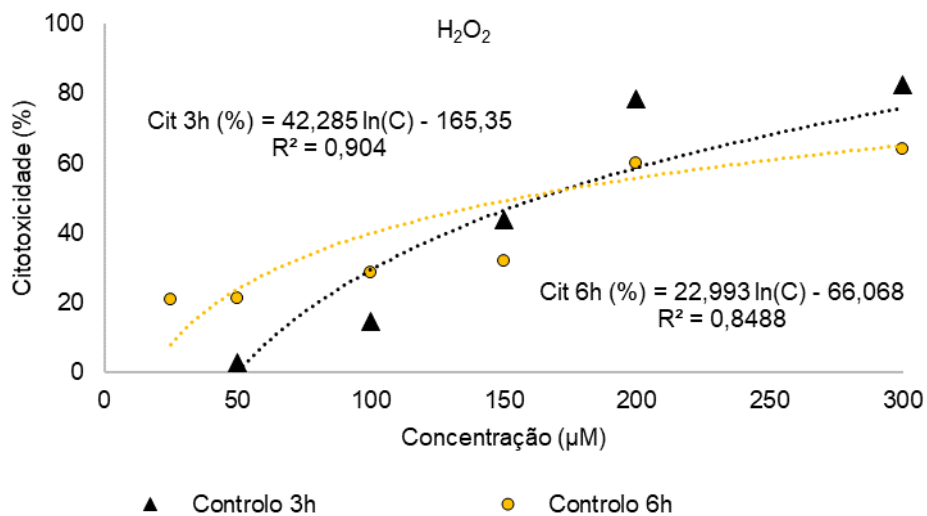


Figura 3.23 - Citotoxicidade em função da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em linhas celulares A375, após 3 e 6 horas.

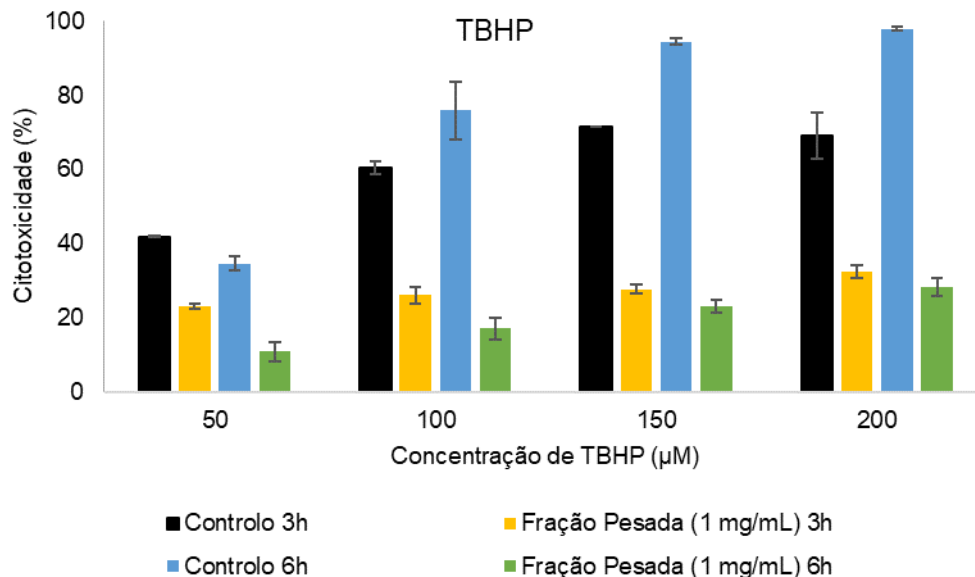
Foi possível determinar o valor do  $IC_{50.A375}$  do TBHP e do  $H_2O_2$  e os resultados mostram que ambos os agentes são altamente tóxicos ficando a viabilidade celular comprometida na sua presença. Na tabela 3.28, estão representados os valores de  $IC_{50.A375}$  obtidos, onde se observa que o TBHP tem um maior poder citotóxico do que o  $H_2O_2$ .

**Tabela 3.28** -  $IC_{50.A375}$  dos compostos TBHP e  $H_2O_2$  após 3 e 6 horas.

| Amostra  | $IC_{50.A375}$ 3 h ( $\mu M$ ) | $IC_{50.A375}$ 6 h ( $\mu M$ ) |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|
| TBHP     | 50,23 $\pm$ 3,99               | 72,88 $\pm$ 5,08               |
| $H_2O_2$ | 162,85 $\pm$ 12,65             | 155,71 $\pm$ 15,52             |

Sendo, os compostos fenólicos conhecidos pelo seu papel protetor, para verificar se os compostos presentes na fração pesada exerciam proteção sobre a toxicidade induzida pelos agentes oxidantes, o TBHP e o  $H_2O_2$ , foram realizados em primeiro lugar alguns ensaios preliminares em que as células foram pré-incubadas com fração pesada e onde se constatou que a toxicidade com concentrações crescentes de TBHP e de  $H_2O_2$  durante 3 e 6 horas foi atenuada relativamente às células não tratadas com fração pesada (controlo).

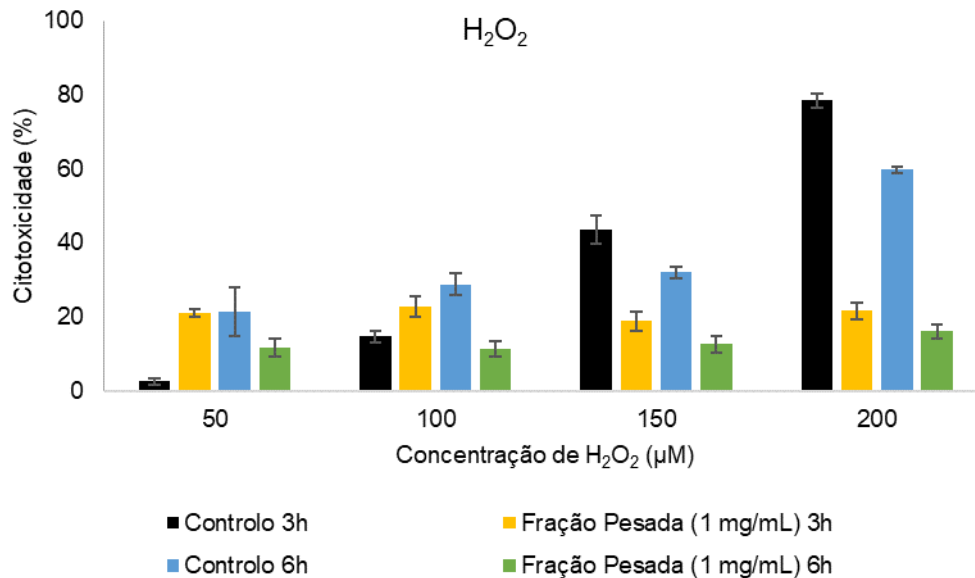
Está representado na figura 3.24, a variação na citotoxicidade obtida relativamente ao TBHP sem (controlo) e com pré-incubação com fração pesada.



**Figura 3.24** - Gráfico de comparação da citotoxicidade em linhas celulares A375, controlo e quando incubadas inicialmente em fração pesada 1 mg/mL. Durante 3 e 6 horas.

Pela análise da figura 3.24, verifica-se que a fração pesada tem capacidade de proteger as células contra agentes oxidantes, dado que as células incubadas inicialmente com fração pesada (barras amarelas e verdes) apresentam menores valores de percentagem de morte celular em comparação com as de controlo, barras pretas e azuis para 3 e 4 h respetivamente. Por exemplo, para uma concentração de TBHP de 200  $\mu\text{M}$  durante 6 horas, na ausência da incubação com a fração pesada ocorre a morte de mais de 80 % das células, e com a fração pesada perto de apenas 20 %, ocorrendo uma redução de aproximadamente 75 % de morte celular.

Foram então realizados ensaios com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  usando a mesma metodologia e está representado na figura 3.25, o perfil de citotoxicidades obtidas após exposição a 3 e 6 h de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ausência (barras pretas e azuis) e na presença de pré incubação com a fração pesada, barras amarela e verde respetivamente.



**Figura 3.25** - Gráfico de comparação da citotoxicidade em linhas celulares A375, controlo e quando incubadas inicialmente em fração pesada 1 mg/mL. Durante 3 e 6 horas.

Analisando o gráfico da figura 3.24 foi observado que tal como nos ensaios com TBHP, com a concentração de 200  $\mu\text{M}$  durante 6 horas com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a fração pesada também exerce um papel protetor reduzindo quase 80 % da morte celular. Apesar de para concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , quando incubadas durante 3 horas ocorrer maior morte nas células que foram incubadas inicialmente com a fração. Em estudos já realizados com o efluente da cortiça era de esperar que o efluente da cortiça conseguisse proteger as células. <sup>[33]</sup>

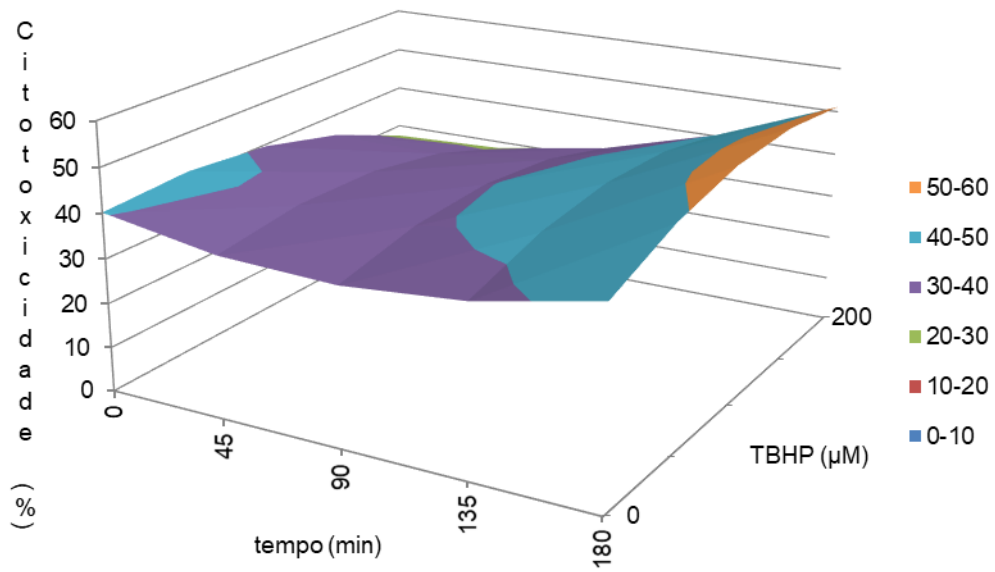
De modo a avaliar em maior profundidade o efeito protetor da fração pesada sobre a toxicidade induzida pelos agentes oxidantes TBHP e o  $H_2O_2$ , foram estudadas as interações dos diferentes fatores que poderiam afetar este efeito, nomeadamente a concentração e o tempo de contacto com o agente oxidante e a concentração da fração pesada usando um conjunto de experiências com variação experimental de 5 níveis de cada um dos fatores e acordo com as tabelas 2.1 e 2.2, numa abordagem no âmbito de um *central composite design*. Os valores de citotoxicidade da linha celular das A375 sujeitas às condições experimentais definidas em 2.8.2.2, permitiu obter as respostas em termos de citotoxicidade celular nas condições experimentais. De seguida, foi feita a análise dos resultados obtidos com base um modelo matemático, para obter a estimativa de parâmetros que permitem prever a resposta/citotoxicidade em variadas condições. De modo a facilitar e compreender como a alteração nos fatores afeta a citotoxicidade foram representadas superfícies de resposta em diferentes condições.

Com os resultados dos ensaios de proteção celular com a fração pesada com 1 mg/mL, com diferentes concentrações dos agentes oxidantes a diferentes tempos de incubação, foi determinado os valores a utilizar no design experimental em termos de concentração do agente oxidante como também do seu tempo de incubação.

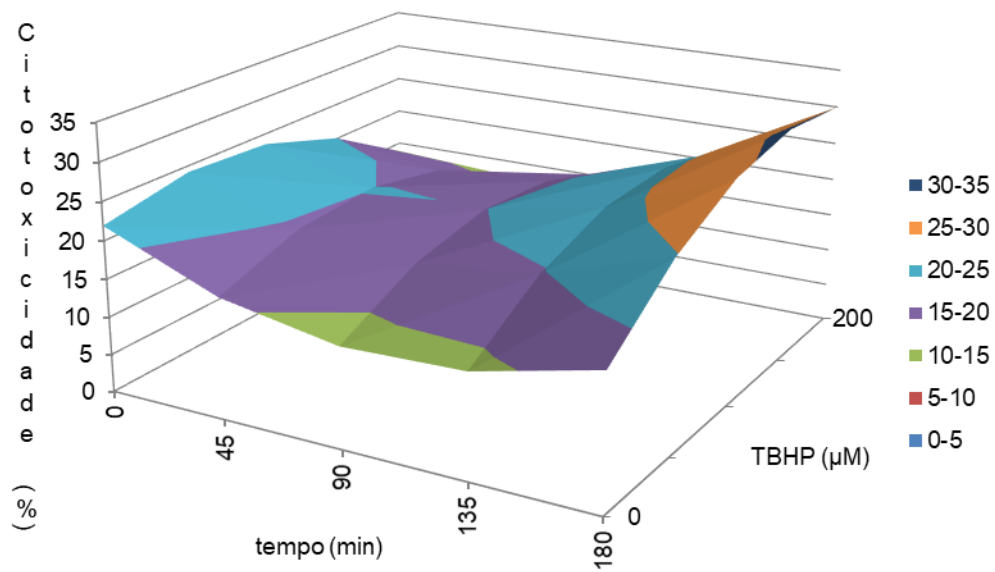
#### CCD - TBHP

A partir da matriz representada na tabela 7.8, foram estimados os parâmetros que permitiram a construção de curvas de superfície com as três variáveis/parâmetros, onde se vez variar dois fatores mantendo-se constante um dos outros. O estudo de todas as superfícies de resposta permitiu selecionar as representativas para a compreensão do problema em estudo. Neste caso foram variados três fatores importantes, a concentração de TBHP e o tempo de contacto e a concentração de fração na pré-incubação das células.

A figura 3.26 representa a variação da citotoxicidade na presença de concentrações crescentes de TBHP a diferentes tempos de incubação na ausência de pré-incubação com fração pesada e a figura 3.27 quando as células são pré-incubadas com 0,5 mg/mL de fração pesada.



**Figura 3.26** - Variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação com o agente oxidante e concentração de TBHP, na ausência de pré-incubação com fração pesada.

