



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Avaliação de Processos de Redução/Eliminação  
de TCA em Amostras de Cortiça**

**Linda Maria Nobre Gonçalves**

Orientador: Prof. Doutor António Manuel  
Deométrio R.L. Pereira

Co-orientador: Doutor José Pedro Fernandes

**Mestrado em Química**

Área de especialização: *Química Orgânica*

Dissertação

Évora, 2014



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Avaliação de Processos de Redução/Eliminação  
de TCA em Amostras de Cortiça**

**Linda Maria Nobre Gonçalves**

Orientador: Prof. Doutor António Manuel  
Deométrio R.L. Pereira

Co-orientador: Doutor José Pedro Fernandes



**Mestrado em Química**

Área de especialização: *Química Orgânica*

Dissertação

Évora, 2014



*“Não sei que têm o chaparro  
Que lh’amargam as boletas,  
Não sei que tens, meu amor,  
Que só me fazes «desfêtas»”*

*Cultura popular*

# Agradecimentos

Ao Professor Doutor António Manuel Pereira, por ter aceitado orientar-me nesta dissertação de mestrado, pelos conhecimentos que me transmitiu, mas sobretudo pela paciência, prontidão e dedicação que me prestou durante todo o trabalho.

Ao Doutor José Pedro Fernandes, que para além de coorientar esta dissertação, tem sido o pilar da minha aprendizagem no sector corticeiro.

À empresa Amorim, por possibilitar a realização do trabalho experimental.

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional. À minha enorme família, que são a minha base.

Aos meus amigos, que umas vezes ajudaram e outras atrapalharam a escrita desta dissertação, mas que sempre me ajudam a manter motivada!

Aos meus colegas da Amorim Florestal – Salteiros, que com o seu humor e boa disposição fazem com que todos os dias pareçam melhores.

E porque não, agradecer a mim própria, por sempre encontrar vontade de enfrentar novos desafios.

A todos, um sincero Obrigada!

Linda Gonçalves

# Índice

Resumo.....	7
Abstract .....	8
Índice de tabelas.....	9
Índice de figuras.....	10
Abreviaturas .....	12
CAPÍTULO I.....	14
Introdução Teórica .....	14
I.1. Enquadramento geral .....	15
I.2. A Cortiça.....	16
I.2.1. Sobreiro e o Montado.....	16
I.2.2. Da árvore à rolha.....	17
I.2.3. Tecido Suberoso .....	19
I.2.4. Aplicações.....	20
I.2.5. Composição Química.....	21
I.2.6. Defeitos Naturais .....	23
I.2.7. Compostos Contaminantes.....	25
I.3. Estado de arte.....	30
I.4. Adsorventes e solventes .....	33
I.4.1 Adsorventes .....	33
I.4.2 Solventes.....	34
CAPÍTULO II .....	36
Discussão de resultados.....	36
II.1. Apresentação e discussão de resultados .....	37
II.1.1. Extracção Simples .....	37
II.1.2. Extracção em Soxhlet.....	47
II.1.3. Sistemas com Carvão Activado.....	56
II.1.4. Isolamento de metabolitos secundários .....	59
CAPÍTULO III .....	63
Parte Experimental .....	63
III.1. Aparilhagem e Condições Experimentais.....	64
III.1.1 Materiais.....	64

III.1.2 Equipamentos .....	64
III.1.4 Amostras de cortiça .....	65
III.1.5 Condições experimentais.....	66
III.2. Procedimento Experimental .....	68
III.2.1. Extração Simples .....	68
III.2.2. Extração em Soxhlet.....	70
III.2.3. Sistemas de extração em soxhlet na presença de carvão activado.....	71
IV. Conclusões .....	72
V. Perspectivas Futuras .....	73
VI. Referências Bibliográficas .....	74

# Avaliação de processos de Redução/Eliminação de TCA em Amostras de Cortiça

## Resumo

O principal objectivo deste trabalho consistiu na avaliação de processos de redução/eliminação de TCA em amostras de cortiça, nomeadamente rolhas e discos.

Os processos de redução/eliminação de TCA em amostras de cortiça foram avaliados com recurso a sistemas de extracção simples e exaustiva sólido-líquido (Soxhlet), em diferentes condições experimentais (sistema extractor de H<sub>2</sub>O/EtOH (88:12 e 80:20)), com e sem substituição de solvente, presença e ausência de adsorvente.

O aumento da percentagem de etanol no sistema extractor revelou-se de extrema importância, pois além de permitir a extracção eficaz de TCA das amostras, pressupõe que após o tratamento as rolhas e os discos não libertem TCA quando colocados em contacto com soluções de menores concentrações alcoólicas (e.g. vinhos, espumantes).

O carvão activado revelou uma enorme capacidade adsorvente para o TCA o que potencia futuras aplicações deste adsorvente associado a sistemas extractivos.

**Palavras-Chave:** Cortiça, 2,4,6-Tricloroanisol, Extracção Simples, Soxhlet.



# Evaluation of Processes of Reduction/Elimination of TCA in Cork Samples

## Abstract

The main objective of this study was to evaluate processes of reduction / elimination of TCA in cork samples, including stoppers and discs.

The processes of reduction / elimination of TCA in cork samples were evaluated using a solid-liquid simple and exhaustive extraction (Soxhlet) systems under different experimental conditions (extractant system H<sub>2</sub>O / EtOH (88:12 to 80:20), with and without replacing the solvent, presence or absence of adsorbents).

The increase in the percentage of ethanol in the extractor system proved to be extremely important, because besides allowing efficient extraction of TCA, it assumes that cork stoppers and discs samples after treatment, do not release TCA when placed in contact with solutions of lower alcoholic concentrations (e.g. wine, sparkling wine).

The activated carbon adsorbent showed an enormous capacity for TCA trapping which potentiates future applications of this adsorbent in extractive systems.

**Key-words:** Cork, 2,4,6-trichloroanisole, Simple Extraction, Soxhlet.

## Índice de tabelas

Tabela I.1. Limites de percepção sensorial em água, para os halofenóis mais comuns em cortiça. [21] .....	26
Tabela I.2. Limiar de detecção em água para alguns haloanisóis. * Valor em pg/L. [21] .....	27
Tabela I.3. Propriedades Físico-Químicas do 2,4,6-tricloroanisol .....	28
Tabela II.1. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 1 na Extração Simples. 37	
Tabela II.2. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 2 da Extração Simples. A célula a vermelho indica um ponto discrepante. ....	39
Tabela II.3. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 3 da Extração Simples. . 42	
Tabela II.4. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 4 da Extração Simples. . 45	
Tabela II.5. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 1 da Extração Soxhlet. 48	
Tabela II.6. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 2 da Extração Soxhlet. 50	
Tabela II.7. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 3 da Extração Soxhlet... 52	
Tabela II.8. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 4 da Extração Soxhlet... 54	
Tabela II.9. Valores de concentração de TCA (ppt) nas alíquotas recolhidas num sistema de Soxhlet contendo solução hidroalcoólica 12% e carvão activado.....	57
Tabela II.10. Valores de concentração de TCA (ppt) nas alíquotas recolhidas num sistema de Soxhlet contendo solução hidroalcoólica 20% e carvão activado .....	58
Tabela III.1. Reagentes utilizados no trabalho experimental. ....	65
Tabela III.2. Descrição resumida do procedimento para os ensaios de extração simples. ....	68
Tabela III.3. Descrição resumida do procedimento para os ensaios de extração simples. ....	70

# Índice de figuras

Figura I.1. Estrutura do ácido betulínico, triterpeno abundante na cortiça e muito usado em medicina. [14] .....	23
Figura I.2. Representação da ligação entre as moléculas de TCA e a matriz da cortiça [24] .....	29
Figura I.3. Concentração de TCA (ng/L) em função do tempo (horas) das recolhas efectuadas. (adaptado de [31]). .....	32
Figura I.4. Representação esquemática dos principais grupos funcionais presente na superfície de um carvão activado. [36] .....	34
Figura II.1. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 1 da extracção simples.....	38
Figura II.2. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 1 da extracção simples. ....	38
Figura II.3. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 2 da extracção simples.....	40
Figura II.4. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 2 da extracção simples. O valor para os discos intactos às 96 horas é um ponto discrepante.....	40
Figura II.5. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 3 da extracção simples.....	43
Figura II.6. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 3 da extracção simples. ....	43
Figura II.7. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 4 da extracção simples.....	45
Figura II.8. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 4 da extracção simples. ....	46
Figura II.9. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 1 da extracção em Soxhlet.....	48
Figura II.10. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 1 da extracção em Soxhlet.....	49
Figura II.11. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 2 da extracção em Soxhlet.....	50
Figura II.12. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 2 da extracção em Soxhlet.....	51

Figura II.13. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 3 da extracção em Soxhlet.....	53
Figura II.14. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 3 da extracção em Soxhlet.....	53
Figura II.15. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 4 da extracção em Soxhlet.....	55
Figura II.16. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 4 da extracção em Soxhlet.....	55
Figura II.17. Representação gráfica da concentração de TCA (ppt) a cada ciclo de soxhlet com solução hidroalcoólica 12% na presença de carvão activado.....	57
Figura II.18. Representação gráfica da concentração de TCA (ppt) a cada ciclo de soxhlet com solução hidroalcoólica 20% na presença de carvão activado.....	58
Figura II.19. Floculação verificada na solução hidroalcoólica após o primeiro ciclo de soxhlet. ....	60
Figura III.1. Exemplo de discos e rolhas utilizados no trabalho experimental. ....	65

# Abreviaturas

CIPR – Código Internacional das Práticas Rolheiras

CPOMT - Clorofenol-*O*-metiltransferase

<sup>13</sup>C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de carbono

ECD – Detector Captura de Electrões

EtOH- Etanol

GC – Cromatografia Gasosa

<sup>1</sup>H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de protão

ISO - International Organization for Standardization

MIB - Metilisoborneol

ng - Nanogramas

PCA - Pentacloroanisol

PCP - Pentaclorofenol

P.e. – Ponto de ebulição

P.f. – Ponto de fusão

pg. - Picogramas

M.M. – Massa Molecular

ppb – Partes por bilião

ppt – Partes por trilião

SPME – Solid Phase Microextraction

TBA - Tribromoanisol

TBP - Tribromofenol

TCA - Tricloroanisol

TCP - Triclorofenol

TeCA - Tetracloroanisol

TeCP – Tetraclorofenol

## CAPÍTULO I

# Introdução Teórica



## I.1. Enquadramento geral

“Quem se preocupa com os seus netos planta um sobreiro”, diz o povo, que há muito que conta com as riquezas que esta imponente árvore oferece. Seja pelo valor comercial da cortiça, pela variedade de ecossistemas que o montado acolhe ou até mesmo pelo que representa a nível cultural, são razões mais do que suficientes para voltarmos toda a nossa atenção para esta árvore singular.

Em 2011, o sector corticeiro atingiu os 754 milhões de euros em exportações (2% dos bens exportados) e um saldo da balança comercial de 659 milhões de euros, reafirmando a sua posição no suporte da economia portuguesa. [1] A rolha de cortiça é o produto de excelência que faz mover esta indústria, que em 2010 representou 70% do total das exportações, uma soma de 528,9 milhões de euros. Com um valor notável de exportação, seguem-se os materiais de construção, que atingiram os 23,4% das exportações totais (176,3 milhões de euros). [1]

Mediante notável desempenho económico é importante apostar na investigação de forma a elevar ainda mais o valor e qualidade da cortiça, tornando-a cada vez mais num produto competitivo e de características inigualáveis a qualquer outro material. No período entre 2000 e 2009 os projectos de I&D relacionados com o sector da cortiça, foram financiados em 3,7 milhões de euros, pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). [1]

Se nos focássemos nas questões ambientais relacionadas com o montado de sobreiro, esta introdução teórica ficaria demasiado extensa caso se quisessem demonstrar todos os benefícios ambientais desta cultura. Assim, referem-se apenas alguns aspectos como, por exemplo, a sua capacidade de captação e fixação de CO<sub>2</sub>. O desempenho ambiental do montado de sobreiro é ainda mais positivo, quando comparado às espécies usadas nas explorações de madeira, uma vez que a exploração do montado não afecta a sua função de armazenamento de CO<sub>2</sub>, bem como os ecossistemas que dele dependem. [1] Dada a importância dos montados, estes estão protegidos pela lei, facto que remonta a 1310, na carta que El Rei D. Dinis redigiu, «... *que se non faça dano nos soueraes...*». [2]



É minha intensão com este trabalho, contribuir de algum modo, para salvaguardar a riqueza que o montado de sobreiro representa para o nosso país. É apostando na investigação e desenvolvimento que obteremos um produto final cada vez melhor e mais competitivo, tornando inigualável este material já de si tão nobre, que é a cortiça!

## I.2. A Cortiça

### I.2.1. Sobreiro e o Montado

O sobreiro (*Quercus suber L.*) é uma planta dicotiledónea pertencente à família das fagáceas que terá surgido durante a Era Terciária no período do Oligoceno. [2] As plantas desta família possuem folhas simples e alternas, flores unissexuais e fruto seco, que no caso do género *Quercus*, denomina-se lande ou glande. O que diferencia o sobreiro das restantes espécies do género *Quercus* é o facto de produzir cortiça que cobre todo o seu tronco e ramos. [3]

Esta espécie encontra-se difundida numa área de cerca de 2 milhões de hectares, que se estende desde o sudoeste europeu (Portugal e Espanha) pelas zonas de influência mediterrânica do sul da Europa (França e Itália) e norte de África (Marrocos, Argélia e Tunísia). O sobreiro está adaptado aos verões quentes e secos típicos desta região (precipitação 400-800 mm/ano), bem como a solos de baixa fertilidade. Por esta razão o montado apresenta um importante papel contra a desertificação e erosão dos solos contribuindo para a manutenção da biodiversidade. [4]

As condições ideais ao seu desenvolvimento consistem em solos arenosos pobres em calcário, azoto e fósforo, mas ricos em potássio, com valores de pH a variar entre 4,8 e 7,0. O sobreiro pode ser plantado, semeado ou propagar-se espontaneamente.