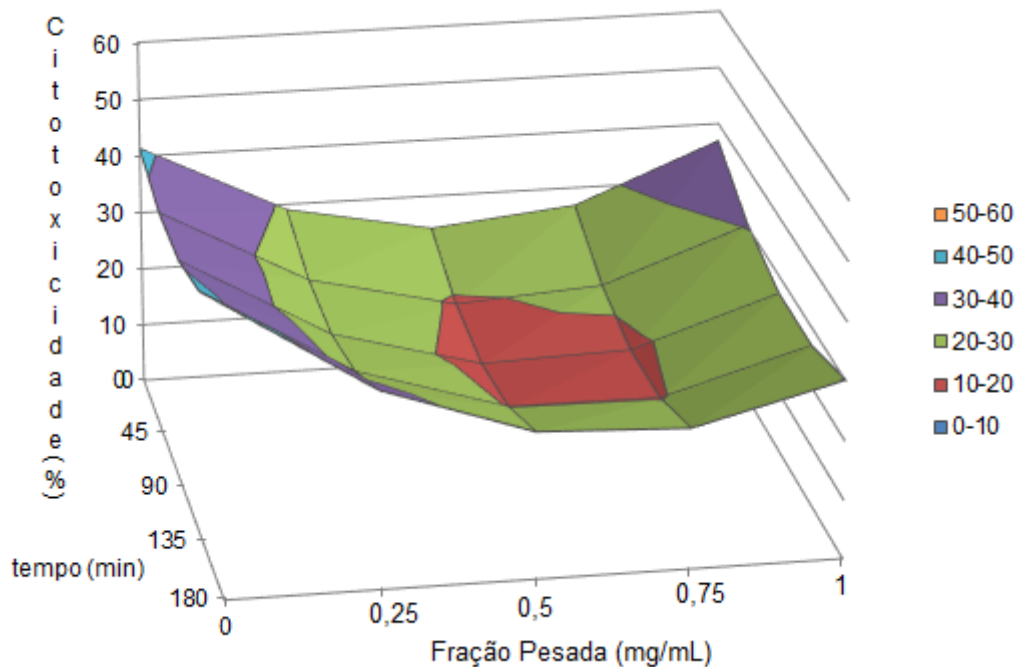


**Figura 3.27** – Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação com o agente oxidante e concentração de TBHP, com concentração da fração pesada de 0,5 mg/mL.

Como se pode observar (figura 3.26 e 3.27) a pré-incubação com fração pesada faz diminuir a citotoxicidade induzida pelo TBHP o que confirma os resultados obtidos anteriormente do efeito protetor da fração pesada.

Analisando a figura 3.27, observa-se que ao se utilizar a fração pesada com uma concentração de 0,5 mg/mL, apresenta maiores valores de citotoxicidade para concentrações de TBHP intermédios e tempos de incubação maiores.

Na figura 3.28 manteve-se constante a concentração do agente oxidante TBHP nos 100  $\mu$ M e foi avaliado a variação da concentração da fração pesada e o tempo de incubação do TBHP.



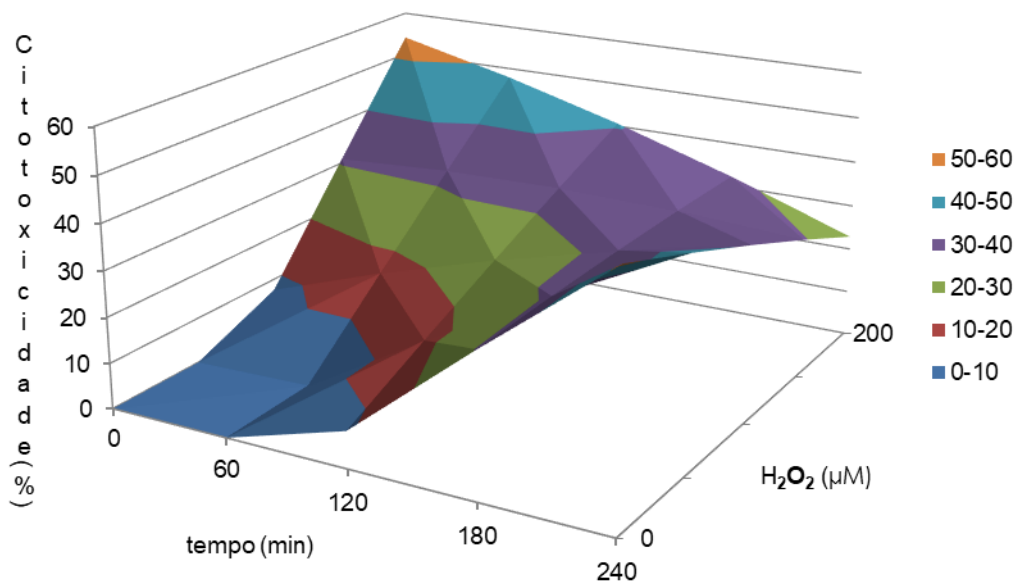
**Figura 3.28** - Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação do agente oxidante e a concentração da fração pesada, com concentração de TBHP de 100  $\mu$ M.

Através da figura 3.28, verifica-se que o ponto ótimo do efeito protetor da fração pesada contra a oxidação induzida pelo THBP (100  $\mu$ M) consiste na utilização de uma concentração de fração pesada entre os 0,5 e os 0,75 mg/mL com um tempo de incubação do TBHP entre os 90 e os 135 min, conseguindo também observar-se que a citotoxicidade diminui com o aumento da concentração da fração pesada.

### CCD -H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

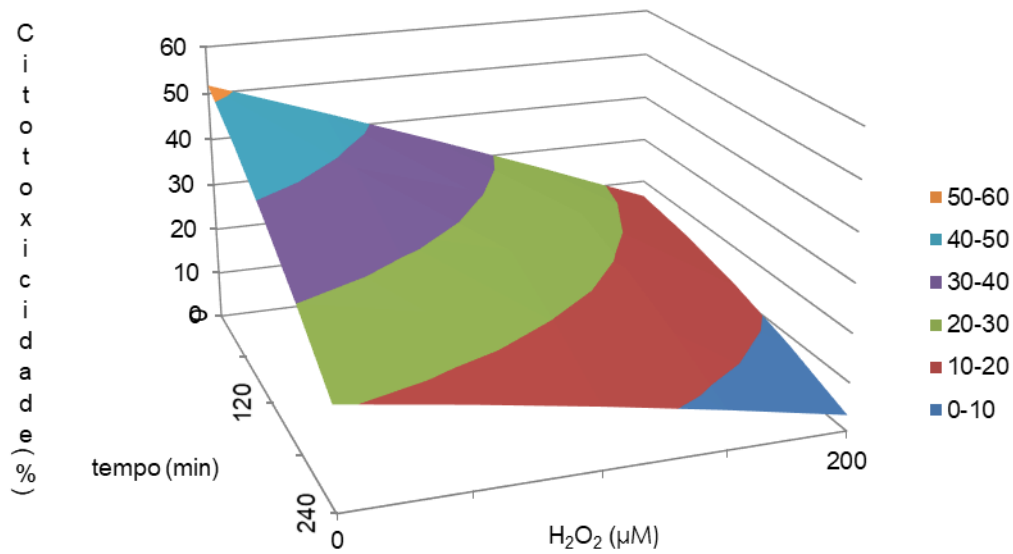
Após desenvolvimento do *central composite design* utilizando o TBHP, procedeu-se a realização do mesmo para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A partir da matriz representada na tabela 7.6, foram estimados os parâmetros que permitiram a construção de curvas de superfície com as três variáveis/parâmetros, onde se vez variar dois fatores mantendo-se constante um dos outros, tal como feito no CCD-TBHP. O estudo de todas as superfícies de resposta permitiu selecionar as representativas para a compreensão do problema em estudo.

Da tabela 7.9 resultou na formação dos seguintes três gráficos em 3 dimensões, figura 3.29, 3.30 e 3.31. Na figura 3.29 manteve-se constante a concentração da fração na pré-incubação das células, variando o tempo de incubação e a concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 3.29** - Variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação com o agente oxidante e concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na ausência de pré-incubação com fração pesada.

A partir da figura 3.29 observa-se que na ausência de pré-incubação com fração pesada, a toxicidade apresenta valores elevados, para concentrações e tempos de incubação também elevados. De seguida, procedeu-se a representação gráfica da variação da citotoxicidade para valores de concentração de fração pesada de 1 mg/mL (figura 3.30).

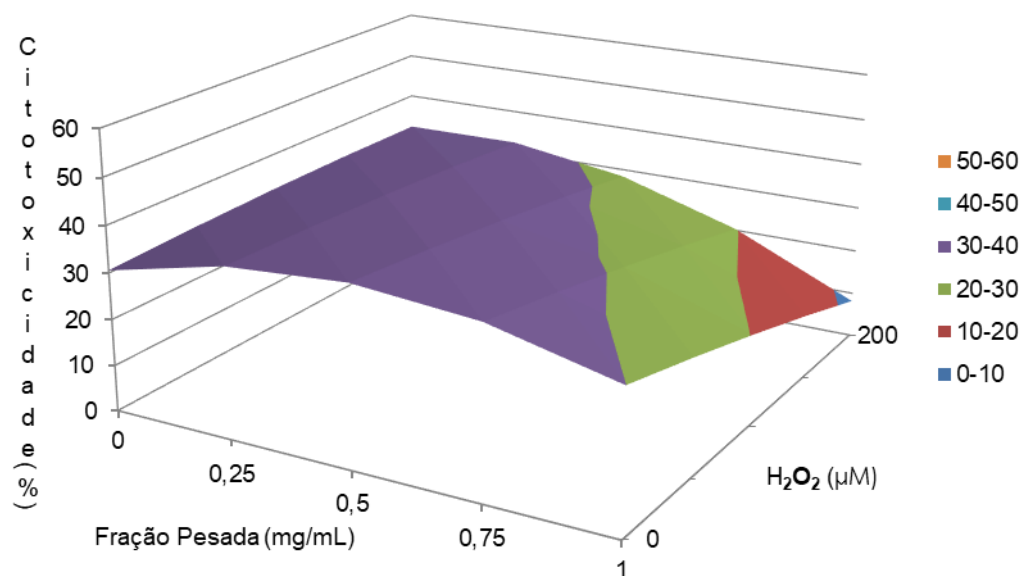


**Figura 3.30** - Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação com o agente oxidante e concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com concentração da fração pesada de 1 mg/mL.

Mantendo-se a fração pesada constante no valor de 1 mg/mL verifica-se que mesmo na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com concentração de 200 µM, que nos testes preliminares possui um citotoxicidade entre os 60 e os 80 %, a viabilidade das células é mantida, e para tempos de incubação também elevados, são alcançados valores entre os 0 e os 10 % de morte celular. Da figura 3.30 retira-se também que a medida que o tempo de incubação diminui e a concentração do agente oxidante também diminui ocorre o aumento da citotoxicidade, isto deve-se a mais uma vez a citotoxicidade da fração pesada.

Analisando de que forma a citotoxicidade varia com a variação da concentração da fração pesada e da concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, manteve-se constante o tempo de incubação de 180 min, estando o gráfico obtido representado na figura 3.31.

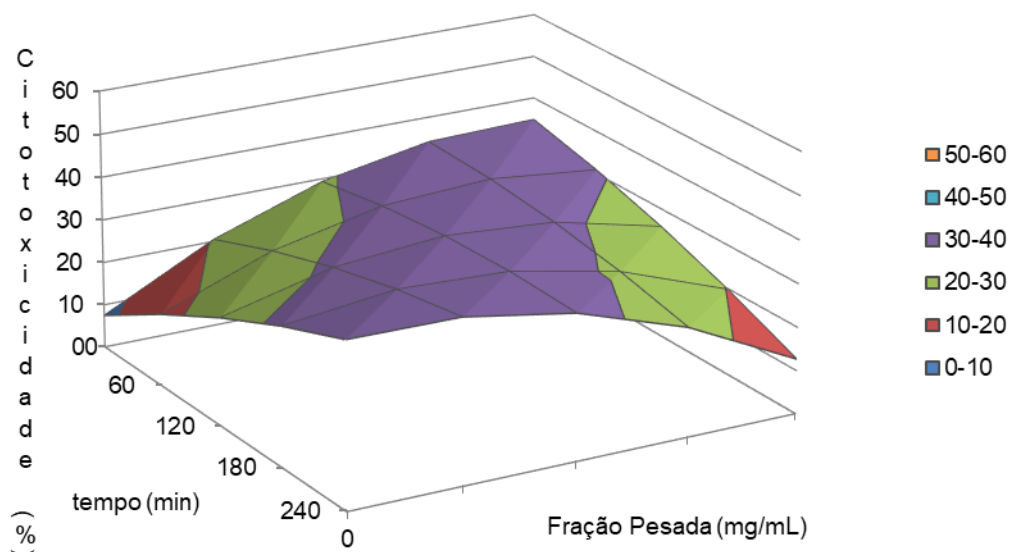
Comparando a figura sem pré-incubação da fração pesada com a incubação da fração pesada, é de referir que a fração pesada apresenta um melhor papel protetor aquando o tempo de exposição ao agente oxidante é elevado ou a concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também é elevada, uma vez que para os tempos de exposição mais baixos apresenta uma maior citotoxicidade na presença da fração pesada.



**Figura 3.31** - Simulação da variação da citotoxicidade em função da concentração da fração pesada e concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com tempo de incubação igual a 180 min.

Mais uma vez, pelo gráfico representado na figura 3.31, na presença de concentrações crescentes de fração pesada a citotoxicidade induzida do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuiu o que corrobora o efeito protetor referido. Verificando que os valores são inferiores a 40 % de citotoxicidade, onde na figura sem a pré incubação chegavam aos 60 %.

Por fim, fez-se a variação do tempo de incubação ao agente oxidante, e concentração de fração pesada, mantendo constante a concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM), obtendo a figura 3.32.



**Figura 3.32** - Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de incubação do agente oxidante e a concentração da fração pesada, com concentração de  $H_2O_2$  de  $100 \mu M$ .

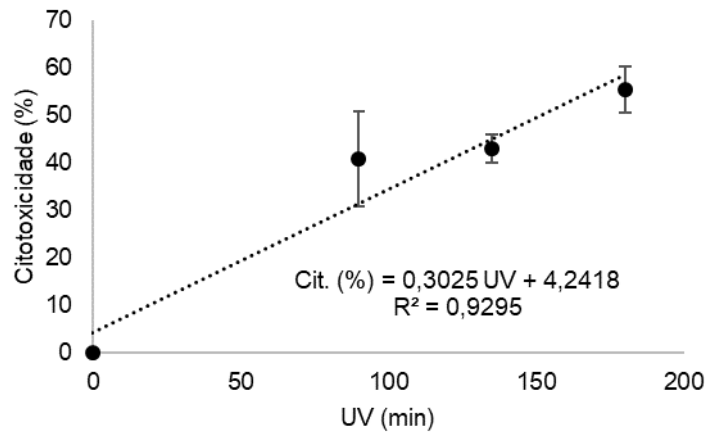
Para uma concentração de  $100 \mu M$  de  $H_2O_2$ , ocorre a formação de uma parábola onde os valores máximos de citotoxicidade encontram-se no topo, e onde ocorre uma maior proteção nas pontas, ou seja, em tempos de incubação baixos e concentrações de fração pesada também baixas ou em tempos de incubação elevados e concentrações de fração pesada elevadas. Concluindo que para proteger as células contra  $100 \mu M$  de  $H_2O_2$  a concentração de fração pesada depende do tempo de incubação e o inverso também.

Em suma, a fração pesada por apresentar uma boa atividade antioxidante apresenta um bom papel protetor contra a oxidação induzida pelo  $H_2O_2$ , protegendo melhor em tempos de incubação maiores (240 min) e em concentrações de  $H_2O_2$  também maiores ( $200 \mu M$ ), com concentrações de fração também grandes (1 mg/mL).

### **3.4.5. Estudo do efeito da radiação UV, do tempo de exposição e da concentração da fração pesada**

Sabe-se que os extratos da cortiça demonstram a capacidade de proteger as linhas celulares de fibroblastos L929 do rato contra a radiação UV. <sup>[115]</sup> Para determinar o potencial protetor da fração pesada, em linhas celulares humanas do cancro da pele (A375) começou-se pela realização de ensaios preliminares, em que se avaliou a

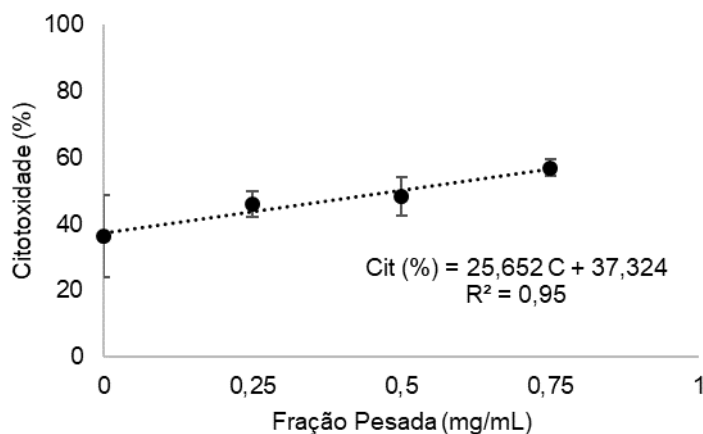
citotoxicidade nas linhas celulares do melanoma da pele A375 do tempo de exposição à radiação UV.



**Figura 3.33** – Citotoxicidade em função do tempo de incubação ao abrigo da luz UV.

Na figura 3.33 é possível observar que a citotoxicidade é diretamente proporcional ao tempo de exposição a radiação UV, dado que a medida que o tempo de exposição aumenta ocorre o aumento da citotoxicidade.

De seguida, determinou-se a citotoxicidade da exposição a radiação UV durante 90 min, quando as células são pré-incubadas com diferentes concentrações de fração pesada, de forma a determinar a capacidade de proteção da fração contra o agente físico.



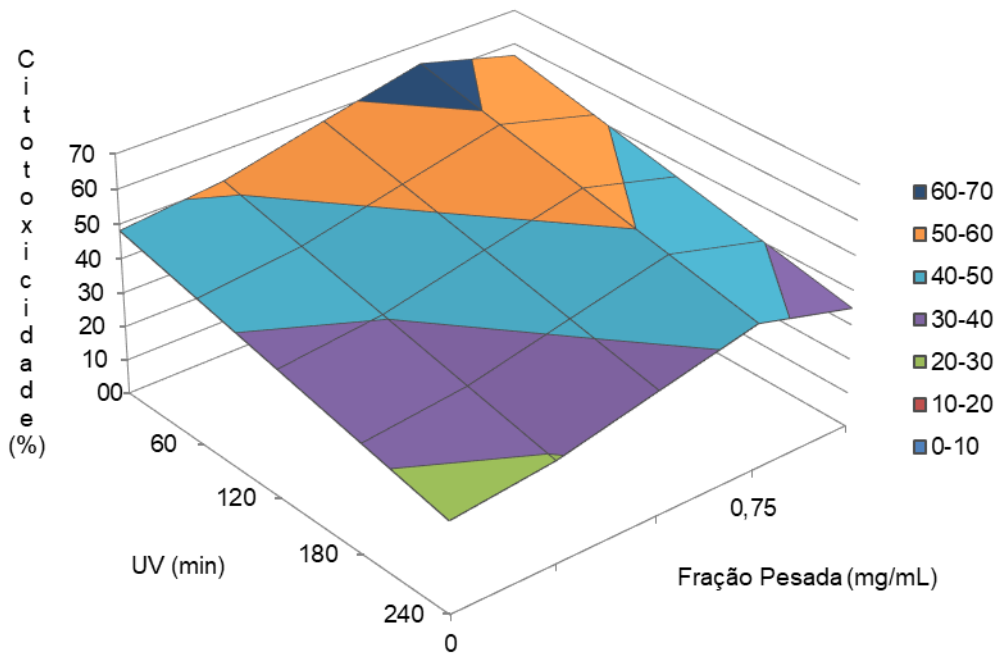
**Figura 3.34** -Citotoxicidade em função da concentração da fração pesada, incubada em radiação UV durante 90 min.

Analisando a figura 3.34, foi verificado que a fração pesada, não possui qualquer tipo de proteção celular contra a radiação UV, uma vez que as células incubadas durante

18 horas em fração pesada com diferentes concentrações apresentam menor viabilidade celular quando expostas a 90 minutos de UV, em comparação a figura 3.20 valores sem estarem expostos a radiação UV.

De modo a avaliar em maior profundidade o efeito protetor da fração pesada sobre a toxicidade induzida pela radiação ultravioleta, foram estudadas as interações dos diferentes fatores que poderiam afetar este efeito, nomeadamente o tempo de exposição a radiação UV e a concentração da fração pesada usando um conjunto de experiências com variação experimental de 5 níveis de cada um dos fatores e acordo com as tabelas 2.4 e 2.5, numa abordagem no âmbito de um *central composite design*. Os valores de citotoxicidade da linha celular das A375 sujeitas às condições experimentais definidas em 2.8.2.3, permitiu obter as respostas em termos de citotoxicidade celular nas condições experimentais. De seguida, foi feita a análise dos resultados obtidos com base um modelo matemático, para obter a estimativa de parâmetros que permitem prever a resposta/citotoxicidade em variadas condições. De modo a facilitar e compreender como a alteração nos fatores afeta a citotoxicidade foi representada a superfície de resposta.

Apesar dos valores da figura 3.34, procedeu-se ao desenvolvimento de um *central composite design*. Para tal, foram determinadas as percentagens de citotoxicidade dos vários ensaios representados na tabela 7.10. A partir da matriz da tabela 7.10 foram previstos os parâmetros que possibilitaram a construção das curvas de superfície de resposta como a apresentada na figura 3.35, que representa a variação da citotoxicidade em função do tempo de exposição a radiação UV e a concentração de fração pesada.

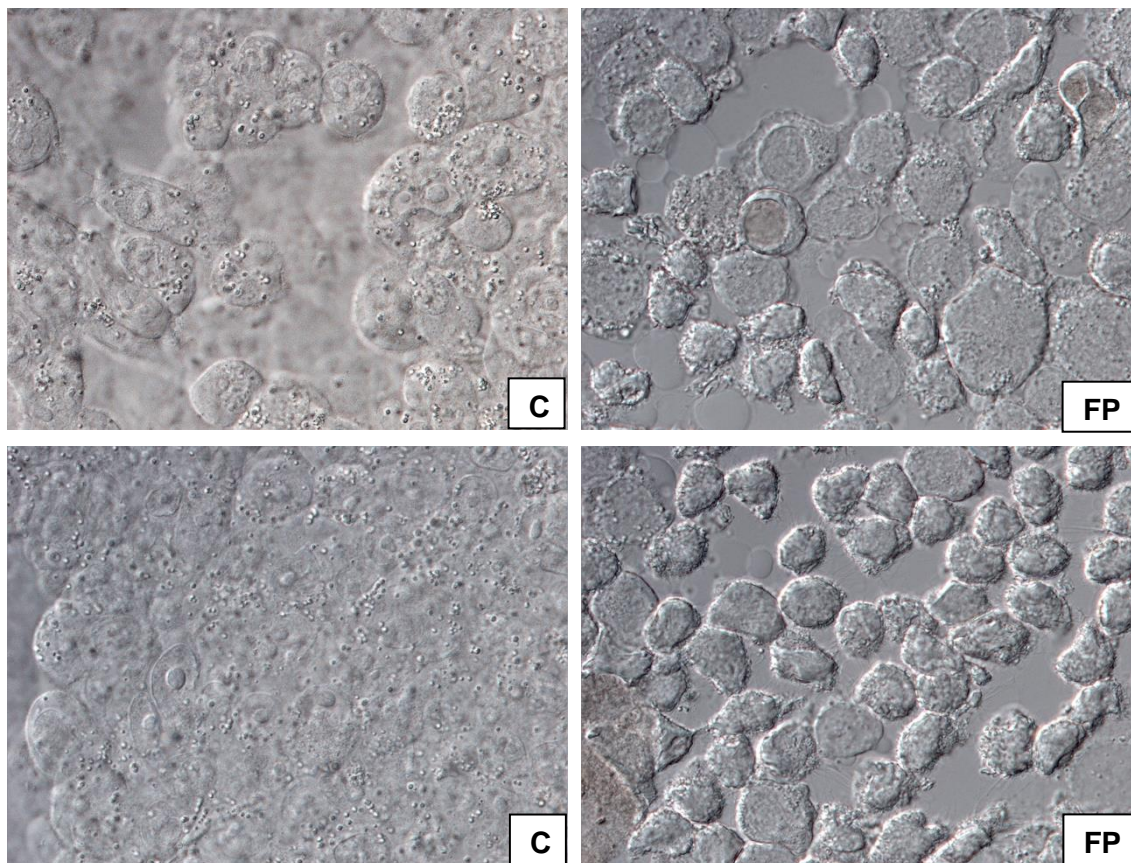


**Figura 3.35** – Simulação da variação da citotoxicidade em função do tempo de exposição a radiação UV e em função da concentração da fração pesada.

A partir da figura 3.35 verifica-se que com o aumento da concentração da fração pesada ocorre um aumento da citotoxicidade. As análises das curvas de superfície não foram conclusivas para afirmar que a fração pesada apresenta um efeito protetor contra os danos da radiação UV sobre a linha celular do melanoma de pele A375.

### 3.5. Observações de microscopia

As células da linha celular do melanoma de pele humana A375 incubadas com fração pesada foram visualizadas ao microscópio por diferentes técnicas em comparação com as células controlo, estando as imagens obtidas ilustradas nas figuras 3.36 a 3.41. Nas figuras que se apresentam as imagens do lado esquerdo correspondem sempre às células controlo, células que não foram incubadas com fração pesada, e as do lado direito células que foram tratadas, aproximadamente, 24 horas em fração pesada com uma concentração de 0,5 mg/mL.



**Figura 3.36** – Microscopia ótica com ampliação de 400 x, fotos do lado esquerdo A375 controlo e imagens do lado direito A375 incubadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h. (x400).

Analisando a figura 3.36 observa-se que genericamente as células incubadas com fração pesada (lado direito) apresentam uma morfologia diferente. Verifica-se que o aspeto das células quando comparadas com as do controlo apresenta algumas diferenças estruturais principalmente no formato e volume da célula, apresentando as células incubadas com fração uma perda do formato normal da célula.

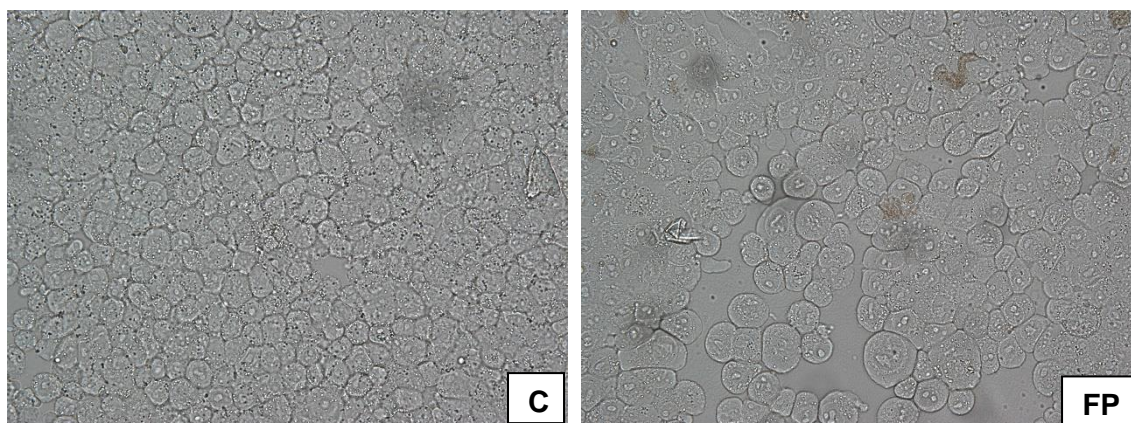
Na figura 3.37. em microscopia de campo claro e na figura 3.38 em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) foi possível confirmar as diferenças estruturais nas células quando na presença da fração pesada (lado direito) relativamente às células controlo (lado esquerdo), sendo bastante perceptível alterações na forma das células com núcleos e nucléolos inchados, algumas membranas distendidas e conteúdos celulares espalhados (manchas castanhas), o que pode ser indicativo de necrose celular.<sup>[116]</sup>

Em microscopia de fluorescência figura 3.39 foi possível observar uma diminuição da quantidade de fluorescência no campo do microscópio nas células incubadas com fração (direita) relativamente às células controlo (esquerda). Tendo em conta que o

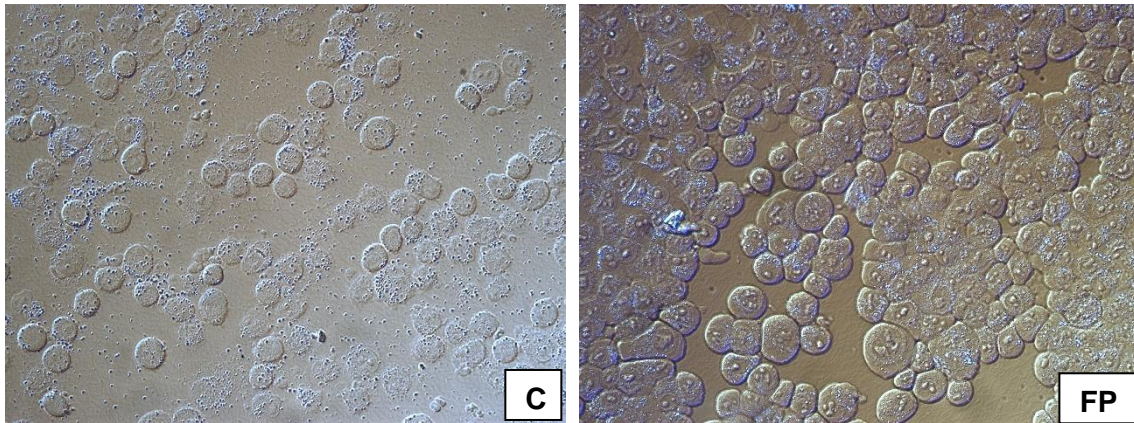
corante Hoescht 33342 é utilizado para corar DNA de células vivas, isto poderá ser indicativo de algumas células estarem mortas na presença da fração pesada. Isto era esperado tendo em conta que à concentração de fração pesada utilizada (0,5 mg/mL) ocorre alguma morte celular como constatado anteriormente nos resultados da citotoxicidade e em anteriores publicações em células do cancro da mama MCF-7 onde as frações da cortiça foram reportadas como inibidoras da proliferação celular.<sup>[12]</sup> No entanto, também foi visível na figura 3.39 que das células tratadas com fração pesada (direita), as que se encontravam fluorescentes exibem maior intensidade de fluorescência que as células controlo (esquerda) isto pode ser indicativo das células na presença da fração pesada apresentarem a cromatina mais condensada o que acontece em fenómenos como a apoptose.<sup>[117]</sup> Na Figura 3.40 de microscopia de SEM é notório que algumas células incubadas com fração pesada (direita) apresentam características típicas de apoptose, nomeadamente a formação de bolbos o que não é tão visível nas células controlo (esquerda).