Em Portugal encontra-se em maior extensão nas regiões do Alentejo e Vale do Tejo e em Espanha nas zonas de Andaluzia, Estremadura e Catalunha. A produção

anual de cortiça totaliza cerca de 374000 toneladas, em que 74% do total provém destes dois países (51% e 23%, respectivamente). [4] Em território nacional é a terceira espécie em termos de ocupação florestal, com 22,5% da área de povoamento. [1]

Em termos ambientais os montados de sobro desempenham um importante papel na fixação de carbono. Este fenómeno resulta do processo de fotossíntese em que o CO<sub>2</sub> atmosférico é convertido em O<sub>2</sub> e matéria orgânica. Estima-se que os montados sejam responsáveis pela captação de 14000000 toneladas de CO<sub>2</sub> por ano. [5]

Devido à longevidade desta árvore, e o facto de ser explorada sem necessidade de a cortar, os montados permitem a fixação do habitat de muitas espécies, sendo que muitas delas são espécies protegidas e dependes deste tipo de ecossistema, como os casos da Águia Imperial Ibérica (*Aquila adalberti*) e do Lince Ibérico (*Lynx pardinus*). Pelas diversas razões referidas, o montado figura na lista de ecossistemas protegidos pela Rede Natura 2000. [6]

Sendo a cortiça um material possível de ser reciclado, permite ainda que todo o carbono que foi incorporado nessa cortiça tarde a voltar para a atmosfera em consequência do aumento do tempo de vida do produto. [1] Graças às propriedades térmicas da cortiça e à sua fraca combustão, os sobreiros são mais resistentes ao fogo que as outras árvores, tornando-a um retardador natural do fogo. [6]

## **I.2.2. Da árvore à rolha**

Após um lento crescimento de 25 anos, efectua-se o primeiro descortiçamento, também chamado de desboia. Como resultado das tensões provocadas pelo aumento do perímetro do troco, a cortiça virgem apresenta uma superfície bastante irregular e muito sulcada, não ostentando ainda as características que a tornaram um bom vedante. O mesmo acontece com a seguinte tirada, a cortiça segundeira. Ainda que apresente já uma estrutura mais regular continua a não ser a ideal. As cortiças virgens e amadias são ainda assim aproveitadas noutras aplicações, como no fabrico de pavimentos, por exemplo. As tiradas de cortiça efectua-se por períodos mínimos de 9 em 9 anos e após a terceira obtém-se a cortiça amadia ou de reprodução já aplicável à produção rolheira.

O tempo médio de vida de um sobreiro oscila entre os 170 e os 200 anos, ou seja, um sobreiro gera cerca de 13 vezes cortiça apta para fabrico de rolhas. [2]

O descortiçamento é um processo delicado e requer que seja feito por trabalhadores especializados com cuidado e precisão para não comprometer a árvore. Apesar de se terem já desenvolvido ferramentas para descortiçamentos mais mecanizados, o machado e a perícia do tirador continuam a ser os eleitos para um trabalho bem feito. Esta operação decorre entre maio e agosto, quando a árvore se encontra numa fase mais activa do crescimento celular e a casca é mais facilmente retirada do tronco.

Após a extracção da árvore, a cortiça é empilhada no campo ou preferencialmente em instalações fabris. A cortiça deve depois permanecer deste modo por um tempo mínimo de seis meses. Esta exposição ao ar livre permitirá a estabilização da matéria-prima. As pilhas, de formato rectangular, devem ser feitas de modo ao seu comprimento ser perpendicular aos ventos dominantes.

Chegada a altura em que a cortiça é trabalhada, o primeiro passo é submete-la a um processo de cozedura em água a aproximadamente 100°C. Após este processo a cortiça adquire uma estrutura mais regular, torna-se mais maleável e ocorre um aumento de calibre. Para além das melhorias estruturais, este processo contribui para a redução da microflora, sendo deste modo também uma medida de prevenção à ocorrência de odores, já que muitos compostos hidrossolúveis são facilmente extraídos nesta etapa.

Após a cozedura as pranchas de cortiça necessitam de um período de repouso, até que estas atinjam a humidade adequada ao seu processamento.

No processamento das pranchas, para além do processo de diferenciação entre calibres e classes, a matéria é novamente revista de modo a eliminar partes com potencial actividade microbiana e contaminação, como a mancha amarela e defeitos causados por pragas do sobreiro, como por exemplo a cobrilha da cortiça (*Coroebus undatus*).

A indústria rolheira tem à disposição uma grande variedade de rolhas, como por exemplo: rolhas naturais, colmatadas, técnicas, aglomeradas e capsuladas. O processo de fabrico de uma rolha natural pode ser descrito de uma forma bastante sucinta. O

primeiro passo, a rabaneação, consiste no corte de secções transversais, peças essas onde posteriormente serão brocadas as rolhas. As dimensões são depois ajustadas ao tamanho pretendido na etapa de rectificação.

Após a rectificação, segue-se o processo de escolha, que pode ser executada por profissionais de escolha, embora hoje em dia várias indústrias corticeiras disponham já de aparelhos automatizados, separando-as em diferentes classes e segregando quaisquer defeitos. Seguem-se os processos de preparação do produto final, como a lavagem, secagem, colmatação e eventualmente coloração ou marcação, que pode ser feita com recurso a marcadores alimentares ou por queima.

### **I.2.3. Tecido Suberoso**

As células suberosas são células citoplasmaticamente mortas, que terminada a sua diferenciação, ficam reduzidas à sua parede celular. Cada uma destas células (felema) é proveniente de uma célula mãe (felogene), do tecido meristemático cujo funcionamento está ligado ao ciclo fisiológico da árvore e a factores externos. As suas paredes apresentam-se num arranjo hexagonal sem espaços vazios entre elas, com cerca de 30-40  $\mu\text{m}$  de comprimento e 10-15  $\mu\text{m}$  de largura (corte transversal). A suberificação da parede celular é a sua principal característica e tem como função a protecção do caule contra factores externos e permitindo evitar também a perda de humidade. [4]

O sentido do seu crescimento é radial apresentando linhas paralelas aos raios da árvore. O tecido resultante tem capacidade de deformação quando sujeito ao *stress* compressivo do crescimento. O felogene também desenvolve uma camada de células na superfície interior denominada feloderme. [4] Para além da direcção radial, podemos ainda definir na cortiça a direcção axial (direcção vertical da árvore) e tangencial (perpendicular às anteriores).

As camadas celulares referidas constituem a periderme, conjunto de tecidos cuja função é a de substituir a epiderme, principalmente em caules e raízes, protegendo-os quando estes ficam expostos por danos causados durante o crescimento. [4]

Tal como acontece com a madeira em que se pode determinar a idade de uma árvore pela contagem dos anéis do seu tronco, o mesmo acontece com a cortiça. O felogene é funcional entre Abril e Novembro, atingindo a sua actividade máxima por volta do mês de Junho. Estas variações sazonais na actividade fisiológica geram células que macroscopicamente se diferenciam gerando camadas distintas. [4]

Durante o ciclo de vida do sobreiro, este produzirá dois tipos de cortiça, uma de primeira geração, produzida pelo felogene original da árvore, designada de cortiça virgem, e as subsequentes camadas, formadas por regeneração do felogene, cortiça de reprodução. [7]

## **I.2.4. Aplicações**

Das caravelas portuguesas que descobriram os mares, aos foguetões que descobrirão o universo, é vasto o campo de aplicação de cortiça. Isto graças a uma combinação de características que a torna num material único e muito flexível quanto às aplicações possíveis. Sendo um tecido constituído por células vazias (cerca de 40 milhões de células por  $\text{cm}^3$ ), a cortiça é leve, praticamente impermeável a líquidos e gases, elástica e compressível, resistente a diversos produtos químicos e inócuo. Possui uma massa volúmica média de  $200 \text{ kg/m}^3$  e é um excelente isolante térmico, vibrático e acústico e é praticamente imputrescível, provavelmente devidos à presença dos ceróides impermeabilizantes e dos taninos. [2]

A cortiça, segundo os documentos mais antigos, terá tido as suas primeiras utilizações na China, Egipto, bem como noutros países da Ásia Menor, por volta de 3000 a.C.. As propriedades flutuantes e impermeáveis deste material eram já conhecidas, e por isso eram usadas em utensílios de pesca e vedantes de ânforas. [4] Ainda da antiguidade, restam vestígios arqueológicos de urnas com cortiça em cemitérios na Sardenha. [4,8]

Nas épocas Romana e Grega, a “árvore da casca”, assim chamada por autores da época, era uma árvore consagrada como símbolo de valor. [2] Para além dos numerosos

artefactos que se preservaram, a utilização da cortiça nesta época está muito bem documentada por muitos poetas e filósofos, tal como Teofastro (IV-III a.C.). [4]

No século III a cortiça já era utilizada como vedante de ânforas para vinho e com bastante sucesso, pois alguns desses recipientes foram encontrados em 1939, em França, contendo vinho ainda bebível. [2]

Evoluindo no tempo até à idade média, as aplicações da cortiça estenderam-se ao mobiliário, isolante de chão e paredes, continuando a ser utilizada como vedante. Contudo, só no século XVII se torna comum o conceito de “rolha” como a conhecemos hoje, quando em 1680 o monge beneditino Don Pierre Pérignon começou a utilizar este método de vedação, enquanto aperfeiçoava as suas técnicas de produção de champagne. [4]

Entretanto também a ciência voltou os olhos para este material. Em 1664 Robert Hooke fez as primeiras observações ao microscópio de células vegetais utilizando a cortiça como tecido. Os primeiros ensaios químicos realizados com cortiça datam do século XVIII. [7]

A utilização de cortiça perdurou até aos dias de hoje, e actualmente é um produto associado à inovação. Para além da rolha que continua a ser o principal produto, e cada vez de melhor qualidade, as aplicações estendem-se desde isolantes para veículos espaciais à preparação de materiais de carbono [9,10], materiais compósitos e até como fonte de moléculas biologicamente activas. [4] O seu potencial farmacológico prende-se fundamentalmente com os metabolitos secundários de baixo peso molecular. Os elagitaninos, por exemplo, têm propriedades antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias e são inibidores da replicação do vírus HIV. [11,8]

## **1.2.5. Composição Química**

Do ponto de vista químico, podemos dividir os constituintes da cortiça em cinco grupos: suberina, lenhina, polissacáridos, taninos e ceróides. Como produto natural que é, não é correcto falar em quantidades exactas de cada constituinte pois estas dependem de factores ambientais, genéticos e até mesmo da idade da árvore. A composição

química é também bastante variável consoante seja cortiça virgem ou de reprodução. [2,7]

A suberina é o composto mais abundante na cortiça, cerca de 50% da matéria total e encontra-se na parede celular das suas células. Consiste num polímero misto de monómeros aromáticos e alifáticos de características hidrofóbicas e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos. A par da suberina também a lenhina tem funções estruturais. A sua estrutura entrecruzada parcialmente aromática confere rigidez à parede celular e é responsável por manter as células unidas. A fracção de polissacáridos é constituída por dois tipos de polímeros, a celulose (homopolímero) e a hemicelulose (heteropolímero). [2,4]

Dentro dos compostos extractivos apresentam-se os ceróides, uma mistura de alcanos, alcanóis e triterpenos, que têm como principal função a impermeabilização da cortiça, e os taninos que são compostos fenólicos e parecem possuir funções protectoras contra ataques de organismos biológicos.[2] Uma análise mais detalhada dos compostos extractivos lipofílicos, mostram que os triterpenos são na sua maioria constituídos por cerina, friedelina e ácido betulínico (Fig.I.1). [12,13]

Os compostos fenólicos são extraíveis com solventes polares tais como etanol e água. Estes compostos dividem-se em dois grupos: os simples de baixo peso molecular, tais como, ácido elágico, ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, ácido gálico, ácido vanílico, etc.; e os compostos poliméricos (taninos) onde também distinguimos dois grupos, os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados. Como exemplo do primeiro grupo é podemos referir o ácido 3,4,5- tri-hidroxibenzóico e do segundo as catequinas e as leucoantocianidinas. [7]

Dada a variedade de moléculas que constituem a cortiça, esta, pode ser vista como uma potencial fonte de moléculas bioactivas ou intermediários para outras sínteses. O ácido betulínico (Fig.I.1), por exemplo, é um composto bastante abundante na cortiça e o seu valor comercial ronda os 130 euros por cada 25mg [14], logo a sua extracção a partir do produto natural pode ser uma alternativa à sua síntese em laboratório.

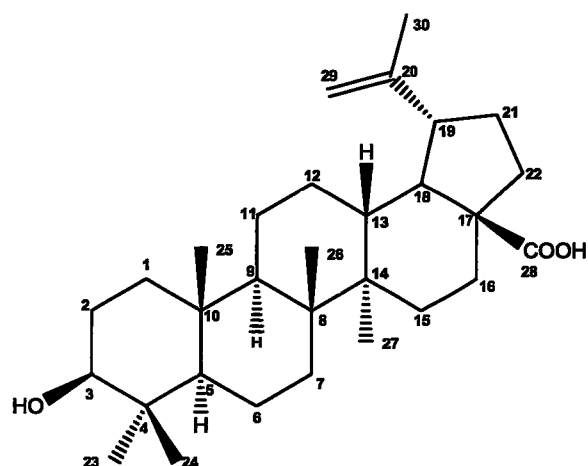


Figura I.1. Estrutura do ácido betulínico, triterpeno abundante na cortiça e muito usado em medicina. [14]

## I.2.6. Defeitos Naturais

Enquanto produto natural a cortiça apresenta defeitos provocados por factores biológicos ou externos que têm um impacto, na maioria das vezes negativo, na qualidade desta matéria-prima.