Neste sentido e tomando estes resultados em conjunto é evidente afirmar que ocorreram alterações na população de células por tratamento com a fração pesada e que resultam na inibição da proliferação celular das células do melanoma da pele A375 aparentemente por mecanismos de apoptose e de necrose.

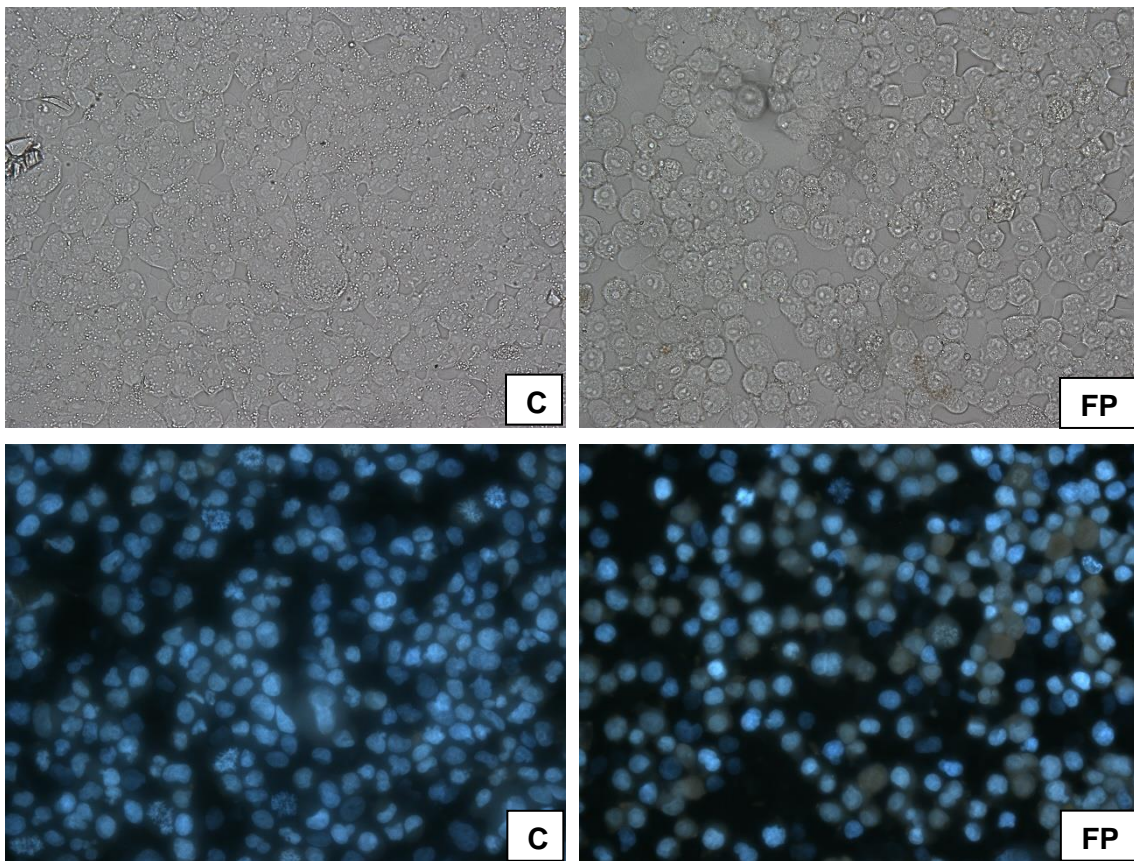
Resultados semelhantes foram descritos para compostos polifenólicos de diferentes origens e podem ser uma explicação para o enunciado papel protector destes compostos contra doenças como o cancro.<sup>[11,30,116-118]</sup>



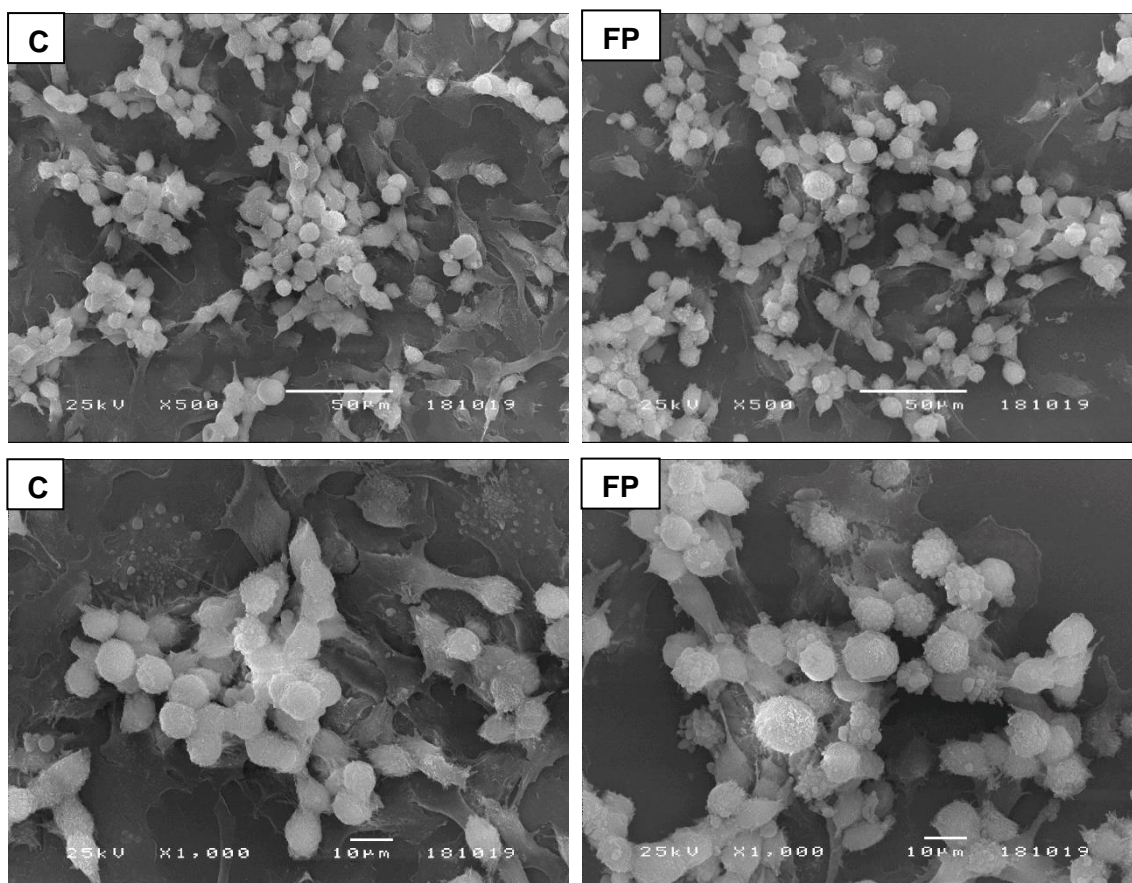
**Figura 3.37** - Microscopia em campo claro, imagem do lado esquerdo células A375 controlo e imagens do lado direito células A375 tratadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h. (x400)



**Figura 3.38** – Microscopia de contraste por interferência diferencial (DIC) da mesma região das imagens da figura 3.36, do lado esquerdo células A375 controle e do lado direito células A375 incubadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h. (x400)



**Figura 3.39** - Microscopia em campo claro (cima), Microscopia de fluorescência (baixo), imagem do lado esquerdo células A375 controle e imagens do lado direito células A375 incubadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h, células coradas com o corante Hoechst 33342 (10 min), radiação UV. (x400)



**Figura 3.40** – Microscopia eletrónica de varrimento, SEM em diferentes ampliações, imagem do lado esquerdo células A375 controlo e imagens do lado direito células A375 incubadas com fração pesada 0,5 mg/mL durante 24h. (x500 e x1000)

## 4. Conclusões

Os compostos presentes e recuperados do efluente da cortiça exibem propriedades biológicas interessantes com potencial de aplicação em variadas áreas, nomeadamente na proteção contra estados de doença, adicionalmente a tecnologia de membranas usada na recuperação permite o tratamento da água residual para que esta possa ser facilmente devolvida ao meio ambiente.

Este trabalho começou pela preparação e caracterização de membranas poliméricas constituídas por acetato de celulose, acetona e formamida, com limites de exclusão moleculares diferentes  $C_{A36,5}$  e  $C_{A28}$  com 65,48 kDa e 9,56 kDa, respetivamente. Posteriormente, o efluente da cortiça foi fracionado através da utilização da tecnologia de membranas de ultrafiltração em modo de diafiltração e em modo de concentração do efluente de cortiça em 3 diferentes frações, as quais foram denominadas como fração pesada, fração média e fração leve.

De seguida, foram identificados através da utilização da cromatografia líquida de elevada resolução os compostos presentes em cada uma das frações e efluente, denotando a presença de maioritariamente compostos fenólicos, o ácido quinico (1), gálico (2), vanílico (5), siríngico (6), elágico (7), protocatecuico (3) e ácido carboxílico de brevifolina (4), verificando que o ácido fenólico em maior quantidade nas frações consistia no ácido quinico (1) e o elágico (7). Dos cromatogramas obtidos da corrida cromatográfica no HPLC-DAD, das várias frações determinou-se que a fração pesada e a média eram as frações que mais diferiam do efluente, sendo a fração leve muito similar ao efluente. Sendo que na fração pesada foi possível o isolamento do ácido elágico (7) e do ácido carboxílico de brevifolina (4) e na fração média o isolamento do ácido quinico (1), protocatecuico (3) e do ácido siríngico (6). Evidenciando que o modo de operação da instalação de membranas em modo de diafiltração potencia um melhor isolamento dos compostos fenólicos.

Através do método do Folin-Ciocalteu foi determinado a quantidade de fenóis totais e de taninos de cada uma das frações e efluente, concluindo que o efluente ( $0,290 \pm 0,048$  mg/mg de extrato) e a fração pesada ( $0,176 \pm 0,065$  mg/mg de extrato) eram as frações com maior quantidade de fenóis.

Após caracterização do efluente e das frações foram estudados os seus potenciais biológicos concluindo que a fração pesada de entre as outras amostras e o efluente era a que apresentava melhor valores de atividade antioxidante,  $EC_{50}$  de  $21,97 \pm 6,38$   $\mu\text{g/mL}$ ,

de potencial de inibição da AChE,  $AC_{50}$  de  $0,342 \pm 3,449$  mg/mL e a que continha maior poder citotóxico a nível das células do melanoma da pele A375,  $IC_{50.A375}$  de  $1,30 \pm 7,85$  mg/mL. Apesar de ser a fração com maior capacidade de diminuir a viabilidade celular de células cancerígenas, nenhuma das frações ou efluente foi considerado citotóxico, visto os valores de  $IC_{50}$  não serem inferior a 0,1 mg/mL. Por outro lado, a fração que apresentava um maior valor de  $IC_{50.HEP-G2}$  citotóxico nas células do cancro do fígado (HEP-G2) é a fração mais similar ao efluente, a fração leve com um valor de  $IC_{50.HEP-G2}$  de  $1,70 \pm 9,10$  mg/mL.

Através dos ensaios dos potenciais biológicos, foi possível concluir que existe uma correlação entre os compostos fenólicos presentes em cada uma das frações do efluente e as atividades antioxidantes, de inibição enzimática (AChE) e de citotoxicidade.

Com base nesses resultados prosseguiu-se a determinação do potencial protetor da fração pesada contra agentes oxidantes como o TBHP e o  $H_2O_2$  e contra danos por radiação UVC em células do melanoma da pele A375, por uma metodologia de superfície de resposta. Concluindo que a fração pesada tem uma elevada capacidade de proteção contra agentes oxidantes, contra o stress oxidativo, mas sem resultados conclusivos sobre a proteção contra a radiação UVC. Ensaios de microscopia permitiram ainda concluir que as células cancerígenas A375 tratadas com a fração pesada sofrem alterações morfológicas responsáveis pela morte celular por apoptose ou necrose o que parece reforçar o papel muitas vezes atribuído aos compostos fenólicos na proteção contra o cancro.

## 5. Perspetivas Futuras

Em trabalhos futuros seria interessante aprofundar de que forma os compostos fenólicos se ligam às células e de que forma estes alteram ou protegem a morfologia das mesmas em condições de stress oxidativo ou após irradiação por UVC, através do aprofundamento da visualização das células por microscopia, microscopia eletrónica de varrimento de superfície (SEM) e do método de Hoechst (microscopia de fluorescência).

Relativamente ao ácido carboxílico de brevifolina, seria importante a determinação do seu potencial biológico, nomeadamente o poder antioxidante e do seu poder protetor, uma vez ser o composto predominante na fração pesada, fração que obteve melhores valores.

Por fim, seria interessante aprofundar o estudo sobre o potencial protetor da fração pesada contra agentes físicos como a radiação UVC, e analisar o poder protetor das restantes frações e efluente no seu estado normal, sem mucilagens e mucilagens.

## 6. Referências Bibliografia

- [1] Amorim (2018). Acedido em 2 de Fevereiro de 2018, em <http://www.amorim.pt>
- [2] 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
- [3] Pereira, J., Bugalho, M., Caldeira, M. (2008). From the Cork Oak. *APCOR*.
- [4] Costa, A., Pereira, H., Oliveira, A. (2003). Variability of radial growth in cork oak adult trees under cork production. *Forest Ecology and Management*, 175, pp.239-246.
- [5] APCOR (2018). Acedido a 2 de fevereiro de 2018, em <https://www.apcor.pt>.
- [6] Pereira, H. (2007). Cork: Biology, Production and Uses. *Elsevier*, Amsterdão, pp.56
- [7] Oliveira, G., Costa, A. (2012). How resilient is *Quercus suber* L. to cork harvesting? A review and identification of knowledge gaps. *Forest Ecology and Management*, 270, pp. 257-272
- [8] Green Cork (2018). Acedido em 2 de fevereiro de 2018, em <http://www.greencork.org>.
- [9] C.E. Liège. (2011). Código Internacional das Práticas Rolheiras. *European Cork Federation*, versão 6.03.
- [10] Dias-Machado, M., Madeira, L. M., Nogales, B., Nunes, O. C., Manaia, C. M. (2006). Treatment of cork boiling wastewater using chemical oxidation and biodegradation. *Chemosphere*, 64, pp. 455-461.
- [11] Gomes, L., Borges, C., Serralheiro, M., Minhalma, M., Pacheco, R. (2017). Cork processing wastewaters components fractionated by ultrafiltration membranes—studies of antioxidant and antitumoral activity. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 93 (3), pp.861-870.
- [12] Batista, M., Rosete, M., Ferreira, I., Ferreira, J., Duarte, C., Matias, A., Poejo, J. Crespo, J., Valério, R. (2015). Extracto Hidro-Glicólico de Cortiça, Processo para a sua Preparação, Formulações Compreendendo o Referido Extracto e Sua Utilização. WO 2015/152746 AL.
- [13] Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, pp.839-851.
- [14] Geraldés, V., Minhalma, M., Pinho, M., Anil, A., Ozgunay, H., Bitlisli, B., Sari, O. (2009). Nanofiltration of Cork Wastewaters and their Possible Use in Leather

- Industry as Tanning Agents. *Polish Journal Environmental Studies*, 18(3), pp.353-357.
- [15] Minhalma, M., Domínguez, J. R., Pinho, M. N. (2006). Cork processing wastewaters treatment by na ozonization/ ultrafiltration integrated process. *Desalination*, 191, pp. 148-152.
- [16] Ministério do Ambiente (1998). Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de agosto. Diário da República – I série – A. p. 3717
- [17] Bernards, M. (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany*, 80(3), pp. 227-240.
- [18] Gil, L. (1998). Cortiça – Produção, Tecnologia e Aplicação. *Ed INETL*. Lisboa.
- [19] Pereira, H. (2010). Cork: Biology, Production and uses. *Elsevier Publications*, Amsterdam.pp. 55
- [20] Pereira, H. (2013). Cork chemical variability. *BioResources*, 8(2), pp.2246-2256.
- [21] Pereira, H. (1988). Chemical composition and variability of cork from *quercus suber* L. *Wood Science and Technology*, 22, pp.211-218.
- [22] Gandini, A., Neto, C. P., Silvestre, A. J. D. (2006). Suberin: A promising renewable resource for novel macromolecular materials. *Progress in Polymer Science*. 31, pp. 878-892.
- [23] Oliveira, H., Yoon, B., Michaud, V., Nam, J., Suhr, J. (2017). All natural cork composites with suberin-based polyester and lignocellulosic residue. *Industrial Crops & Products*, 109, pp. 843-849.
- [24] Carrot, S. P. J. M., Carrott, M. M. L. R. (2007). Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: A review. *Bioresource Technology*, 98, pp. 2301-2312.
- [25] Carriço, C., Ribeiro, H., Marto, J. (2018). Converting cork by-products to ecofriendly cork bioactive ingredients: Novel pharmaceutical and cosmetics application. *Industrial Crops & Products*, 125, pp.72-84.
- [26] Conde, E., Cadahía, E., García-Vallejo, M., Fernández de Simón, B., (1998). Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different Spanish provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, pp.3166–3171.
- [27] 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, pp.1398-1405.
- [28] Minhalma, M., Pinho, M. (2001). Tannic-membrane interations on ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 22-23, pp.479-488.

- [29] Santos, S., Pinto, P., Silvestre, A., Neto, C. (2010). Chemical composition and antioxidante activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products*, 31, pp.521-526.
- [30] Middleton, Jr., Kandaswami, C., Theoharides, TC. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Reviews*, 52, pp.673-751.
- [31] 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.
- [32] Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oskman-Caldentey, K.-M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, pp.494-507.
- [33] Custódio, L., Patarra, J., Alberício, F., Neng, N., Nogueira, J., Romano, A. (2013). Extracts from *Quercus* sp. acorns exhibit *in vitro* neuroprotective features through inhibition of cholinesterase and protection of the human dopaminergic cell line SH-SY5Y from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Industrial Crops and Products*, 45, pp.114-120.
- [34] Dai, J., Mumper, R. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 15, pp. 7313-7352
- [35] He, X., Liu, R. (2008). Phytochemicals of apples peels: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidante activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp.9905-9910.
- [36] Pichichero, E., Cicconi, R., Mattei, M., Muzi, M., Canini, A. (2010). Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. *International Journal of Oncology*, 37, pp.973-981.
- [37] Vermerris, W., Nicholson, R. (2008). Phenolic Compound Biochemistry. *Springer*. pp. 1-24
- [38] Seigler, D. (1998). Plant Secondary Metabolism. *Springer Science + Business Media, Lcc*, 1, pp.3 e 193
- [39] Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 135, pp.1708-1717.
- [40] CIESLA, M. (2002) Non-wood forest products from temperate broad-leaved trees: Non-wood Forest Products 15, *Food and Agriculture Organization of United Nations*, Rome.

- [41] Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 135, pp. 1708-1717.
- [42] Okuda, T., Ito, H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants – Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*. 16, pp. 2191-2217.
- [43] Crozier, A., Clifford, M., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites. *Blackwell Publishing*, 1, pp.11-12.
- [44] Bacelo, H., Santos, S., Botelho, C. (2016). Tannin-based biosorbents for environmental applicatins- A review. *Chemical Engineering Journal*, 303, pp. 575-587.
- [45] Wang, J., Dong, W. (2018). Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia. *Gene*, 678, pp.177-183.
- [46] Møller, P., Folkmann, J., Forchhammer, L., Bräuner, E., Danielsen, P., Risom, L., Loft, S. (2008). Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Letters*, 266, pp.84-97.
- [47] oxidativedamange
- [48] Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40, pp.959-975.
- [49] Maritim, A., Sanders, R., Watkins III, J. (2003). Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *Journal Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), pp.24-38.
- [50] Ranjedran, P., Nandaknmar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E., Lakshminarasaiah, U., Gopas, J., Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human disease. *Chinica Chimica Acta*, 436, pp.332-347.
- [51] Fridovich, I. (1999). Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen?. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 893, pp.13-18.
- [52] Ghani, M., Barril, C., Bedgood Jr., D., Prenzler, P. (2017). Measurement of antioxidante activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*, 230, pp. 195-207.
- [53] Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidante properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extration procedure. *Food Chemistry*, 100, pp. 585-589

- [54] Gomes, L. (2016). Estudo do efeito anti tumoral e antioxidante de diferentes fracções recuperadas do efluente da cortiça através do processo de membranas. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
- [55] Henriques, J., Ribeiro, M., Falé, P., Pacheco, R., Ascensão, L., Florêncio, M., Serralheiro, M. (2017). Valorization of kiwifruit production: leaves of the pruning branches of *Actinidia deliciosa* as a promising source of polyphenols. *European Food Research and Technology*, 243(8), pp.1343-1353.
- [56] Carr, A., McCall, M., Frei, B. (2000). Oxidation of LDL by Myeloperoxidase and Reactive Nitrogen Species: Reaction Pathways and Antioxidant Protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20, pp.1716-1723.
- [57] Ferreira, I., Abreu, R. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*. 2, pp.32-39
- [58] Ridnour, L., Thomas, D., Mancardi, D., Espey, M., Miranda, K., Paolocci, N., Feelish, M., Fukuto, J., Wink, D. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *The Journal of Biological Chemistry*, 385, pp.1-10.
- [59] Fukel, T., Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature*, 408, pp.239-247.
- [60] Kamal, Z., Ullah, F., Ayaz, M., Sadiq, A., Ahmad, S., Zeb, A., Hussain, A. (2015). Anticholinesterase and antioxidante investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of *atriplex laciniata* L.: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. *Biological Research*, 48(21), pp.1-11.
- [61] Roy, A., Sil, P. (2012). Tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative damage in mice erythrocytes: Protection by taurine. *Pathophysiology*, 19, pp.137-148.
- [62] Rush, G., Gorki, J., Ripple, M., Sowinski, J., Bulgelski, P., Hewitt, W. (1985). Organic Hydroperoxide- Induced Lipid Peroxidation and Cell Death in Isolated Hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 78, pp.473-483.
- [63] Kanupriya, Prasad, D., Ram, M., Sawhney, R., Ilavazhagan, G., Banerjee, P. (2007). Mechanism of *tert*-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicology in Vitro*, 21, pp.846-854.
- [64] Bhattacharya, S., Gachhui, R., Sil, P. (2011). Hepatoprotective properties of Kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. *Pathophysiology*, 18, pp.221-234.

- [65] Manu T, M., Anand, T., Khanum, F. (2018). Attenuation of cytotoxicity induced by tBHP in H9C2 cells by *Bacopa monniera* and Bacoside A. *Pathophysiology*, 25, pp.143-149.
- [66] Salla, S., Sunkara, R., Ogutu, S., Walker, L.T., Verghese, M. (2015). Antioxidant activity of papaya seed extracts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress in HepG2 cells, *LWT - Food Science and Technology*, pp.1-22.
- [67] Al-Jamal, M., Griffith, J., Lim, H. (2014). Photoprotection in ethnic skin. *Dermatológica sínica*, 32(4), pp. 217-224.
- [68] Nichols, J., Katiyar, S. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 302, pp.71-83.
- [69] Rodrigues, F., Pimentel, F., Oliveira, M. (2015). Olive by-products: challenge application in cosmetic industry. *Industrial Crops and Products*, 70, pp.116-124.
- [70] Heinrich, U., Moore, C., Spirt, S., Tronnier, H., Stahl, W. (2011). Green tea Polyphenols provide photoprotection, increase Microcirculation, and Modulate Skin proprieties of women. *The Journal of Nutrition*, 141, pp.1202-1208.
- [71] OECD (2017). Health at a Glance 2017: OECD Indicators, *OECD Publishing*, Paris.
- [72] Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., Silakari, O. (2017). Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, pp.165-188.
- [73] Minett, T., Bertolucci, P. (2000). Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer. *Revista Neurociências*. 8(1), pp, 11-14.
- [74] Khan, H., Amin, S., Kamal, M., Patel, S. (2018). Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, pp.860-870.
- [75] Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., Zucco, F. (1990). Chap.7: Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. Short-term Toxicity for Non-genotoxic Effects. *SCOPE*. Chichester:Wiley.
- [76] Miret, S., Groene, E., Klaffke, W. (2006). Comparison of in vitro assays of celular toxicity in the human hepatic cell line Hep-g2. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(2), pp.184-193.
- [77] ATCC (2018). Acedido em 22 de agosto de 2018, em <https://www.lgcstandards-atcc.org/>

- [78] Benítez, F. J., Acero, J. L., Leal, A. I. (2006). Application of microfiltration and ultrafiltration processes to cork processing wastewaters and assessment of the membrane fouling. *Separation and Purification Technology*, 50, pp. 354-364.
- [79] Yu, W., Liu, T., Crawshaw, J., Liu, T., Graham, N. (2018). Ultrafiltration and nanofiltration membrane fouling by natural organic matter: Mechanisms and mitigation by pre-ozonation and pH. *Water Research*. 139, pp. 353-362.
- [80] Porter, M. C. (2005). Handbook of industrial membrane technology. *Noyes Publications*.
- [81] Mulder, M. (1992). Basic Principles of Membrane Technology. *Springer*.
- [82] Baker, R. W. (2012). Membrane Technology and Applications. 3ª edição. *Wiley*
- [83] Cui, Z. F., Muralidhara, H. S. (2010). Membrane Technology. 1ª edição. *Elsevier Ltd*. Burlington.
- [84] Khulbe, K. C., Feng, C. Y., Matsuura, T. (2008). Synthetic Polymeric Membranes. *Springer*.
- [85] Radcliff, R., Zarnadze, A. (2004). Application of Membrane Technology to the production of drinking water. *Water Conditioning Purification*, pp. 23-25.
- [86] Munir, A. (2006). Dead End Membrane Filtration. Laboratory Feasibility Studies in Environmental Engineering. *Spring*.
- [87] 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.
- [88] Bernardo, M., Santos, A., Cantinho, P., Minhalma, M. (2011). Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: A biodegradation and valorisation study, *Water Research*, 45, pp. 904-912.
- [89] Huang, D., Ou, B., Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp.1841-1856.
- [90] Nascimento, J., Lage, L., Camargos, R., Amaral, J., Sousa, A., Oliveira, F. (2011). Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Farmácia*. 92(4), pp. 327-332.
- [91] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidante activity. Songklanakarin. *Journal of Science and Technology*, 26, pp.211-219.

- [92] 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.
- [93] Winterbourn, C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82/83, pp. 969-974.
- [94] Wink, D., Mitchell, J. (1998). Chemical Biology of nitric oxid: insights into regulatory cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 25, pp.434-456.
- [95] Tsikas, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide área of research. *Journal of Chromatography B*, 851, pp. 51-70.
- [96] Araújo, C. R. M., Santos, V. L., Gonsalves, A. A. (2016). Acetilcolinesterase- AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Revista Virtual de Química*, 8(6), pp. 1818-1834.
- [97] Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, pp. 88-95.
- [98] Grela, E., Kozłowska, J., Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria- A review. *Acta Histochemica*, 120, pp.303-311.
- [99] Bezerra, M., Santelli, R., Oliveira, E., Villar, L., Escaleira, L. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, pp.965-977.
- [100] Lorenzen, T., Anderson, V. (1993). Design Of Experiments: A No-Name Approach. *Marcel Dekker, Inc.* pp. 1-16.
- [101] Subra, P., Jestin, P. (2000). Screening Design of Experiment (DOE) Applied to Supercritical Antisolvent Process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39, pp. 4178-4184.
- [102] Reddy, T. (2011). Applied Data Analysis and Modeling for Energy Engineers and Scientist. *Springer*, New York Dordrecht Heidelberg London, pp.201-202.
- [103] Sadhukhan, B., Mondal, N., Chattoraj, S. (2016). Optimisation using composite design (ccd) and the desirability function for sorption of methylene blue from aqueous solution and lenina major. *Karbala International Journal of Modern Science*, 2, pp.145-155.