Um destes problemas prende-se com descontinuidades na massa da cortiça, que são provocados por fracturas radiais, durante o crescimento ou tangenciais que ocorrem geralmente em períodos de seca, incêndios ou ataque biológico que levam a um perda da actividade do felogene (ano seco). A cortiça pode também sofrer o ataque de insectos que desenvolvem galerias, nomeadamente a formiga da cortiça (*Crematogaster scutellaris* Oliv.) e a cobrilha da cortiça (*Coroebus undatus* F.). Este defeito torna a cortiça imprópria para o fabrico de rolhas pois perde a sua capacidade enquanto vedante. [4]

A porosidade é um factor a ter em conta na determinação da qualidade da cortiça, apesar de não ser um “defeito” pois estes poros desempenham um papel na fisiologia da planta, por permitirem as trocas gasosas entre o tronco e o exterior. A sua quantidade, dimensão e distribuição são tidas em conta no momento da atribuição de classes.



Um outro defeito que compromete a performance da rolha é o chamado “verde”. Estas cortiças apresentam uma concentração anormal de humidade (400%-500% contra os normais 14%) e por esta razão demoram mais tempo a secar. Quando por fim secam, o volume diminui cerca de 30% levando ao encolhimento e por vezes colapso das células. [4]

As pranchas de cortiça por vezes apresentam manchas acinzentadas ou amareladas que resultam da presença de compostos naturais concentrados nessas zonas ou de ataques biológicos, e estão particularmente associadas a condições de elevada humidade. Em ambos os casos, não se utilizam para a produção de rolhas com o intuito de evitar contaminações com substâncias causadoras de maus odores. [4] As manchas amarelas são causadas maioritariamente pelo ataque do basidiomiceta *Armillaria mellea*, um microorganismo que se desenvolve no solo. [4] Quando as árvores sofrem ataques externos, respondem com alterações celulares, ocorrendo uma diminuição no teor em lenhina e polissacáridos e um aumento de extractivos polares. A cortiça adquire assim a coloração amarelada e um cheiro notável a mofo. [4,15] A exigência dos consumidores e a pressão dos mercados de vedantes alternativos às rolhas, têm nos últimos anos, centrado a atenção para o problema dos compostos contaminantes em cortiça. O chamado “gosto de rolha”, pode ser causado por diversos compostos, contudo o 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA) é apontado como o principal responsável em cerca de 80% dos casos de rejeição de vinhos. A presença de “off-flavours” afecta tanto a indústria corticeira como a indústria vinícola, representando avultadas perdas económicas. [16]

Existem múltiplas hipóteses para a presença do 2,4,6-TCA na cortiça, como a cloração de derivados da lenhina durante o processo de cloração da cortiça (método em desuso) [16] ou o resultado de transformações químicas de determinados percursores clorofenólicos (2,4,6-triclorofenol (TCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (TeCP) e pentaclorofenol (PCP)). [17] Alguns biocidas, nomeadamente derivados do TCP, são biotransformados via enzimática (clorofenol-*O*-metiltransferase (CPOMT)) por alguns fungos em metabolitos inócuos para o seu desenvolvimento (entre eles o 2,4,6-TCA). Desde 1980 que a sua utilização foi proibida, contudo os pesticidas organoclorados são poluentes lipofílicos de grande persistência e tendem a acumular-se nos tecidos

vegetais. Na literatura estão documentados estudos que mostram a possível relação entre a concentração de diversos biocidas e 2,4,6-TCA. [17-19]

### **I.2.7. Compostos Contaminantes**

Apesar de a rolha ser apontada como a principal “culpada” por estes desagradáveis odores, estes podem também ser provenientes de contaminações durante o processo de produção de vinhos e armazenamento em adegas cuja atmosfera está contaminada. Foram já reportados casos em que vinhos conservados em barricas de madeira estavam contaminados, mesmo sem nunca terem estado em contacto com rolhas de cortiça. [22]

De notar que a presença de 2,4,6-TCA afecta o produto final apenas nas suas características organolépticas, não sendo tóxico nem perigoso para o ser humano às concentrações em que geralmente se encontra (ng/L). Os mofos têm sido associados a várias substâncias para além do 2,4,6-TCA, tais como a geosmina, 2-metilisborneol, guaiacol, 1-octeno-3-ona, 1-octeno-3-ol, pirazinas, outros cloroanisóis e clorofenóis, 2,4,6-tribromoanisol e respectivo halofenol.

#### **Halofenóis**

Os halofenóis são um grupo de moléculas derivadas do fenol, em que este é substituído numa ou mais posições por halogénios, cloro (Cl), bromo (Br), Iodo (I) e Flúor (F).

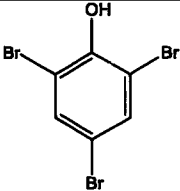
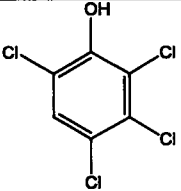
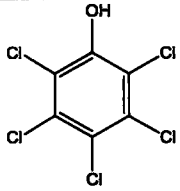
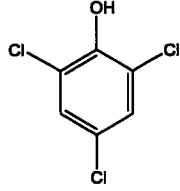
Estes compostos são amplamente usados na produção de pesticidas, herbicidas, produtos para preservar madeiras, entre muitos outros químicos associados à agricultura e indústria. Os clorofenóis e os bromofenóis são os halofenóis mais utilizados para estes fins. Esta classe de compostos é conhecida pela sua toxicidade e por serem bioacumuláveis. O uso de clorofenóis, e de outros halofenóis é actualmente proibido na Europa, mas continua a ser permitido na Ásia, África e América do Sul. [20] A



toxicidade dos fenóis advém da capacidade que estes compostos têm de se ligar de forma não específica a moléculas biológicas.

Para a indústria corticeira, são um problema relevante, pois para além de também eles serem compostos odoríferos, são ainda precursores químicos na formação de haloanisóis, nomeadamente o tão problemático TCA. Na tabela I.1 são apresentados exemplos dos halofenóis mais relevantes, bem como os limites inferiores para a sua percepção em água. De notar que quanto mais substituídos são, menos odoríferos se tornam por diminuição da sua volatilidade.

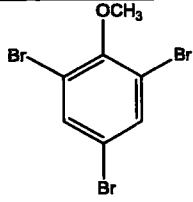
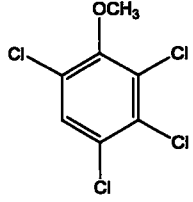
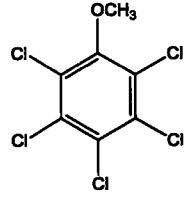
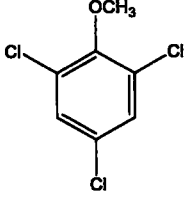
Tabela I.1. Limites de percepção sensorial em água, para os halofenóis mais comuns em cortiça. [21]

Composto	2,4,6-TBP	2,3,4,6-TeCP	PCP	2,4,6-TCP
Estrutura				
Limite percepção sensorial em água $\mu\text{g.L}^{-1}$	--	600	1600	300

### Haloanisóis

Os haloanisóis são tidos como os principais responsáveis pelos “off-flavours” presentes em vinhos e outras bebidas de teor alcoólico. Tal como acontece para os halofenóis, os haloanisóis são derivados do anisol, em que uma ou mais posições são substituídas por átomos de halogénio. A tabela I.2 é indicativa dos limites sensoriais para alguns anisóis em água.

Tabela I.2. Limiar de detecção em água para alguns haloanisóis. \* Valor em pg/L. [21]

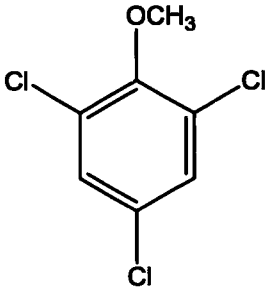
Composto	2,4,6-TBA	2,3,4,6-TeCA	PCA	2,4,6-TCA
Estrutura				
Limite percepção sensorial em água ng.L <sup>-1</sup>	30-300	4	--	8-30*

O 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA) e o pentacloroanisol (PCA) são compostos menos voláteis, possuindo por isso, limiares de percepção mais elevados que o TCA, contudo a sua característica olfactiva é a mesma, ou seja, um desagradável cheiro a mofo. A principal causa do aparecimento destes dois compostos no ambiente resulta da degradação bioquímica de alguns pesticidas contendo 2,3,4,6-tetraclorofenol ou pentaclorofenol. [22]

O TBA surge principalmente por *O*-metilação do seu precursor directo (TCP), e alguns autores associam-no quase sempre a contaminações em adegas, já que este composto é um comum constituinte de produtos usados no tratamento da madeira. [22]

O 2,4,6-TCA (tabela I.3), de fórmula molecular C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>3</sub>O, é um composto orgânico aromático homomonocíclico pertencente à classe dos fenóis e derivados e à sub-classe dos anisóis. Praticamente insolúvel em água, é solúvel em etanol, metanol e benzeno. Tendo na sua base um anel aromático, uma das estruturas químicas mais resistentes produzidas pela natureza, o 2,4,6-TCA é uma molécula altamente estável.

Tabela I.3. Propriedades Físico-Químicas do 2,4,6-tricloroanisol

<ul style="list-style-type: none"><li>• 1,3,5-tricloro-2-metoxibenzeno (IUPAC)</li><li>• Sólido branco; Forma agulhas</li><li>• P.M.: 211,47g/mol</li><li>• P.e.: 246°C (760mmHg)</li><li>• P.f.: 60-62°C</li><li>• Solubilidade em água (10mg/L(20°))</li></ul>	 <p><b>2,4,6-Tricloroanisol</b></p>
--	---

O TCA é um composto de ocorrência natural, na água, na terra, em legumes e frutas, na madeira e cortiça, entre outros. As moléculas de TCA encontram-se ligadas à matriz da cortiça através de dois tipos de ligações: Forças de Van der Waals e pontes de hidrogénio (Figura I.2). [23,24] Apesar destas ligações entre TCA e matriz serem relativamente estáveis, devido às suas características, o TCA será, pois questões de polaridade, mais atraído pelo etanol que pela cortiça, motivo que o fará migrar da rolha para o vinho.

Adicionalmente verificou-se através de um exame microscópico, que podem desenvolver-se colónias de fungos nas lenticelas da cortiça, com a consequente possível concentração de TCA no seu interior. [25]

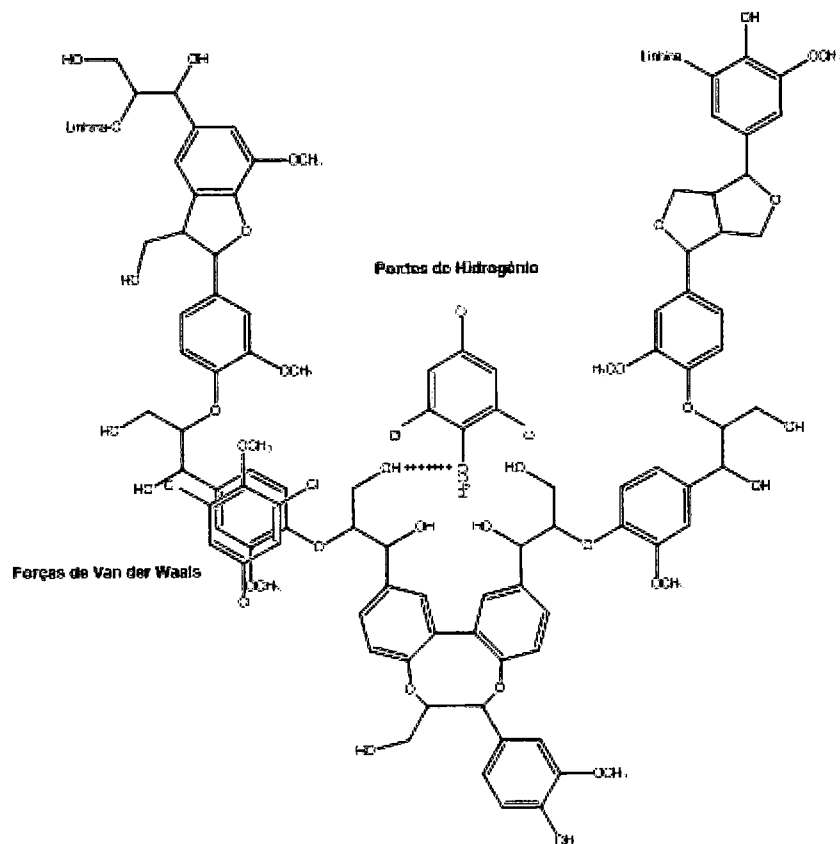


Figura I.2. Representação da ligação entre as moléculas de TCA e a matriz da cortiça [24]

### Outros compostos

As zonas de humidade, como é o caso de alguns solos onde por vezes se encontram os sobreiros, são o ambiente ideal ao desenvolvimento de algas e cianobactérias. Estes organismos são capazes de biossintetizar compostos como o 2-metilisborneol (MIB) e a geosmina, que conferem aos vinhos um gosto e odor a mofo e a terra. [26]

Outros compostos que também são susceptíveis de alterar as características organolépticas do vinho são o 3-metil-1-butanol, o 1-octeno-3-ol e o guaiacol entre muitos outros.

## **I.3. Estado de arte (Prevenção, Esterilização, Descontaminação)**

A indústria corticeira dispõe já de alguns métodos, para fazerem face ao problema das contaminações, permitindo a obtenção de um produto final de elevada qualidade. Alguns métodos têm como função eliminar as causas de contaminação, por irradiação dos microorganismos ou pela eliminação de agentes clorados, enquanto outros métodos actuam directamente sobre os níveis de TCA presentes na cortiça.