- [104] Asghar, A., Raman, A., Dand, W. (2014). A Comparasion of Central Composite Design and Tagnchi Method for Optimizing Fenton Process. *The Scientific World Journal*, 2014, pp.1-14.
- [105] Jordão, M. (2016). Análise de Fitoquímicos em *Geranium Robertianum* L. Tese de mestrado. Universidade de Coimbra.
- [106] Soares, S. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, pp.71-81.
- [107] Adebisi, O., Olayemi, F., Ning-Hua, T., Guang-Zhi, Z. (2017). In vitro antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contest of etanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6, pp.10-14.
- [108] 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, pp.569-573.
- [109] Sarwar, R., Farooq, U., Khan, A., Naz, S., Khan, S., Khan, A., Rauf, A., Bahadar, H., Uddin, R. (2015). Evaluation of antioxidante, free radical scavenging, and antimicrobial activity of *Quercus incana* roxb. *Frontiers in Pharmacology*, 6(277), pp.1-7.
- [110] Vinutha, B., Prashnth, D., Salma, K., Sreeja, S., Pratiti, D., Padmaja, R., Radhika, S., Amit, A., Venkateshwarlu, K., Deepak, M. (2007). Screening of selected indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, pp.359-363.
- [111] Orhan, I., Kartal, M., Tosun, F., Sener, B. (2007). Screening of various phenolic acids and flavonoid derivaties for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforschung C.*, pp.829-832.
- [112] Nag, G., De, B. (2011). Acetylcholinesterase inhibitory activity of terminalia chebula, terminalia belleriga and emblica officinalis and some phenolic compounds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), pp.121-124.
- [113] Szwajgier, D. (2013). Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivates. *Zeitschrift für Naturforschung C.*, 68, pp.125-132.
- [114] Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparation of antioxidante capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103, pp.839-846

- [115] Araújo, A., Pereira, D., Aroso, I., Santos, T., Batista, M., Cerqueira, M., Marques, A., Reis, R., Pires, R. (2015). Cork extracts reduce UV-mediated DNA fragmentation and cell death. *RSC Advances*, 5, pp. 96151-96157
- [116] Mahassni, S., Al-Reemi, R. (2013). Apoptosis and necrosis of human breast cancer cells by an aqueous extract of garden cress (*Lepidium sativum*) seeds. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20, pp.131-139.
- [117] Porameesanaporn, Y., Uthaisang-Tanechpongamb, W., Jarintanan, F., Jongrungruangchok, S., Wongsatayanon, B. (2013). Terrein induces apoptosis in HeLa human cervical carcinoma cells through p53 and ERK regulation. *Oncology Reports*, 29, pp. 1600-1608.
- [118] Wang, S., Tian, Q., An, F. (2016). Growth inhibition and apoptotic effects of total flavonoids from *Trollius chinensis* on human breast cancer MCF-7 cells. *Oncology Letters*, 12, pp. 1705-1710.

## 7. Anexos

### 7.1. Caracterização das Membranas

#### 7.1.1. Rejeição a Sais Monovalentes e Bivalentes

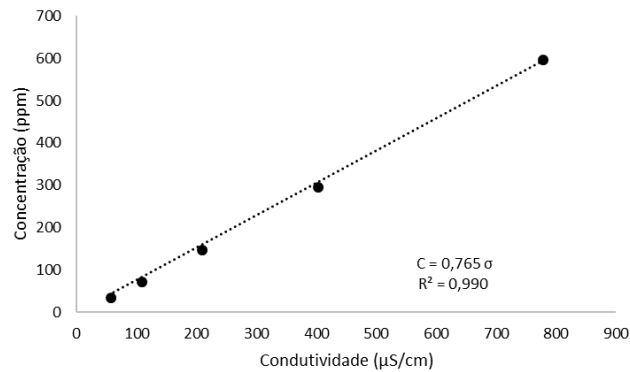


Figura 7.1 - Reta de calibração do sal Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

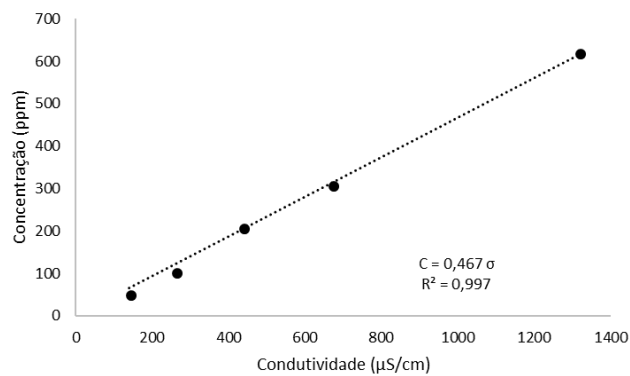


Figura 7.2 - Reta de calibração do sal NaCl.

#### 7.1.2. Rejeição se Solutos Orgânicos

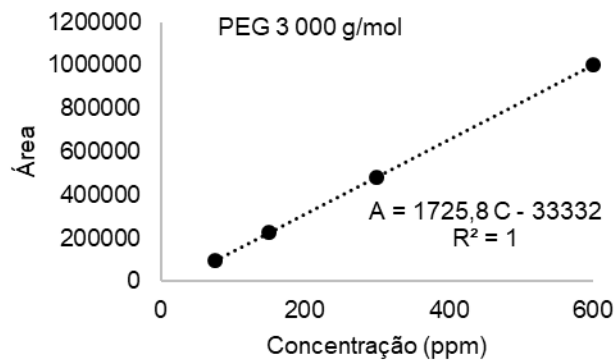


Figura 7.3 – Representação da área em função da concentração do PEG 3 000 g/mol.

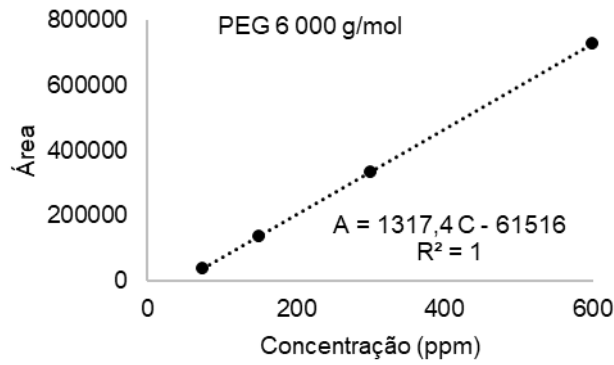


Figura 7.4 - Representação da área em função da concentração do PEG 6 000 g/mol.

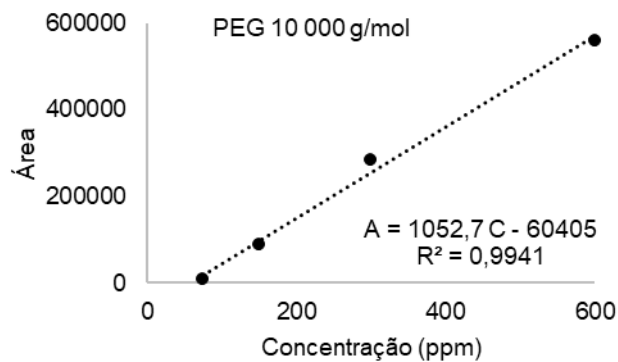


Figura 7.5 - Representação da área em função da concentração do PEG 10 000 g/mol.

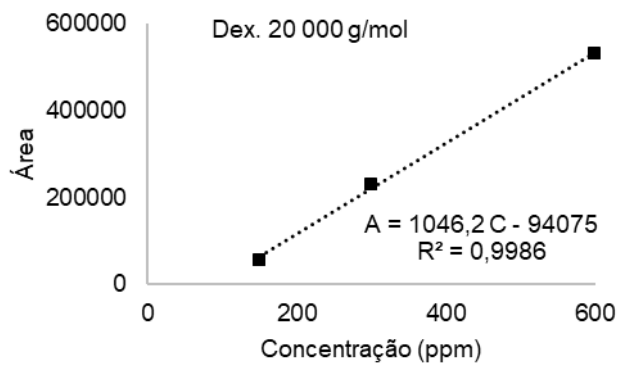


Figura 7.6 - Representação da área em função da concentração do PEG 20 000 g/mol.

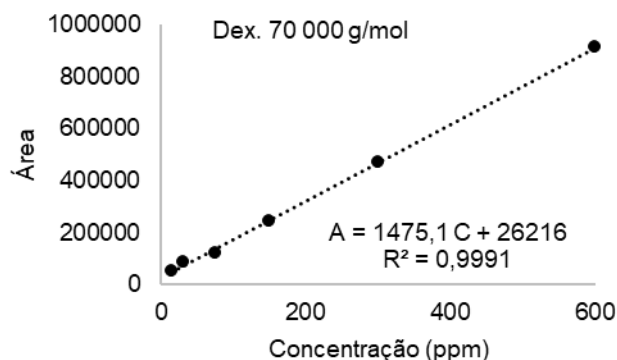


Figura 7.7 - Representação da área em função da concentração do PEG 70 000 g/mol.

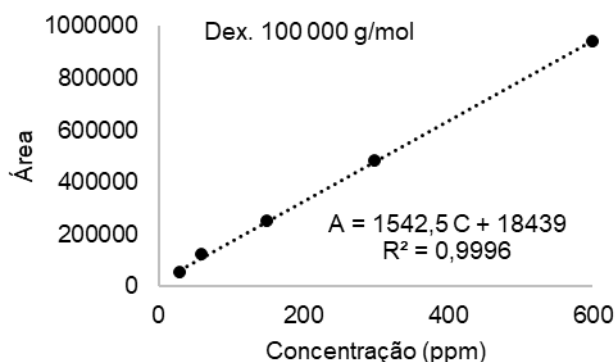


Figura 7.8 - Representação da área em função da concentração do PEG 100 000 g/mol.

Tabela 7.1 - Áreas dos picos obtidos através do HPLC-IR e concentração obtida com a comparação com padrões, para a membrana  $C_{A36,5}$ .

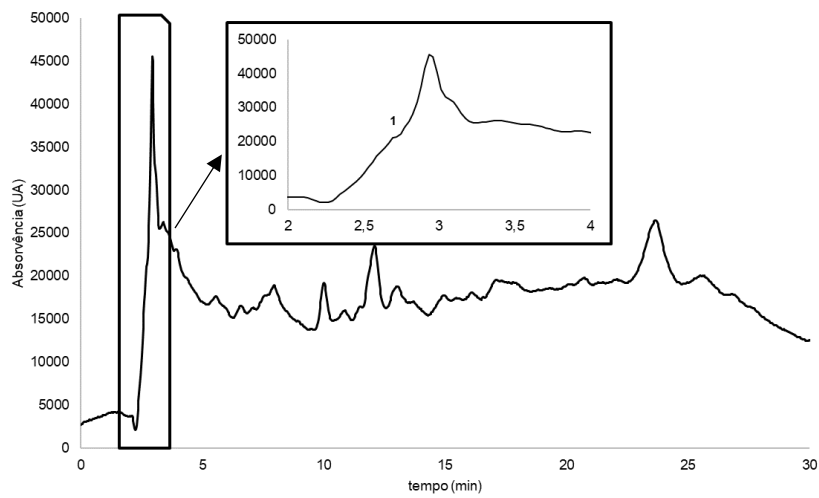
| $C_{A36,5}$ |              | Dextran<br>20 000<br>g/mol | Dextran<br>70 000<br>g/mol | Dextran<br>100 000 g/mol |
|-------------|--------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Permeado    | Área do pico | 146540                     | 68226                      | 43393                    |
|             | COT (ppm)    | 229,99                     | 28,48                      | 11,64                    |
| Alimentação | Área do pico | 456325                     | 740862                     | 679727                   |
|             | COT (ppm)    | 526,09                     | 484,47                     | 443,03                   |

Tabela 7.2 - Áreas dos picos obtidos através do HPLC-IR e concentração obtida com a comparação com padrões, para a membrana  $C_{A28}$ .

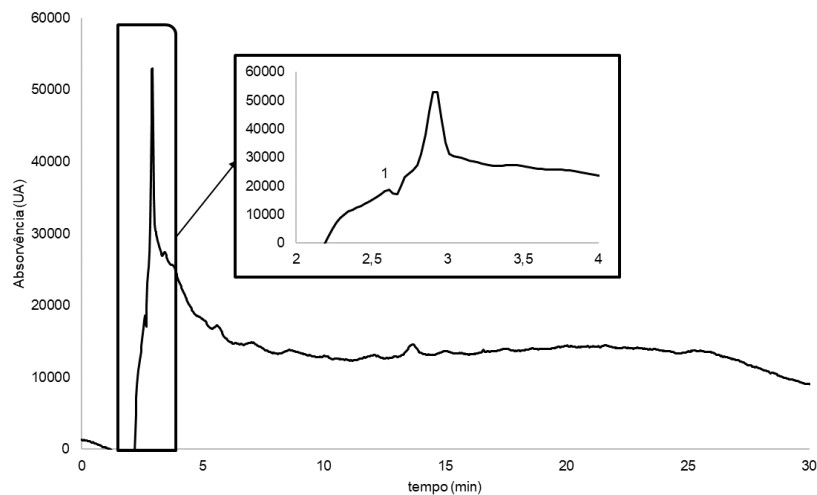
| $C_{A28}$   |              | Dextran<br>3 000 g/mol | Dextran<br>6 000 g/mol | Dextran<br>10 000 g/mol |
|-------------|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Permeado    | Área do pico | 198941                 | 24639                  | 264                     |
|             | COT (ppm)    | 134,59                 | 65,40                  | 57,63                   |
| Alimentação | Área do pico | 655727                 | 590031                 | 573983                  |
|             | COT (ppm)    | 399,27                 | 494,57                 | 602,61                  |

## 7.2. Caracterização do Efluente e das Frações

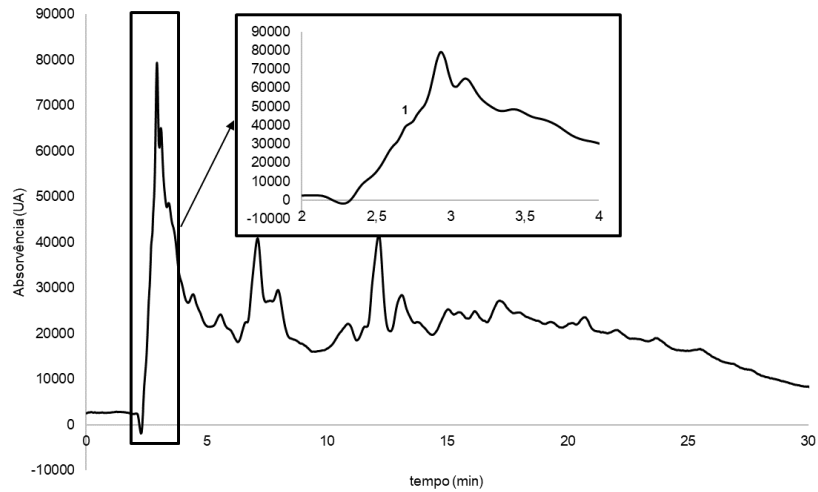
### 7.2.1. Cromatografia Líquida de Elevada Resolução (HPLC-DAD)



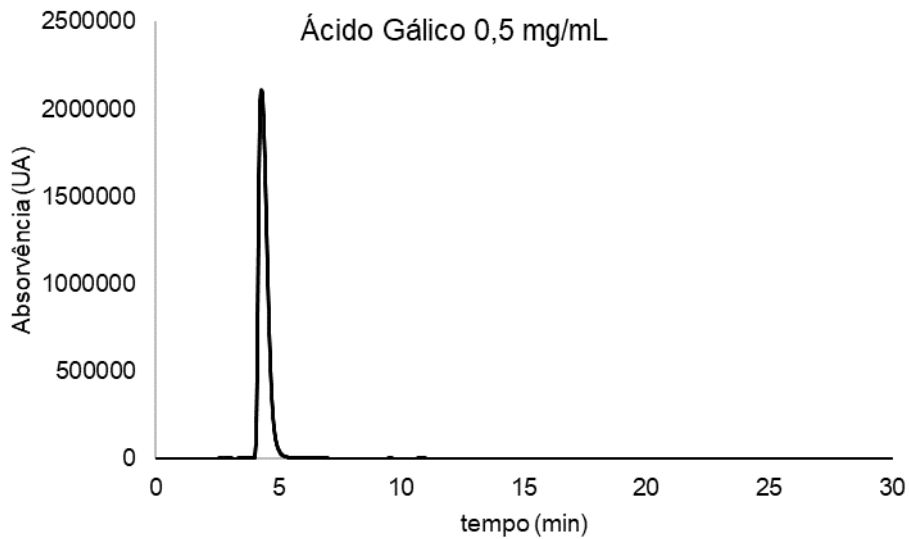
**Figura 7.9** – Cromatograma do efluente, corrida em HPLC-DAD durante 1 hora, com ampliação no pico correspondente ao ácido quinico.