O tempo que a cortiça permanece em estabilização pode levar à criação das condições de temperatura e humidade perfeitas para o desenvolvimento microbiano, e por consequência ao aparecimento de metabolitos da sua acção, nomeadamente o 2,4,6-TCA. Assim sendo, este é um ponto por onde as indústrias corticeiras podem actuar em primeiro lugar.

A prevenção começa com a chegada da cortiça ao estaleiro. As pranchas devem ser empilhadas, idealmente, sem estar em contacto com solo e este deverá respeitar as normas do Código Internacional das Práticas Rolheiras (CIPR). As pilhas deverão ser feitas de modo a facilitar a circulação de ar e o escoamento de água. A cortiça deve ser correctamente limpa de calços, mancha, cortiças com musgo e líquenes e refugos, evitando o contacto de “cortiças boas” com outras com elevado potencial contaminante.

Existe descrito na literatura uma variedade de técnicas para esterilização da cortiça e produtos de cortiça. A eliminação de microorganismos contribui para a redução das probabilidades de contaminações, sem no entanto ter qualquer efeito na quantidade de TCA já existente. Em técnicas mais antigas utilizou-se para este fim ácido oxálico e hipoclorito de sódio (efeito bactericida), contudo estas revelaram-se pouco seguras com o indesejável uso de produtos clorados, o que levou estes compostos a serem proibidos pelo CIPR, dando lugar a compostos como o formaldeído e o anidrido sulfuroso. [27] Foi também estudada a aplicação de antibióticos na esterilização (natamicina ou antimicina) [27,28] bem como de soluções de peróxido de hidrogénio,

com acção tripla: oxidação de 2,4,6-TCA, esterilização e branqueamento de rolhas. [27,29]

Ao nível da física, têm-se vindo a estudar a aplicação de radiação  $\gamma$  e microondas. [27] Esta última, por aquecimento das moléculas de água leva à morte dos microorganismos bem como a evaporação de contaminantes.

A remoção de 2,4,6-TCA torna-se especialmente problemática devido a características intrínsecas, tanto da molécula como da cortiça. O 2,4,6-TCA é um composto fracamente volátil (p.e.=246°C, 760mmHg) e praticamente insolúvel em água. A cortiça por sua vez é impermeável a gases e líquidos. A aplicação de temperaturas elevadas, com o objectivo de vaporizar os contaminantes, geralmente leva à degradação da matéria. [27]

Tal como acontece com a esterilização, existem várias técnicas já estudadas para limpeza de contaminantes em cortiça, muitas delas com resultados bastante positivos, contudo, a problemática continua a assentar no facto de ser apenas uma limpeza superficial. Ainda assim algumas técnicas apresentam resultados satisfatórios em relação à qualidade do produto final.

A lavagem com ácidos fracos, tais como ácido cítrico (3%v/v) e ácido acético foi testada. [27] A extracção em Soxhlet com *n*-pentano apresenta resultados positivos, contudo a utilização de alcanos em indústria levantaria uma série de questões económicas e de segurança. [27]

Dada a natureza das ligações entre 2,4,6-TCA e a matriz da cortiça, desenvolveram-se métodos com o objectivo de criar um solvente de polaridade ajustada à extracção deste composto. Recorre-se frequentemente ao uso de misturas água/etanol. Nestes processos, o vapor de água e etanol é posto em contacto com as rolhas numa câmara de extracção, segue-se uma diminuição do teor em álcool ao mesmo tempo que uma corrente de ar comprimido arrasta os compostos contaminantes ao mesmo tempo que vai secando as rolhas. [24,27]

A utilização de fluídos supercríticos é actualmente um método já aplicado na indústria, revelando-se um método rápido, sem recurso a solventes orgânicos e eficiente. [30] Contudo, esta eficiência diz respeito a partículas pequenas de granulado, pois esta



técnica não consegue ser eficiente, por exemplo, em pranchas de cortiça, onde o fluido teria de ter uma maior capacidade de penetração.

Existem alguns princípios e dados experimentais já adquiridos [31], acerca dinâmica das transferências de TCA entre a cortiça e a maceração de análise ou vinho. Estes estudos foram imprescindíveis para o controlo de qualidade na indústria corticeira, pois indicam-nos quais as condições requeridas para que os resultados se assemelhem ao máximo com a realidade dos vedantes.

- Fazendo sucessivas recolhas numa maceração (intervalos de horas), verifica-se que a concentração de TCA no meio aumenta até atingir um ponto de equilíbrio. Estes resultados permitiram definir as 24 horas, como o tempo de extracção mais eficiente (Fig.I.3).

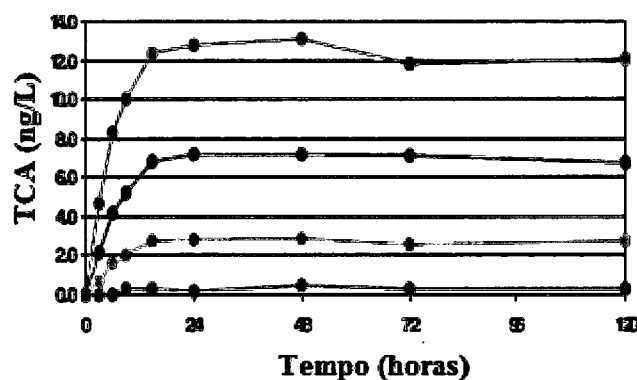


Figura I.3. Concentração de TCA (ng/L) em função do tempo (horas) das recolhas efectuadas para quatro amostras diferentes. (adaptado de [31]).

- Não existe correlação entre a quantidade total de TCA numa amostra com a quantidade na maceração quando esta atinge o equilíbrio com a amostra. Apenas 0,05 % a 2,0% do TCA total é extraído para a maceração (o mesmo acontecerá num vinho). [31]
- Quando se efectuam sucessivas macerações (24h) para uma mesma amostra esta apresentará sensivelmente o mesmo valor para todas elas. Este fenómeno indica que o TCA extraído está relacionado com um equilíbrio intrínseco às propriedades individuais da cortiça. [31]

- Existe uma boa correlação entre o valor medido para uma maceração de rolhas, por exemplo, e o valor médio das concentrações dessas mesmas rolhas quando medidas individualmente. [31]
- Foi constatado que em soluções mais alcoólicas (sistemas mais orgânicos) existe uma maior extracção de TCA. Contudo, ao se aumentar a afinidade para o TCA permanecer em solução, estamos a reduzir a sua volatilidade bem como a capacidade para a sua absorção em microextração em fase sólida. [31]
- Dos pontos anteriores obtém-se a definição de TCA *libertável* (*Releasable TCA*). O TCA *libertável* será a quantidade de TCA em solução aquando do equilíbrio, e é função do teor de TCA na cortiça, do teor alcoólico da solução/vinho e da localização física do TCA na cortiça. Estas quantidades são usualmente expressas em ng/L ou partes por trilião (ppt). [1]

## I.4. Adsorventes e solventes

### I.4.1 Adsorventes

O carvão activado é um material de carbono altamente poroso e com características muito versáteis, por essa razão é aplicado tanto em uso doméstico, passando pela medicina até à remoção de poluentes.

Estes carvões podem ser obtidos a partir de diversos materiais lenhosos, como é o caso da casca de coco, casca de noz, cortiça entre outros. Existem dois métodos de produção, a activação física, que recorre á queima com gases a altas temperaturas e a activação química, em que o precursor é misturado com um reagente ácido ou básico e depois aquecido. A activação química é mais vantajosa, pois ocorre a temperaturas mais baixas, com melhor rendimento e maiores áreas de superfície. [36]

A sua elevada microporosidade confere-lhe um extraordinário poder de absorção, devido à extensa área de superfície disponível para contacto (1g de carvão = 500m<sup>2</sup>). A estrutura do carvão vai depender do precursor utilizado bem como das

condições de trabalho. A estrutura porosa é formada por folhas grafíticas e o espaço formado por elas é de dimensões moleculares. As propriedades químicas dos carvões são atribuídas durante a sua produção, pela formação de grupos carboxílicos, fenólicos, lactonas e éteres (Fig.I.4).

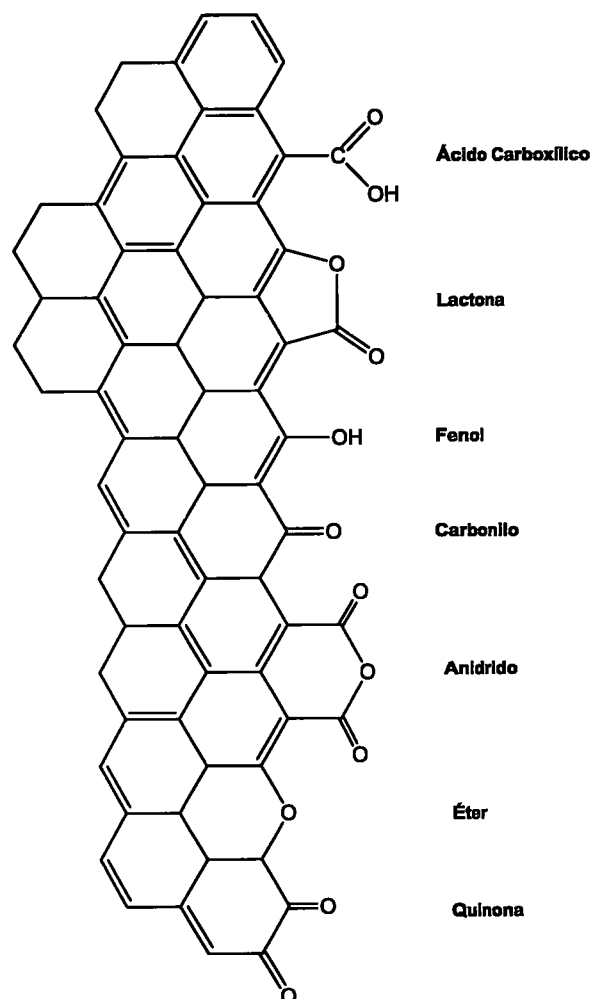


Figura I.4. Representação esquemática dos principais grupos funcionais presente na superfície de um carvão activado. [36]

#### I.4.2 Solventes

A presença de um solvente pode acelerar uma reacção num factor de  $10^{20}$ ; a mudança de um solvente para outro pode produzir variações da ordem dos milhões na velocidade de uma reacção. [37] É portanto pertinente o estudo da variação de solventes na extracção de compostos contaminantes em cortiça.

Da enorme variedade de solventes que poderíamos ter escolhido para realizar este trabalho experimental, a solução hidroalcoólica é a mais pertinente. Em primeiro lugar, porque não levanta problemas em termos de toxicidade no produto final, é um sistema já familiar no que diz respeito às técnicas de análise em cortiça e sobretudo por ser um meio semelhante ao de um vinho comum.

O estudo referido em [38] mostra a capacidade que tanto o álcool como a água, tem de permear as células da cortiça. Existem entre as células da cortiça, pequenos canais denominados de plasmodesmos, que atravessam as paredes celulares suberizadas, com um diâmetro aproximadamente de 100 nm. É através destes canais que se efectuam as trocas gasosas nas células. Os resultados obtidos em [38] revelam que tanto o etanol como a água tanto no estado líquido como vapor, tem capacidade de permear não só estes canais como também a parede celular.

O mecanismo proposto sugere que as moléculas de água inicialmente vão aderindo aos grupos hidroxilo e metoxi de carácter hidrofílico, formando ligações por pontes de hidrogénio. A absorção continua com a formação de “clusters” de água em torno destes centros.

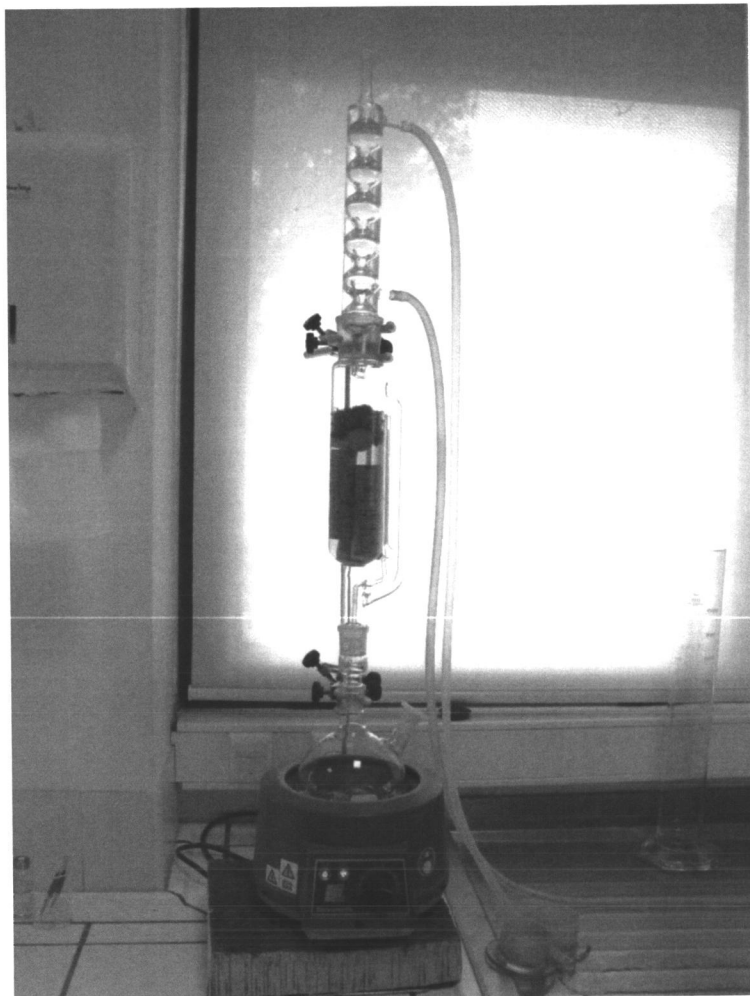
Tanto o etanol quanto a água revelam grande afinidade para a cortiça, com a água a exibir uma maior absorção, talvez devido à diferença de tamanho entre as moléculas. Os valores de absorção obtidos em [38] foram os seguintes:  $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol/cm}^3_{\text{cortiça}}/\text{Pa}$  (água) e  $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol/cm}^3_{\text{cortiça}}/\text{Pa}$  (etanol).

A água, o principal solvente que nos ocorre, deve, em grande parte, o seu poder de solvatação em especial ao grupo  $-\text{OH}$ . Consegue solvatar catiões fortemente por intermédio dos pares de electrões não compartilhados no oxigénio e solvatar aniões através de ligações por pontes de hidrogénio. [37]

Solventes como por exemplo, o pentano, foram testados a fim de avaliar o seu poder de extracção de TCA. [27] Outros alcanos, como o n-hexano são frequentemente citados em artigos como bons extractores de compostos apolares. Contudo é cada vez mais frequente procurar-se uma alternativa mais verde quando comparada a estes compostos, na maioria das vezes, de origem petroquímica. [39]

## CAPÍTULO II

# Discussão de resultados



## II.1. Apresentação e discussão de resultados

Os processos de redução/eliminação de TCA em amostras de cortiça foram avaliados com recurso a sistemas de extracção simples e exaustiva sólido-líquido (Soxhlet), em diferentes condições experimentais (sistema extractor de H<sub>2</sub>O/EtOH (88:12 e 80:20)), com e sem substituição de solvente, presença e ausência de adsorvente.

Utilizaram-se rolhas e discos como material de estudo, uma vez que se tratam dos principais produtos finais da indústria corticeira.

### II.1.1. Extracção Simples

Durante a realização dos ensaios o pH foi verificado em todas as etapas, mantendo-se sempre em valores aproximados a pH 5.

#### Ensaio 1

Na tabela II.1, apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de TCA (ppt) em rolhas e discos quando submetidos ao ensaio 1 da extracção simples.

Tabela II.1. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 1 na Extracção Simples.

Tempo (h)	Concentração de 2,4,6-TCA (ppt)			
	Discos intactos	Discos triturados	Rolhas intactas	Rolhas trituradas
24	10,01	11,43	3,40	3,46
48	5,19	12,45	1,74	3,34
72	8,92	13,44	2,71	3,17
96	7,25	8,71	2,39	2,32
120	5,11	7,27	0,42	1,28

Na figura II.1 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 1 da extração simples para as rolhas de cortiça (Fig.III.1).

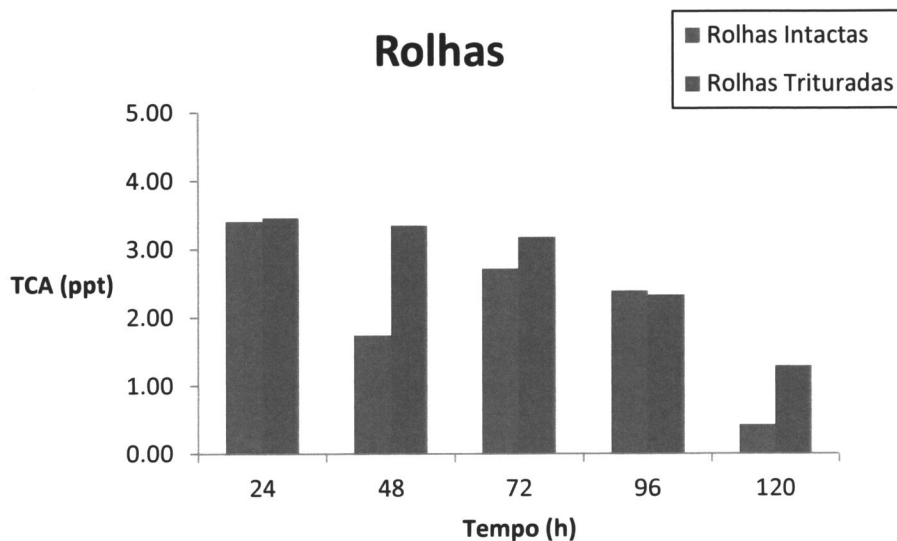


Figura II.1. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 1 da extração simples.

Na figura II.2 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 1 da extração simples para os discos de cortiça (Fig.III.1).

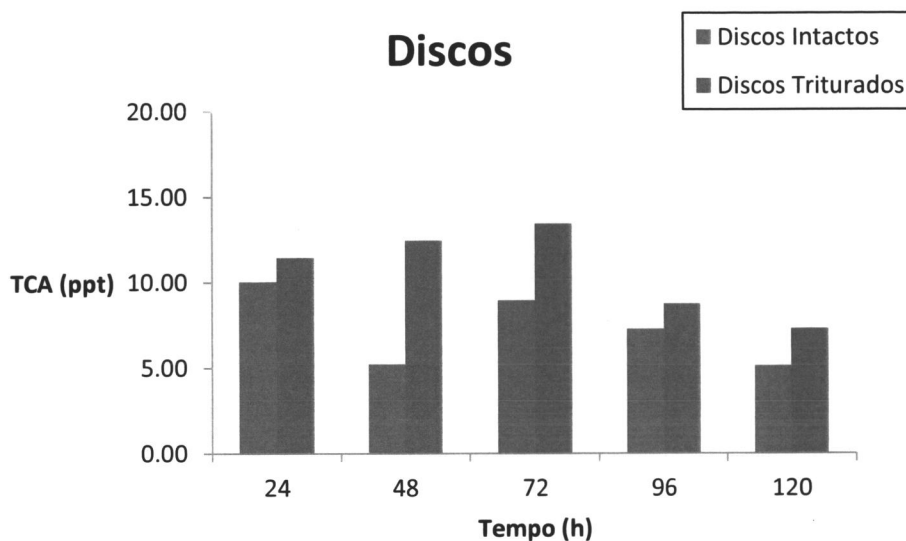


Figura II.2. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 1 da extração simples.

A análise das figuras II.1 e II.2 permite verificar que, no caso das amostras das rolhas e dos discos, intactas ou trituradas, os valores de TCA se mantêm relativamente constantes, o que confirma que após 24 horas de extracção a quantidade de TCA em solução, estabiliza. A comparação de valores entre as amostras de rolhas e discos permite facilmente constatar que os discos apresentam valores de TCA superiores, um resultado que poderá resultar da maior superfície de contacto durante a extracção. Na comparação de valores entre as amostras intactas e trituradas, verifica-se que as amostras trituradas apresentam sempre valores de TCA ligeiramente superiores, um resultado igualmente previsível, já que nestas últimas existe uma superior área de extracção para o solvente. Em ambas as amostras, a ligeira redução na concentração de TCA que se verifica após as 96 horas de extracção poderá dever-se à decomposição química do TCA em solução. A possível decomposição química poderá ser um factor determinante para a redução de TCA em solução, pois proporcionaria uma superior quantidade de TCA extractável e uma consequente diminuição deste na superfície das amostras.

## Ensaio 2

Na tabela II.2, apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de TCA (ppt) em rolhas e discos quando submetidos ao ensaio 2 da extracção simples.

Tabela II.2. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 2 da Extracção Simples. A célula a vermelho indica um ponto discrepante.

Tempo (h)	Concentração de 2,4,6-TCA (ppt)			
	Discos intactos	Discos triturados	Rolhas intactas	Rolhas trituradas
24	438,37	291,71	19,56	31,86
48	319,98	325,62	26,23	27,63
72	328,93	160,67	25,08	13,64
96	15,96	167,29	451,60	15,78
120	232,65	182,01	15,42	21,82



Na figura II.3 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 2 da extracção simples para as rolhas de cortiça (Fig.III.1).

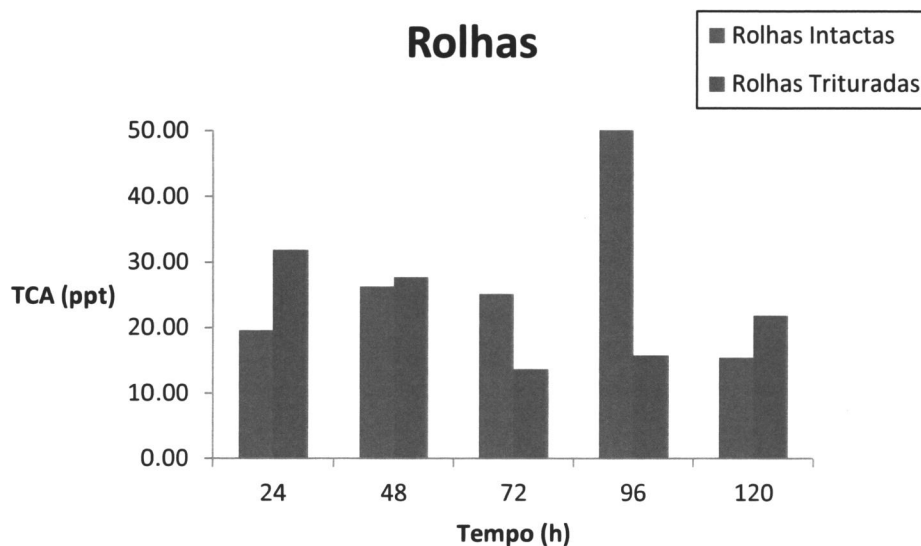


Figura II.3. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 2 da extracção simples.

Na figura II.4 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 2 da extracção simples para os discos de cortiça (Fig.III.1).

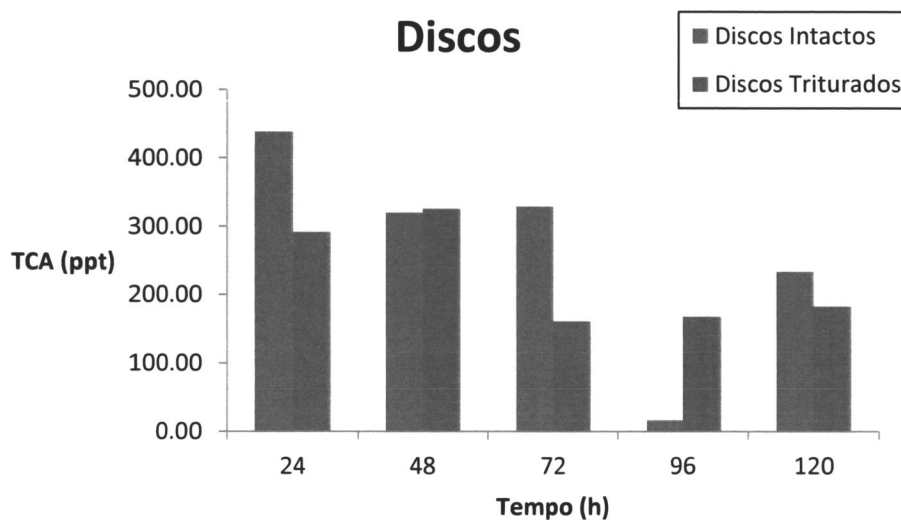


Figura II.4. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 2 da extracção simples.

No ensaio 2 testou-se o efeito do aumento da percentagem do álcool, de 12 para 20%, no solvente de extracção. Quanto maior o teor alcoólico, maior o carácter orgânico do solvente e a sua capacidade para extrair as moléculas de TCA, por disrupção das interacções deste composto com a matriz da cortiça.

A utilização de soluções com um teor alcoólico superior a 12% permite-nos inferir com mais certeza, acerca do comportamento migratório do TCA em rolhas de cortiça, quando estas se encontram em contacto com bebidas de teor alcoólico superior ao vinho comum, como por exemplo whiskies, espumantes, etc.

A análise dos gráficos II.3 e II.4 permite verificar que, no caso das amostras das rolhas e dos discos, intactas ou trituradas, os valores de TCA se mantêm relativamente constantes, o que confirma mais uma vez a fiabilidade do período de 24 horas de extracção. A comparação de valores entre as amostras de rolhas e discos permite novamente constatar que os discos apresentam valores de TCA superiores, devido à área de contacto superior. Na comparação de valores entre as amostras intactas e trituradas, verifica-se os valores de TCA não são previsíveis e correlacionáveis, como ocorreu no ensaio 1. O aumento da percentagem de etanol na solução extractante poderá ter provocado alterações estruturais nas amostras de cortiça, fazendo com que a extracção de TCA não seja linear e proporcional. Em ambas as amostras, verifica-se novamente uma ligeira redução na concentração de TCA em solução às 72 horas, 24 horas antes em comparação com o ensaio 1. Este facto poderá ser explicado pelo superior teor alcoólico que poderá ter promovido uma superior decomposição química do TCA em solução.

A comparação directa das figuras II.1 a II.3 permite facilmente aferir que o aumento do teor alcólico da solução extractante, de 12 para 20%, permitiu a extracção de quantidades de TCA dez vezes superiores no caso das rolhas e de trinta vezes no caso dos discos. Estes resultados, que podem dever-se a inúmeros factores, como a superior solubilização do TCA ou uma melhor interacção com a matriz da cortiça, revelam o potencial deste tipo de misturas para a eliminação do TCA em amostras de cortiça.

### Ensaio 3

Na tabela II.3, apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de TCA (ppt) em rolhas e discos quando submetidos ao ensaio 3 da extracção simples.

Tabela II.3. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 3 da Extracção Simples.

Tempo (h)	Concentração de 2,4,6-TCA (ppt)			
	Discos intactos	Discos triturados	Rolhas intactas	Rolhas trituradas
24	15,53	14,95	1,42	3,08
48	17,26	21,74	1,48	1,88
72	14,57	15,21	1,83	2,17
96	9,13	15,00	1,74	1,91
120	5,80	21,77	1,97	1,81
144	4,71	20,13	1,67	1,62
168	6,71	19,24	1,92	1,38
192	6,16	10,49	1,68	1,62
216	5,99	7,57	1,56	1,49

Na figura II.5 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 3 da extracção simples para as rolhas de cortiça (Fig.III.1).