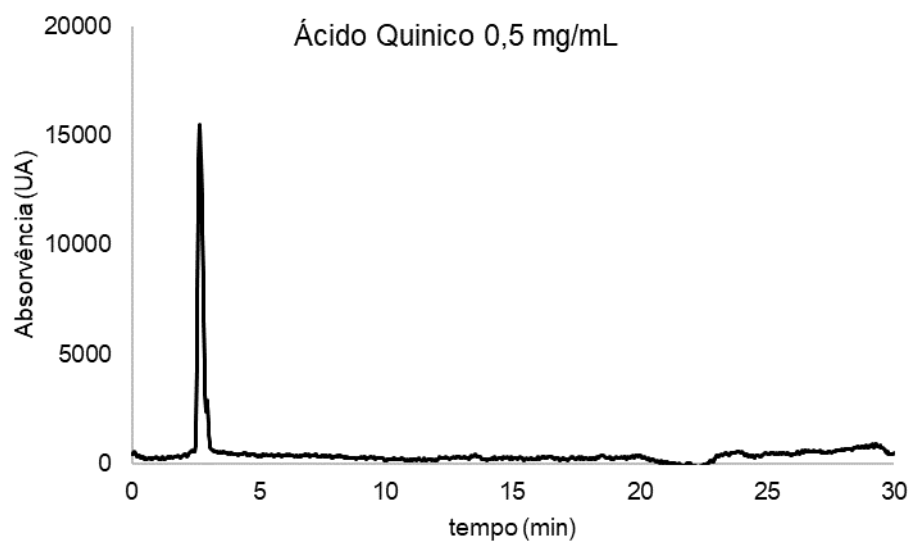
**Figura 7.10** - Cromatograma da fração média, corrida em HPLC-DAD durante 1 hora, com ampliação no pico correspondente ao ácido quinico.



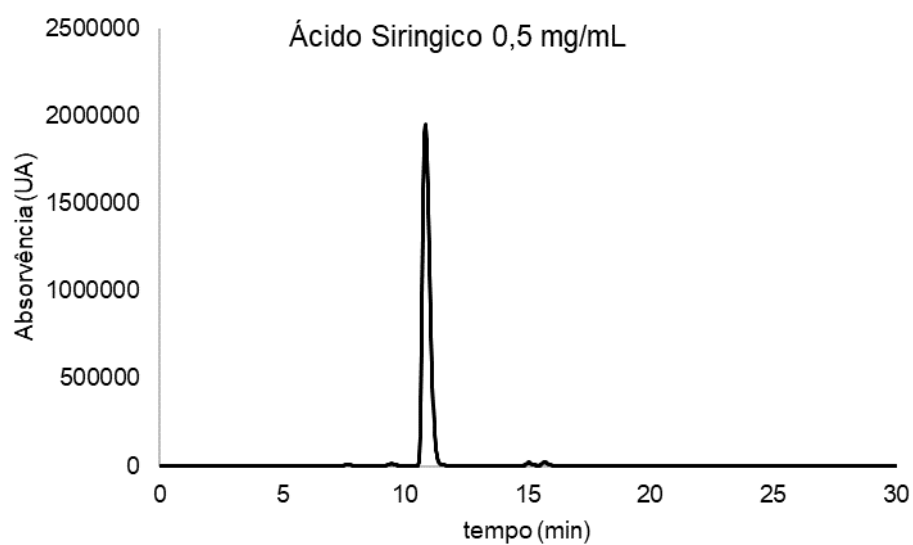
**Figura 7.11** - Cromatograma da fração média e das frações com uma concentração de 1 mg/mL, HPLC-DAD 1 hora.



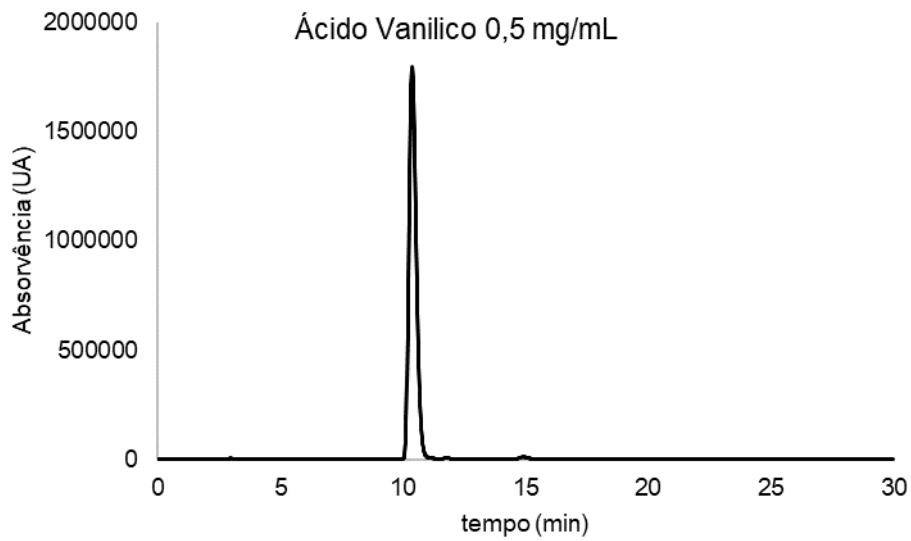
**Figura 7.12** - Cromatograma do ácido gálico 0,5 mg/mL.



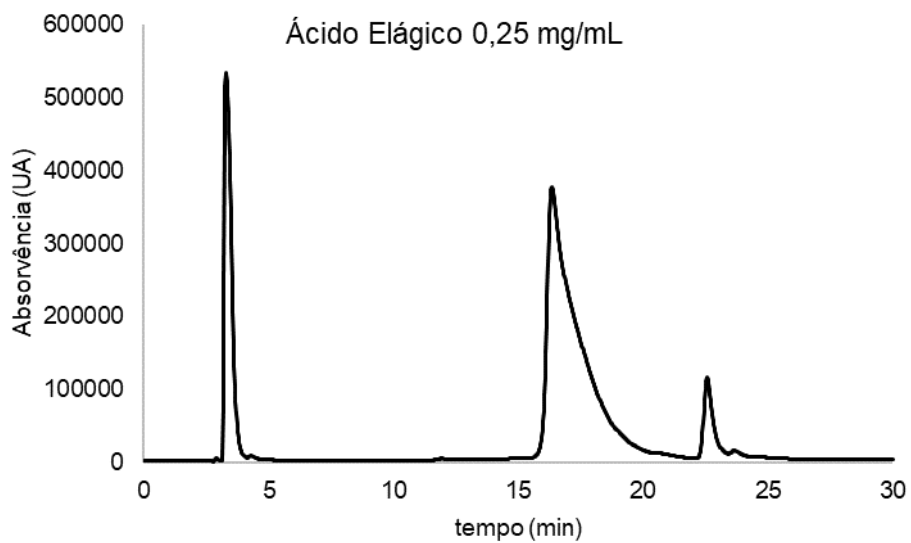
**Figura 7.13** - Cromatograma do ácido quínico 0,5 mg/mL.



**Figura 7.14** - Cromatograma do ácido siringico 0,5 mg/mL.



**Figura 7.15** - Cromatograma do ácido vanílico 0,5 mg/mL.



**Figura 7.16** - Cromatograma do ácido elágico 0,25 mg/mL.

### 7.2.2. Quantificação de Fenóis totais e Taninos

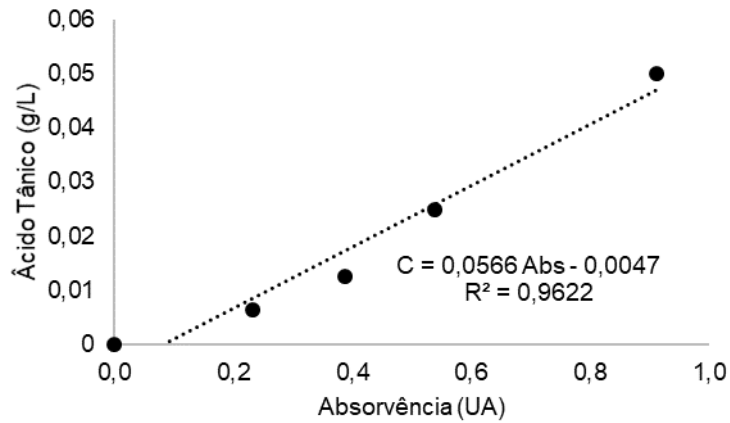


Figura 7.17 – Curva de calibração para a quantificação de fenóis totais e taninos, utilizando o ácido tânico como padrão.

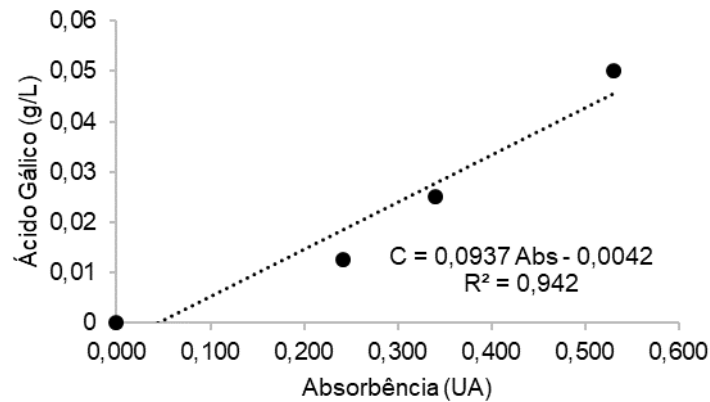


Figura 7.18 - Curva de calibração para a quantificação de fenóis totais e taninos, utilizando ácido gálico como padrão.

### 7.2.3. Método da Redução do Radical DPPH

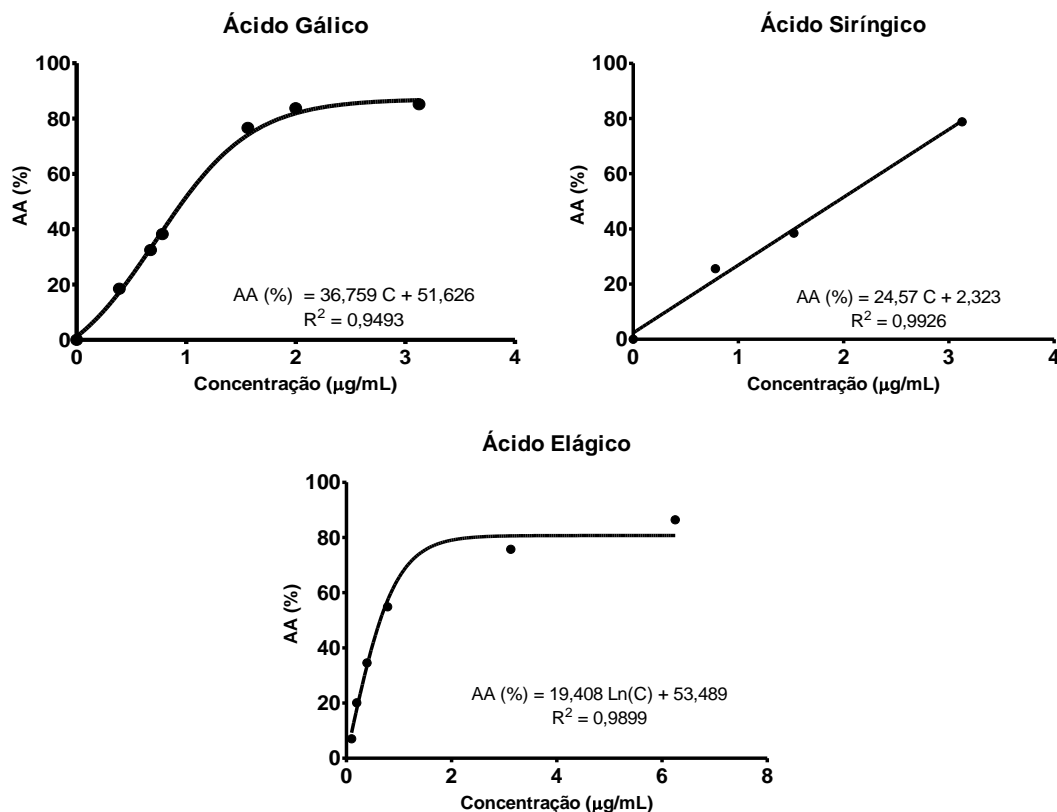


Figura 7.19 - Atividade Antioxidante (AA %) em função da concentração dos padrões (µg/mL).