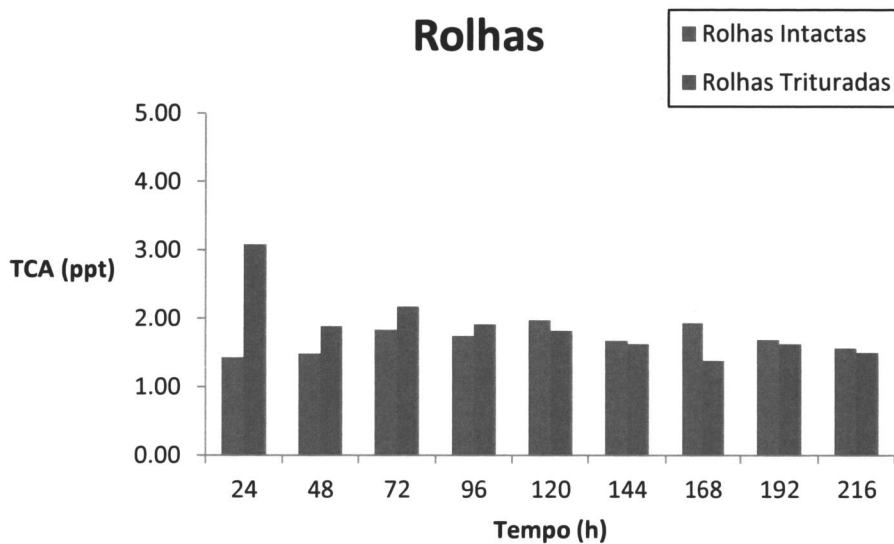


Figura II.5. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 3 da extração simples.

Na figura II.6 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 3 da extração simples para os discos de cortiça (Fig.III.1).

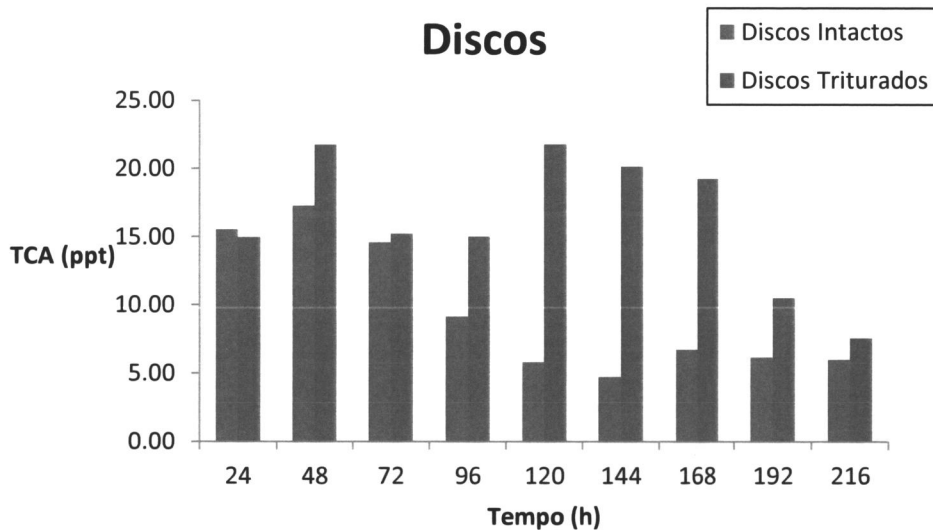


Figura II.6. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 3 da extração simples.

No ensaio 3 foi testada a influência da mudança de solvente a cada 24 horas, com o intuito de avaliar a redução da quantidade de TCA, eliminando qualquer possível efeito de saturação do solvente.

A análise dos gráficos II.5 e II.6 permite verificar que, no caso das amostras das rolhas e dos discos, quer intactas e trituradas, os valores de TCA, na generalidade, diminuem gradualmente ao longo do tempo. Este resultado era expectável, pois a contínua renovação do solvente de extracção evitava qualquer problema de saturação do mesmo.

A comparação de valores entre as amostras de rolhas e discos resulta novamente da área extractável ser superior nos discos face às rolhas.

No caso das rolhas após 48 horas os valores de TCA atingem valores muito próximos dos valores mínimos obtidos após 216 horas, o que valoriza muito esta metodologia.

Nos discos, só obtêm valores mínimos após 144 horas no caso de discos intactos e de 216 horas no caso dos discos triturados. Possivelmente a contínua substituição do solvente de extracção aumenta a permeabilização neste tipo de estrutura, promovendo o acesso do solvente a um maior numero locais de acumulação de TCA.

#### **Ensaio 4**

Na tabela II.4, apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de TCA (ppt) em rolhas e discos quando submetidos ao ensaio 4 da extracção simples.

Tabela II.4. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 4 da Extração Simples.

Tempo (h)	Concentração de 2,4,6-TCA (ppt)			
	Discos intactos	Discos triturados	Rolhas intactas	Rolhas trituradas
24	61,95	7,49	4,53	0,68
48	40,74	6,41	5,28	0,55
72	49,38	10,01	3,26	1,19
96	15,40	8,03	3,66	1,32
120	14,33	11,87	5,64	2,05
144	8,04	5,78	4,58	4,56
168	6,50	6,94	3,05	1,57
192	6,31	9,71	3,45	1,49
216	8,71	6,76	3,80	1,50

Na figura II.7 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 4 da extração simples para as rolhas de cortiça (Fig.III.1).

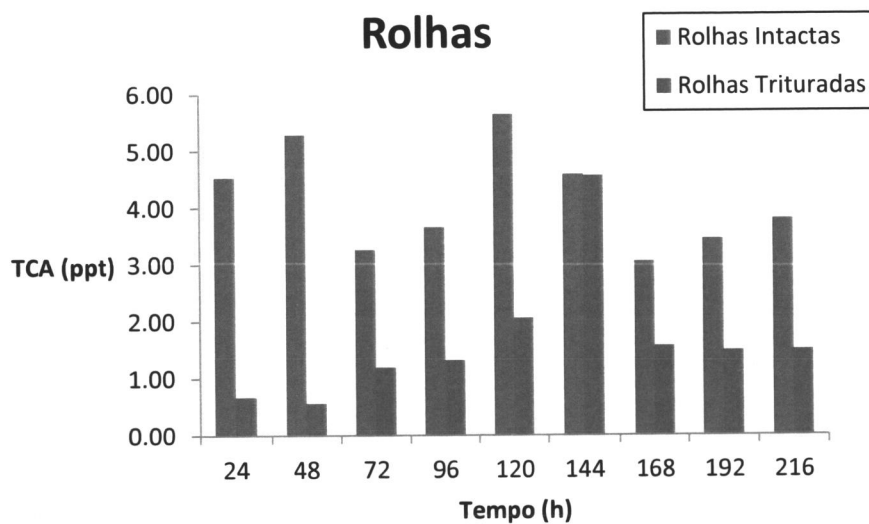


Figura II.7. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 4 da extração simples.

Na figura II.8 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 4 da extracção simples para os discos de cortiça (Fig.III.1).

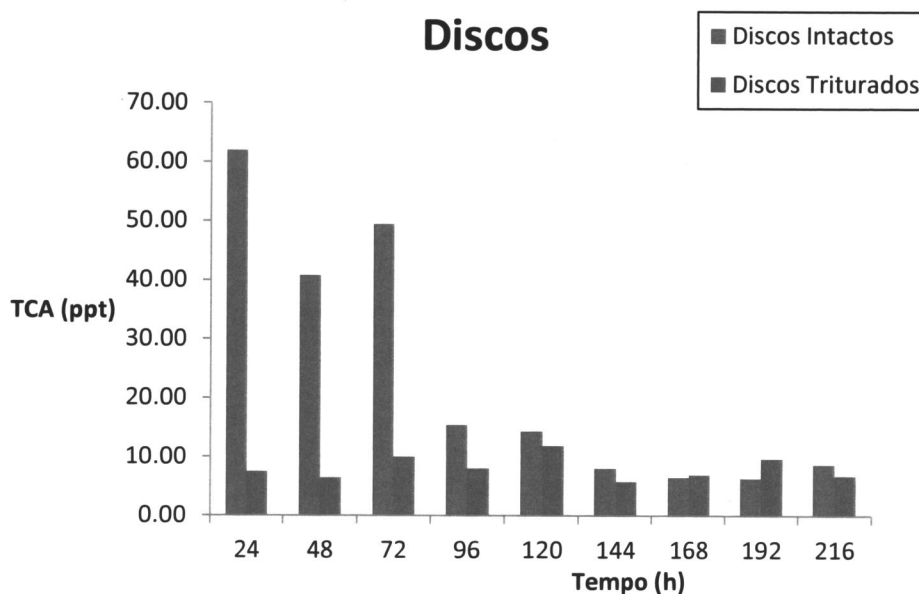


Figura II.8. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 4 da extracção simples.

No ensaio 4 testou-se novamente o efeito do aumento da percentagem do álcool, de 12 para 20%, no solvente de extracção, mas com substituição contínua de solvente a cada 24 horas, eliminando qualquer possível efeito de saturação do solvente.

A análise dos gráficos II.7 e II.8 leva à confirmação da análise feita para os ensaios simples anteriores, em que os discos apresentam valores superiores de TCA.

O resultado mais importante obtido até agora pode ser verificado pela análise da figura II.7, ou seja, o quase desaparecimento de TCA em solução após 24 de extracção e com apenas uma renovação de solvente. Também este resultado pode ser correlacionado com o ensaio 3 (Fig. II.5) para comprovar a importância da extracção com um sistema com superior proporção alcoólica, pois com o mesmo tempo de extracção (24 horas), consegue-se extrair aproximadamente cinco vezes mais TCA no sistema extractor H<sub>2</sub>O/EtOH (80:20).

No caso dos discos, só se obtêm valores mínimos após 48 horas no caso de discos intactos e de 96 horas no caso dos discos triturados. Possivelmente a contínua

substituição do solvente de extracção aumenta a permeabilização neste tipo de estrutura, promovendo o acesso do solvente a um maior numero locais de acumulação de TCA.

### **II.1.2. Extracção em Soxhlet**

Durante a realização dos ensaios o pH foi verificadoem todas as etapas, mantendo-se sempre em valores aproximados a pH 5.

As temperaturas elevadas a que a extracções em Soxhlet ocorrem promovem uma superior penetração do solvente na matriz bem como a disrupção das interacções entre o TCA e a matriz da cortiça, levando a um melhoramento na performance da extracção. De referir que a técnica de extracção por Soxhlet, devido ao contacto com o solvente a temperaturas superiores a 80°C, provoca uma ligeira deformação em rolhas e uma forte deformação em discos.

Ao contrário do que ocorre na extracção simples, não se pode inferir com um grau de certeza elevado acerca da concentração alcoólica que de facto está em contacto com o material no reservatório do Soxhlet. O etanol (p.e.78,04°C) possui um ponto de ebulição inferior ao da água (p.e.100°C), o que faz com que as primeiras fracções de vapor contenham uma superior concentração de etanol, ou seja, o primeiro solvente a entrar em contacto com a cortiça estará certamente numa concentração superior a 12% ou 20%, respectivamente.

#### **Ensaio 1**

Na tabela II.5, apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de TCA (ppt) em rolhas e discos quando submetidos ao ensaio 1 da extracção em soxhlet.



Tabela II.5. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 1 da Extração Soxhlet.

Ciclos	Concentração de 2,4,6-TCA (ppt)			
	Discos intactos	Discos triturados	Rolhas intactas	Rolhas trituradas
1	294,03	1879,96	22,97	14,00
2	88,11	1133,32	0,29	0,50
3	207,42	2272,15	8,97	0,50
4	21,07	163,43	17,66	29,20
5	392,31	45,79	0,19	18,78

Na figura II.9 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 1 da extração em Soxhlet para as rolhas de cortiça (Fig.III.1).

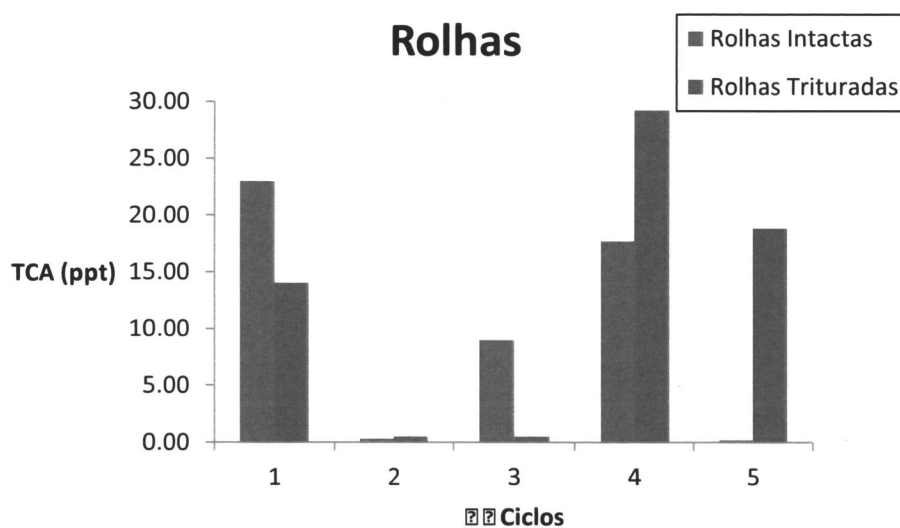


Figura II.9. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 1 da extração em Soxhlet.

Na figura II.10 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 1 da extração em Soxhlet para os discos de cortiça (Fig.III.1).