Tabela 7.3 - Valores obtidos da atividade antioxidante (AA %), para as amostras sem mucilagens e mucilagens.

| Amostra       | Concentração (µg/mL) | AA (%)<br>c/ mucilagens | AA (%)<br>s/ mucilagens | AA (%)<br>mucilagens |
|---------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| Efluente      | 32,50                | 45,96                   | 37,41                   | 29,74                |
| Fração Pesada | 27,50                | 55,45                   | 67,79                   | 31,83                |
| Fração Média  | 32,50                | 48,88                   | 43,25                   | 16,80                |
| Fração Leve   | 75,00                | 29,34                   | 29,34                   | NQ                   |
| Fração Leve   | 25,00                | 16,194                  | NQ                      | 29,74                |

### 7.2.4. Inibição da Peroxidação Lipídica

Tabela 7.4 - Percentagem da inibição da peroxidação lipídica das amostras com concentração.

| Amostra                   | Inibição da Peroxidação Lipídica (%) |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Efluente (0.5 mg/mL)      | 21,37 ± 1,16                         |
| Fração Pesada (0.5 mg/mL) | 11,43 ± 1,46                         |
| Fração Média (0.5 mg/mL)  | 7,00 ± 1,71                          |
| Fração Leve (0.5 mg/mL)   | 5,66 ± 0,72                          |

### 7.2.5. Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

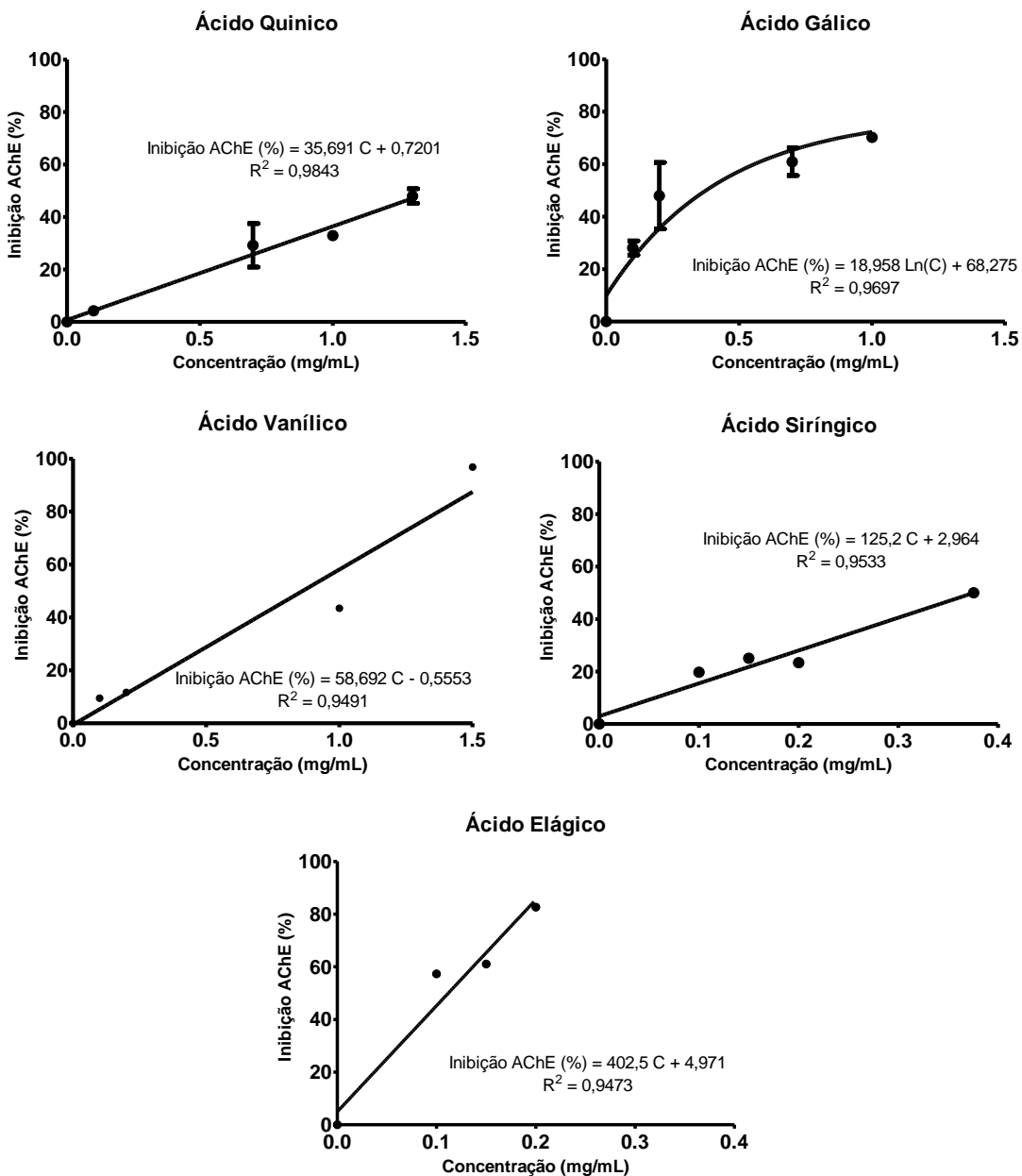


Figura 7.20 - Inibição da AChE (%) em função da concentração dos padrões (µg/mL).

**Tabela 7.5** - Valores obtidos da inibição da AChE (%), para as amostras sem mucilagens e mucilagens.

| <b>Amostra</b>       | <b>Concentração (mg/mL)</b> | <b>Inibição AChE (%) s/ mucilagens</b> | <b>Inibição AChE (%) s/ mucilagens</b> | <b>Inibição AChE (%) mucilagens</b> |
|----------------------|-----------------------------|--|--|-------------------------------------|
| <b>Efluente</b>      | 0,56                        | 50,00                                  | 76,41 ± 0,76                           | 74,86                               |
| <b>Fração Pesada</b> | 0,34                        | 50,00                                  | 36,57 ± 2,07                           | 57,82                               |
| <b>Fração Média</b>  | 0,62                        | 50,00                                  | 73,57 ± 1,60                           | 43,08                               |
| <b>Fração Leve</b>   | 0,50                        | 29,81                                  | 40,40 ± 1,55                           | 32,06                               |

### 7.3. Potencial Protetor

**Tabela 7.6** – Matriz padrão do design experimental, com 3 fatores e 5 níveis.

|           | <b>Fator 1</b> | <b>Fator 2</b> | <b>Fator 3</b> |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| <b>1</b>  | - 1            | - 1            | - 1            |
| <b>2</b>  | + 1            | - 1            | - 1            |
| <b>3</b>  | - 1            | - 1            | + 1            |
| <b>5</b>  | + 1            | - 1            | + 1            |
| <b>6</b>  | - 1            | + 1            | - 1            |
| <b>7</b>  | + 1            | + 1            | - 1            |
| <b>8</b>  | - 1            | + 1            | + 1            |
| <b>9</b>  | + 1            | + 1            | + 1            |
| <b>10</b> | - 2            | 0              | 0              |
| <b>11</b> | + 2            | 0              | 0              |
| <b>12</b> | 0              | - 2            | 0              |
| <b>13</b> | 0              | + 2            | 0              |
| <b>14</b> | 0              | 0              | - 2            |
| <b>15</b> | 0              | 0              | + 2            |
| <b>16</b> | 0              | 0              | 0              |
| <b>17</b> | 0              | 0              | 0              |
| <b>18</b> | 0              | 0              | 0              |

**Tabela 7.7** – Matriz padrão do design experimental, com 2 fatores e 5 níveis.

|           | <b>Fator 1</b> | <b>Fator 2</b> |
|-----------|----------------|----------------|
| <b>1</b>  | - 1            | - 1            |
| <b>2</b>  | - 1            | + 1            |
| <b>3</b>  | + 1            | + 1            |
| <b>4</b>  | + 1            | - 1            |
| <b>5</b>  | - 2            | 0              |
| <b>6</b>  | + 2            | 0              |
| <b>7</b>  | 0              | - 2            |
| <b>8</b>  | 0              | + 2            |
| <b>9</b>  | 0              | 0              |
| <b>10</b> | 0              | 0              |
| <b>11</b> | 0              | 0              |
| <b>12</b> | 0              | 0              |
| <b>13</b> | 0              | 0              |

### 7.3.1. TBHP

**Tabela 7.8** – Tabela de comparação da citotoxicidade induzida pelo TBHP em linhas celulares A375, controlo e quando incubadas inicialmente em fração pesada 1 mg/mL. Durante 3 e 6 horas.

| <b>TBHP (<math>\mu\text{M}</math>)</b> | <b>Controlo 3h</b> | <b>Fração Pesada (1mg/mL) 3h</b> | <b>Controlo 6h</b> | <b>Fração Pesada (1 mg/mL) 6h</b> |
|--|--------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| <b>50</b>                              | 41,94 $\pm$ 0,24   | 23,22 $\pm$ 0,69                 | 34,61 $\pm$ 2,01   | 10,83 $\pm$ 2,50                  |
| <b>100</b>                             | 60,52 $\pm$ 1,62   | 26,10 $\pm$ 2,28                 | 75,95 $\pm$ 7,70   | 17,15 $\pm$ 2,93                  |
| <b>150</b>                             | 71,49 $\pm$ 0,00   | 27,69 $\pm$ 1,30                 | 94,55 $\pm$ 0,89   | 23,04 $\pm$ 1,66                  |
| <b>200</b>                             | 69,07 $\pm$ 6,20   | 32,45 $\pm$ 1,73                 | 98,00 $\pm$ 0,50   | 28,17 $\pm$ 2,46                  |

**Tabela 7.9** - Matriz do design experimental e valores de citotoxicidade obtidos, para os ensaios com TBHP, de modo a obter as curvas de resposta.

|           | <b>TBHP (<math>\mu\text{M}</math>)</b> | <b>Fração Pesada (mg/mL)</b> | <b>Tempo de incubação (min)</b> | <b>Citotoxicidade (%)</b> |
|-----------|--|------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| <b>1</b>  | 50                                     | 0,25                         | 45                              | <b>15,30</b>              |
| <b>2</b>  | 150                                    | 0,25                         | 45                              | <b>14,88</b>              |
| <b>3</b>  | 50                                     | 0,25                         | 135                             | <b>22,74</b>              |
| <b>4</b>  | 150                                    | 0,25                         | 135                             | <b>27,54</b>              |
| <b>5</b>  | 50                                     | 0,75                         | 45                              | <b>19,77</b>              |
| <b>6</b>  | 150                                    | 0,75                         | 45                              | <b>21,68</b>              |
| <b>7</b>  | 50                                     | 0,75                         | 135                             | <b>23,53</b>              |
| <b>8</b>  | 150                                    | 0,75                         | 135                             | <b>30,63</b>              |
| <b>9</b>  | 0                                      | 0,50                         | 90                              | <b>17,20</b>              |
| <b>10</b> | 200                                    | 0,50                         | 90                              | <b>14,93</b>              |
| <b>11</b> | 100                                    | 0                            | 90                              | <b>50,00</b>              |
| <b>12</b> | 100                                    | 1                            | 90                              | <b>23,50</b>              |
| <b>13</b> | 100                                    | 0,50                         | 0                               | <b>30,70</b>              |
| <b>14</b> | 100                                    | 0,50                         | 180                             | <b>4,11</b>               |
| <b>15</b> | 100                                    | 0,50                         | 90                              | <b>23,87</b>              |
| <b>16</b> | 100                                    | 0,50                         | 90                              | <b>19,09</b>              |
| <b>17</b> | 100                                    | 0,50                         | 90                              | <b>20,56</b>              |

### 7.3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Tabela 7.10** - Tabela de comparação da citotoxicidade induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em linhas celulares A375, controlo e quando incubadas inicialmente em fração pesada 1 mg/mL. Durante 3 e 6 horas.

| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM) | Controlo 3h  | Fração Pesada (1mg/mL) 3h | Controlo 6h  | Fração Pesada (1 mg/mL) 6h |
|------------------------------------|--------------|---------------------------|--------------|----------------------------|
| <b>50</b>                          | 2,69 ± 0,86  | 21,12 ± 1,12              | 21,44 ± 6,50 | 11,63 ± 2,47               |
| <b>100</b>                         | 14,80 ± 1,56 | 22,79 ± 2,79              | 28,80 ± 2,96 | 11,46 ± 2,16               |
| <b>150</b>                         | 43,61 ± 3,66 | 18,88 ± 2,48              | 32,06 ± 1,51 | 12,66 ± 2,33               |
| <b>200</b>                         | 78,40 ± 2,04 | 21,66 ± 2,36              | 59,83 ± 0,84 | 16,13 ± 1,96               |

**Tabela 7.11** - Matriz do design experimental e valores de citotoxicidade obtidos, para os ensaios com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de modo a obter as curvas de resposta.

|           | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM) | Fração Pesada (mg/mL) | Tempo de incubação (min) | Citotoxicidade (%) |
|-----------|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| <b>1</b>  | 50                                 | 0,25                  | 60                       | <b>21,55</b>       |
| <b>2</b>  | 150                                | 0,25                  | 60                       | <b>33,91</b>       |
| <b>3</b>  | 50                                 | 0,25                  | 180                      | <b>35,75</b>       |
| <b>4</b>  | 150                                | 0,25                  | 180                      | <b>32,21</b>       |
| <b>5</b>  | 50                                 | 0,75                  | 60                       | <b>38,10</b>       |
| <b>6</b>  | 150                                | 0,75                  | 60                       | <b>26,86</b>       |
| <b>7</b>  | 50                                 | 0,75                  | 180                      | <b>32,73</b>       |
| <b>8</b>  | 150                                | 0,75                  | 180                      | <b>14,64</b>       |
| <b>9</b>  | 0                                  | 0,50                  | 120                      | <b>16,59</b>       |
| <b>10</b> | 200                                | 0,50                  | 120                      | <b>44,53</b>       |
| <b>11</b> | 100                                | 0                     | 120                      | <b>25,00</b>       |
| <b>12</b> | 100                                | 1                     | 120                      | <b>30,53</b>       |
| <b>13</b> | 100                                | 0,50                  | 0                        | <b>26,17</b>       |
| <b>14</b> | 100                                | 0,50                  | 240                      | <b>41,59</b>       |
| <b>15</b> | 100                                | 0,50                  | 120                      | <b>33,92</b>       |
| <b>16</b> | 100                                | 0,50                  | 120                      | <b>32,57</b>       |
| <b>17</b> | 100                                | 0,50                  | 120                      | <b>39,01</b>       |

### 7.3.3. Radiação UV

**Tabela 7.12** - Matriz do design experimental e valores de citotoxicidade obtidos, para os ensaios com a radiação UV, de modo a obter a curva de resposta.

|           | <b>Fração Pesada<br/>(mg/mL)</b> | <b>Tempo de<br/>exposição (min)</b> | <b>Citotoxicidade<br/>(%)</b> |
|-----------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| <b>1</b>  | 0,25                             | 60                                  | <b>46,34</b>                  |
| <b>2</b>  | 0,75                             | 60                                  | <b>63,41</b>                  |
| <b>3</b>  | 0,25                             | 180                                 | <b>39,72</b>                  |
| <b>4</b>  | 0,75                             | 180                                 | <b>52,34</b>                  |
| <b>5</b>  | 0                                | 120                                 | <b>11,25</b>                  |
| <b>6</b>  | 1                                | 120                                 | <b>59,01</b>                  |
| <b>7</b>  | 0,5                              | 0                                   | <b>43,74</b>                  |
| <b>8</b>  | 0,5                              | 240                                 | <b>10,93</b>                  |
| <b>9</b>  | 0,5                              | 120                                 | <b>39,4</b>                   |
| <b>10</b> | 0,5                              | 120                                 | <b>45,98</b>                  |
| <b>11</b> | 0,5                              | 120                                 | <b>39,13</b>                  |
| <b>12</b> | 0,5                              | 120                                 | <b>41,5</b>                   |
| <b>13</b> | 0,5                              | 120                                 | <b>40,22</b>                  |