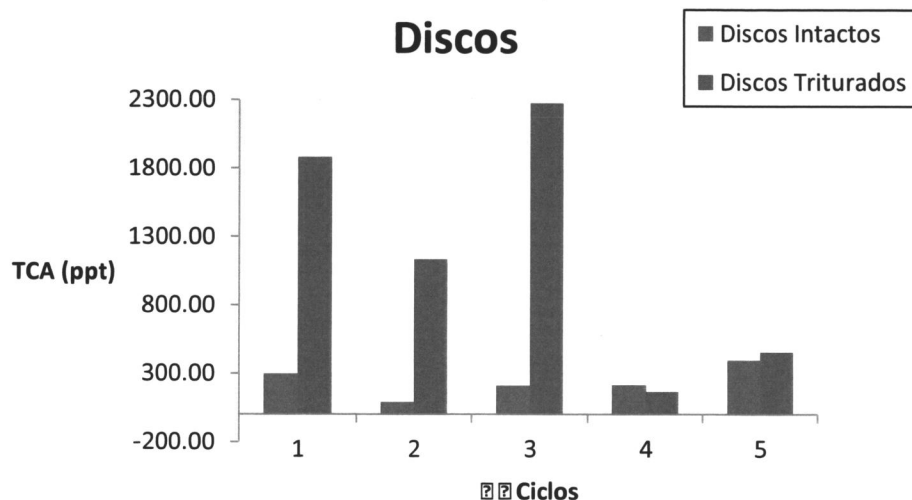


Figura II.10. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 1 da extração em Soxhlet.

O ensaio 1 realizou-se em ciclos sucessivos sem troca de solvente e com análise entre ciclos. O objectivo deste ensaio consiste principalmente na constatação da provável acumulação de TCA na solução extractora ciclo após ciclo.

A análise das figuras II.9 e II.10 permite verificar que os discos apresentam valores de TCA muito superiores. Na comparação de valores entre as amostras intactas e trituradas, verifica-se que as rolhas não apresentam uma grande discrepância de valores de TCA, que se pode dever à superior homogeneidade deste material. No caso dos discos verifica-se que quando estes são triturados *libertam* quantidades substancialmente superiores de TCA quando comparados com os discos intactos, o que se pode dever à superior área de extração para o solvente. No caso dos discos verifica-se uma acentuada redução na concentração de TCA após o 3º ciclo de extração, facto que se poderá dever à decomposição térmica do TCA em solução. A possível decomposição térmica neste sistema poderá ser um factor determinante para a redução de TCA em solução e uma consequente diminuição deste na superfície das amostras. As oscilações nas quantidades de TCA ocorridas nos vários ciclos pode dever-se à composição da fase de vapor após o 1º ciclo, ou seja, a fase de vapor pode arrastar apreciáveis quantidades de TCA para os ciclos seguintes.

## Ensaio 2

Na tabela II.6, apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de TCA (ppt) em rolhas e discos quando submetidos ao ensaio 2 da extração em soxhlet.

Tabela II.6. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 2 da Extração Soxhlet.

Ciclos	Concentração de 2,4,6-TCA (ppt)			
	Discos intactos	Discos triturados	Rolhas intactas	Rolhas trituradas
1	931,95	369,84	353,36	0,50
2	274,18	1,21	56,77	16,27
3	377,47	172,01	454,51	9,83
4	330,34	6,57	10,70	12,86
5	405,21	481,89	104,64	28,36

Na figura II.11 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 2 da extração em Soxhlet para as rolhas de cortiça (Fig.III.1).

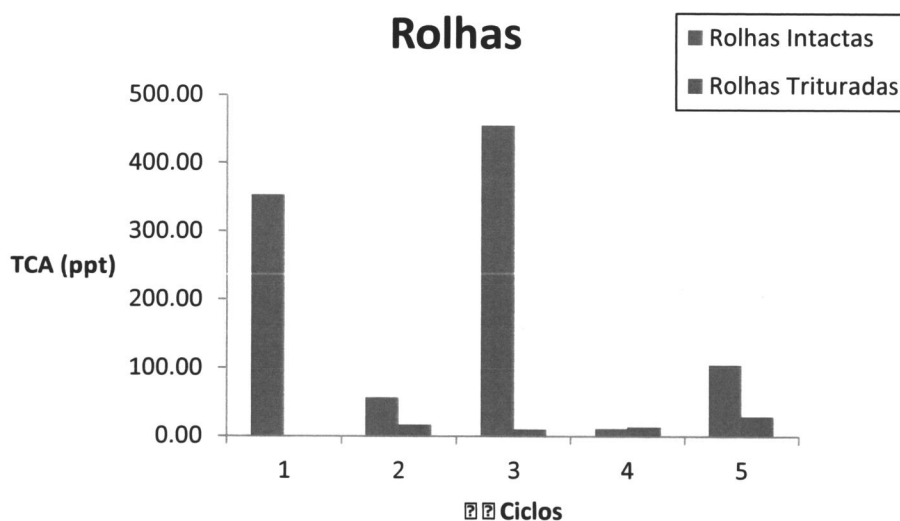


Figura II.11. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 2 da extração em Soxhlet.

Na figura II.12 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 2 da extracção em Soxhlet para os discos de cortiça (Fig.III.1).

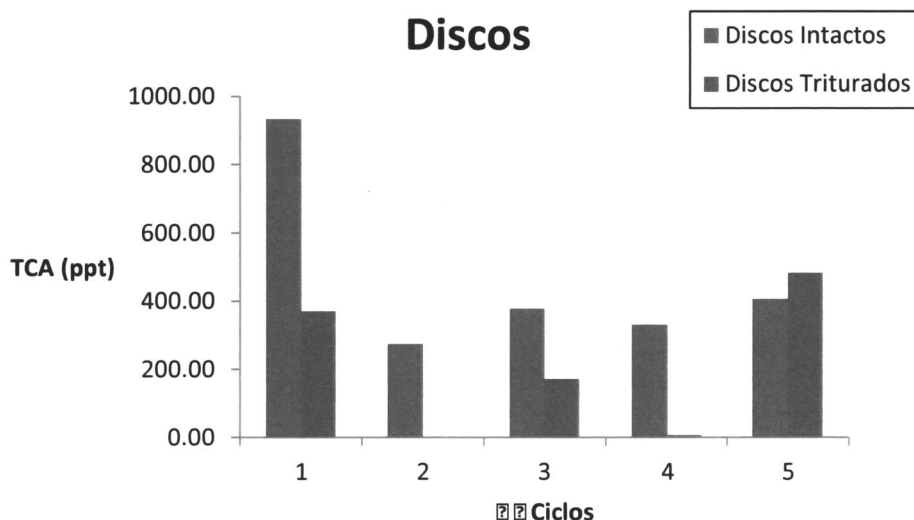


Figura II.12. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 2 da extracção em Soxhlet.

No ensaio 2 testou-se o efeito do aumento da percentagem do álcool, de 12 para 20%, no solvente de extracção.

A análise das figuras II.11 e II.12 permite verificar que os discos, à semelhança do caso anterior, apresentam valores de TCA muito superiores. Na comparação de valores entre as amostras intactas e trituradas, verifica-se que as rolhas não apresentam uma grande discrepância de valores de TCA, que se pode dever à superior homogeneidade deste material. No caso dos discos verifica-se que quando estes são triturados *libertam* quantidades substancialmente inferiores de TCA quando comparados com os discos intactos, o que se pode dever a uma superior decomposição térmica do TCA devido a uma maior área de extracção em contacto com o solvente. No caso das rolhas e dos discos verifica-se uma acentuada redução na concentração de TCA após o 1º ciclo de extracção, ou seja 2 ciclos antes quando comparado com o caso anterior. Esta acelerada decomposição térmica do TCA em solução, pode dever-se à composição *mais alcoólica* do solvente de extracção.

### Ensaio 3

Na tabela II.7, apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de TCA (ppt) em rolhas e discos quando submetidos ao ensaio de extracção em soxhlet.

Tabela II.7. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 3 da Extracção Soxhlet.

Ciclos	Concentração de 2,4,6-TCA (ppt)			
	Discos intactos	Discos triturados	Rolhas intactas	Rolhas trituradas
1	15,40	3,58	1,75	0,25
2	14,11	1,92	9,22	0,92
3	68,20	3,87	2,40	2,87
4	42,03	0,32	5,98	1,16
5	32,44	0,03	0,19	1,79
6	15,06	3,38	1,93	0,67
7	18,76	15,51	3,47	4,20
8	19,88	0,13	0,50	2,46
9	9,26	0,63	0,34	0,30

Na figura II.13 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 3 da extracção em Soxhlet para as rolhas de cortiça (Fig.III.1).

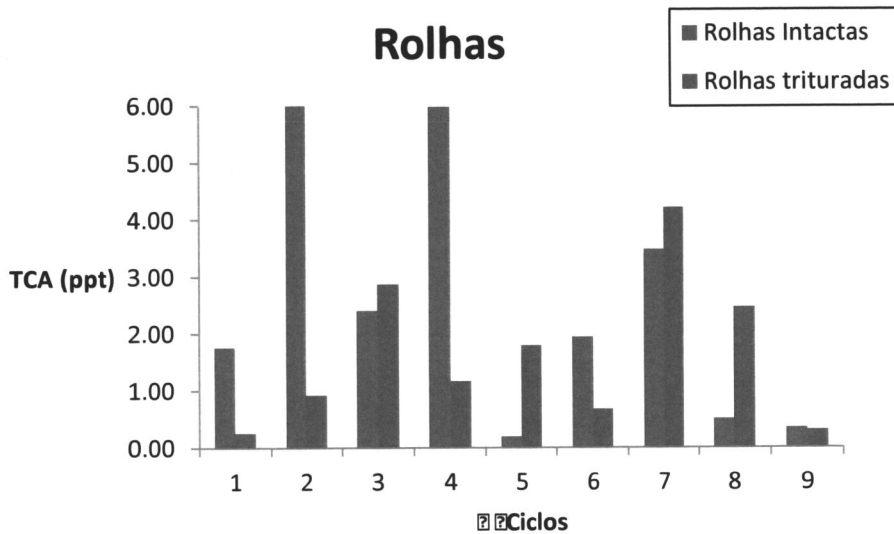


Figura II.13. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 3 da extração em Soxhlet.

Na figura II.14 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 3 da extração em Soxhlet para os discos de cortiça (Fig.III.1).

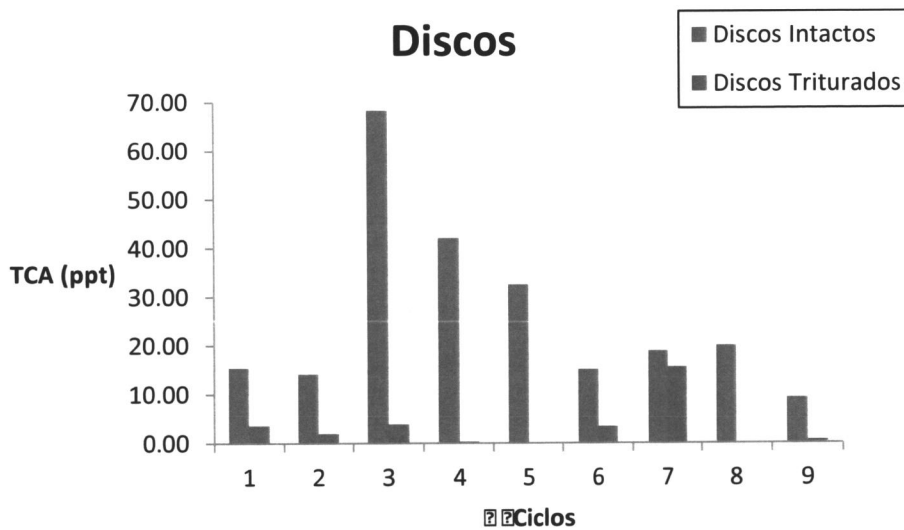


Figura II.14. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 3 da extração em Soxhlet.

No ensaio 3 foi testada a influência da mudança de solvente a cada 24 horas, com o intuito de avaliar a redução da quantidade de TCA, eliminando qualquer possível efeito de saturação do solvente.

A análise dos gráficos II.13 e II.14 permite verificar que, no caso das amostras das rolhas e dos discos, quer intactas e trituradas, os valores de TCA, na generalidade, diminuem gradualmente ao longo do tempo. Este resultado era expectável, pois a contínua renovação do solvente de extracção evitava qualquer problema de saturação do mesmo.

No caso das rolhas e dos discos, após 9 ciclos os valores de TCA atingem valores mínimos, mas no caso dos discos existem algumas oscilações de valores de concentração de TCA. Possivelmente a contínua substituição do solvente de extracção aumenta a permeabilização neste tipo de estrutura, promovendo o acesso do solvente a um maior numero locais de acumulação de TCA.

#### Ensaio 4

Na tabela II.8, apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de TCA (ppt) em rolhas e discos quando submetidos ao ensaio 4 da extracção em soxhlet.

Tabela II.8. Concentrações de 2,4,6-TCA (ppt) obtidas para o ensaio 4 da Extracção Soxhlet.

Ciclos	Concentração de 2,4,6-TCA (ppt)			
	Discos intactos	Discos triturados	Rolhas intactas	Rolhas trituradas
1	38,47	0,20	18,98	7,68
2	25,06	20,77	14,39	7,60
3	19,78	12,05	9,59	4,49
4	12,11	7,65	13,38	8,28
5	10,27	6,44	8,18	8,07
6	20,92	8,59	9,60	3,33
7	26,66	1,80	7,12	10,41
8	9,86	1,33	9,81	5,32
9	2,29	2,63	6,13	1,07

Na figura II.15 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 4 da extração em Soxhlet para as rolhas de cortiça (Fig.III.1).

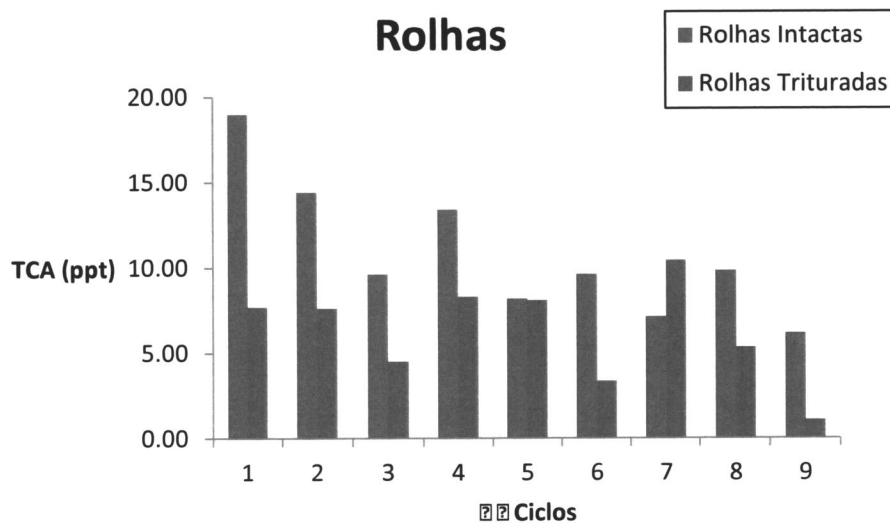


Figura II.15. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em rolhas no ensaio 4 da extração em Soxhlet.

Na figura II.16 são apresentados os resultados obtidos no ensaio 4 da extração em Soxhlet para os discos de cortiça (Fig.III.1).

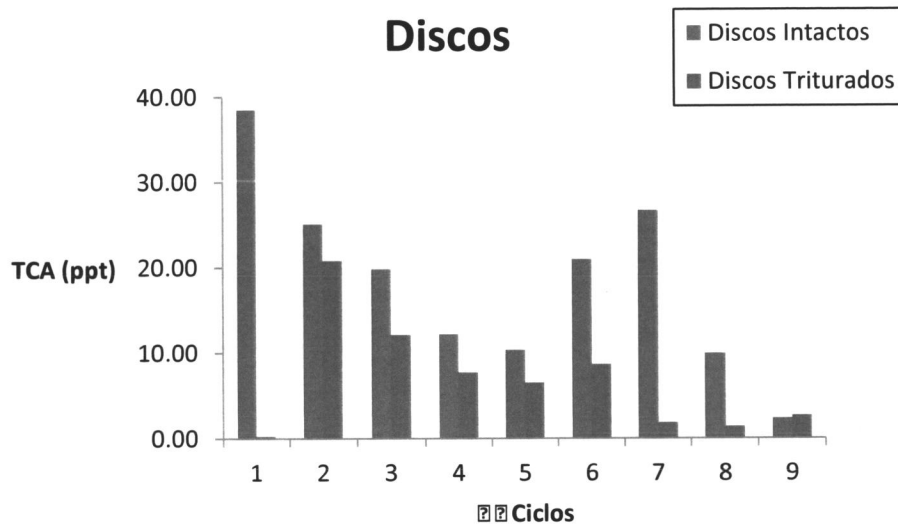


Figura II.16. Representação gráfica dos resultados obtidos para a quantificação de TCA em discos no ensaio 4 da extração em Soxhlet.



No ensaio 4 testou-se novamente o efeito do aumento da percentagem do álcool, de 12 para 20%, no solvente de extracção, mas com substituição contínua de solvente a cada ciclo, eliminando qualquer possível efeito de saturação do solvente.

A análise das figuras II.15 e II.16 permite verificar que os discos, à semelhança do caso anterior, apresentam valores de TCA superiores. Na comparação de valores entre as amostras intactas e trituradas, verifica-se que as rolhas não apresentam uma grande discrepância de valores de TCA, que se pode dever à superior homogeneidade deste material. No caso dos discos verifica-se que quando estes são triturados *libertam* quantidades substancialmente inferiores de TCA quando comparados com os discos intactos, o que se pode dever a uma superior decomposição térmica do TCA devido a uma maior área de extracção em contacto com o solvente.

No caso das rolhas e dos discos, após 9 ciclos os valores de TCA atingem valores mínimos, mas no caso dos discos, existem algumas oscilações de valores de concentração de TCA. Possivelmente a contínua substituição do solvente de extracção aumenta a permeabilização neste tipo de estrutura, promovendo o acesso do solvente a um maior numero locais de acumulação de TCA.

### **II.1.3. Sistemas com Carvão Activado**

Durante a realização dos ensaios o pH foi verificado em todas as etapas, mantendo-se sempre em valores aproximados a pH 5.

Em todos os ensaios realizados com a presença de carvão activado foram usados apenas discos inteiros de cortiça.

## Ensaio 1

Os resultados obtidos em cromatografia gás-líquido estão descritos na tabela II.9 e representados na figura II.17.

Tabela II.9. Valores de concentração de TCA (ppt) nas alíquotas recolhidas num sistema de Soxhlet contendo solução hidroalcoólica 12% e carvão activado.

Nº Ciclos	Concentração TCA (ppt)
1	0,80
2	0,56
3	0,50
4	0,73
5	0,58

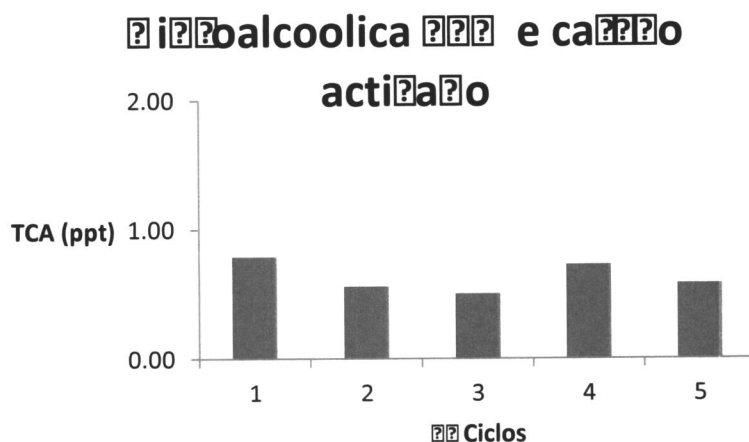


Figura II.17. Representação gráfica da concentração de TCA (ppt) a cada ciclo de soxhlet com solução hidroalcoólica 12% na presença de carvão activado.

A amostra de discos que deu resultado ao gráfico da figura II.17, apresentava uma concentração inicial de 7,67 ppt e após o tratamento em Soxhlet 6,42 ppt.

## Ensaio 2

Os resultados obtidos para o ensaio 2, onde se testou a presença de carvão activado num sistema de soxhlet com solução hidroalcoólica a 20%, encontram-se descritos na tabela II.10 e representados na figura II.18.

Tabela II.10. Valores de concentração de TCA (ppt) nas alíquotas recolhidas num sistema de Soxhlet contendo solução hidroalcoólica 20% e carvão activado

Nº Ciclos	Concentração TCA (ppt)
1	13,38
2	10,57
3	12,68
4	11,97
5	15,59

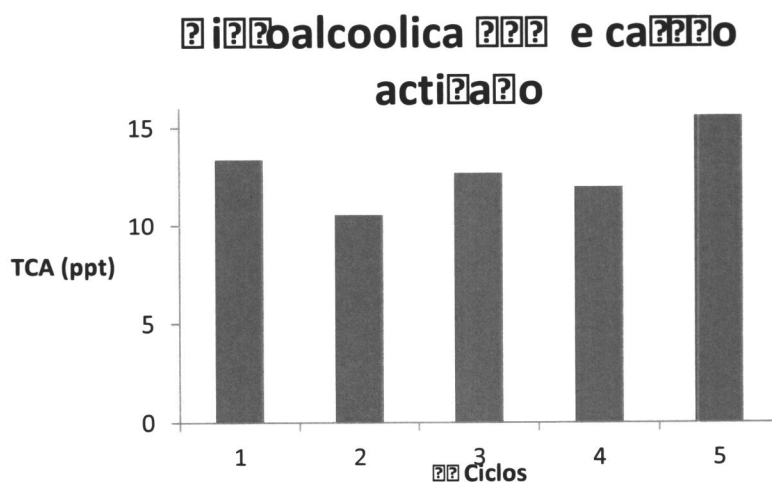


Figura II.18. Representação gráfica da concentração de TCA (ppt) a cada ciclo de soxhlet com solução hidroalcoólica 20% na presença de carvão activado

Para melhor avaliação da eficiência do ensaio foi feita uma maceração (solução hidroalcoólica 12%; 24h) aos discos antes e depois do ensaio de Soxhlet e medido o

valor da sua concentração de TCA. Os discos antes do Soxhlet apresentavam uma concentração de 5,77 ppt e após o Soxhlet 2,57 ppt.

As discrepâncias entre os pontos para um mesmo ensaio, levam a crer que após cada tratamento de Soxhlet as superfícies de contacto podem variar com a abertura dos canais lenticulares da cortiça.

### **Ensaio 3**

No ensaio 3, testou-se a presença de carvão activado num sistema de extracção simples, com solução hidroalcoólica a 20%, visando a análise da eficácia do carvão activado numa extracção a frio. A alíquota analisada após o período de extracção simples, e obteve-se uma concentração de TCA de 17.95 ppt. Após extracção com carvão activado, a amostra passou para valores de concentração de TCA (ppt) não detectáveis.

#### **II.1.4. Isolamento de metabolitos secundários**

No decurso dos ensaios com Soxhlet observou-se que, após o primeiro ciclo havia a formação de flóculos brancos em suspensão (Fig.II.19). O fenómeno ocorre tanto para as rolhas como para os discos. Procedeu-se à separação desses flocos e à sua análise por Ressonância Magnética Nuclear, com o intuito de identificar o possível metabolito secundário extraído.

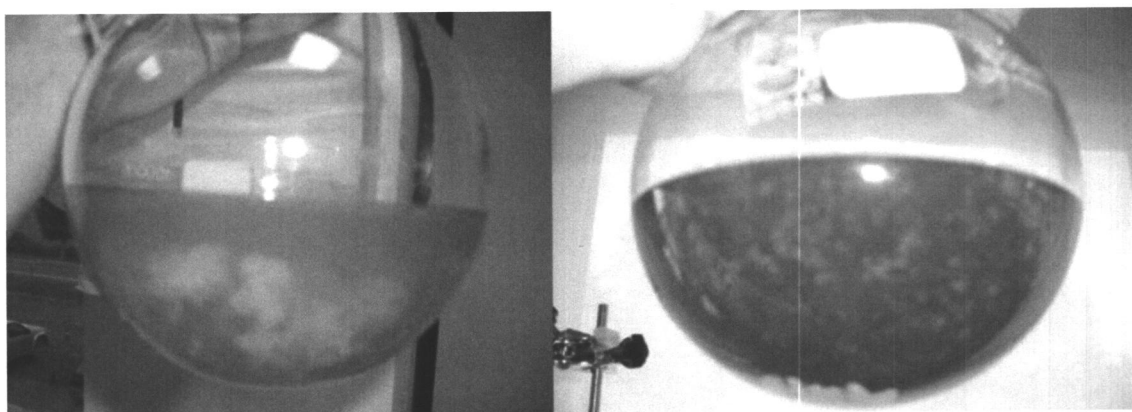


Figura II.19. Flocculação verificada na solução hidroalcoólica após o primeiro ciclo de soxhlet.

Os espectros de RMN obtidos (Fig. II.20 e Fig.II.21) permitem verificar que os flóculos obtidos são constituídos maioritariamente por ácido betulínico, de acordo com os dados descritos na literatura. [32-35].

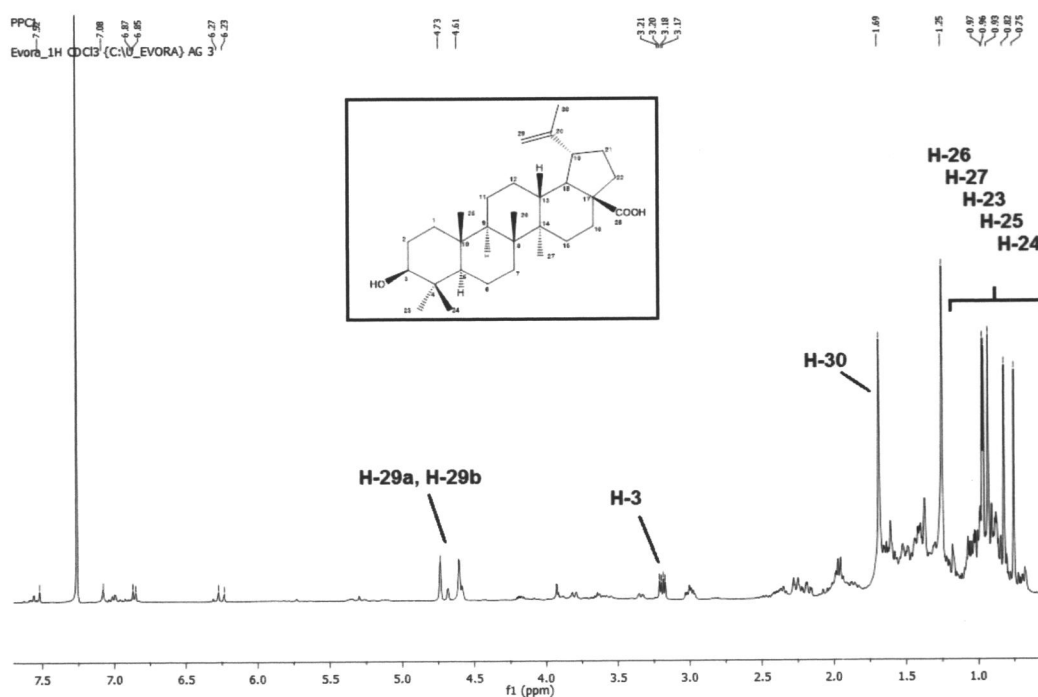


Figura II.20. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>).

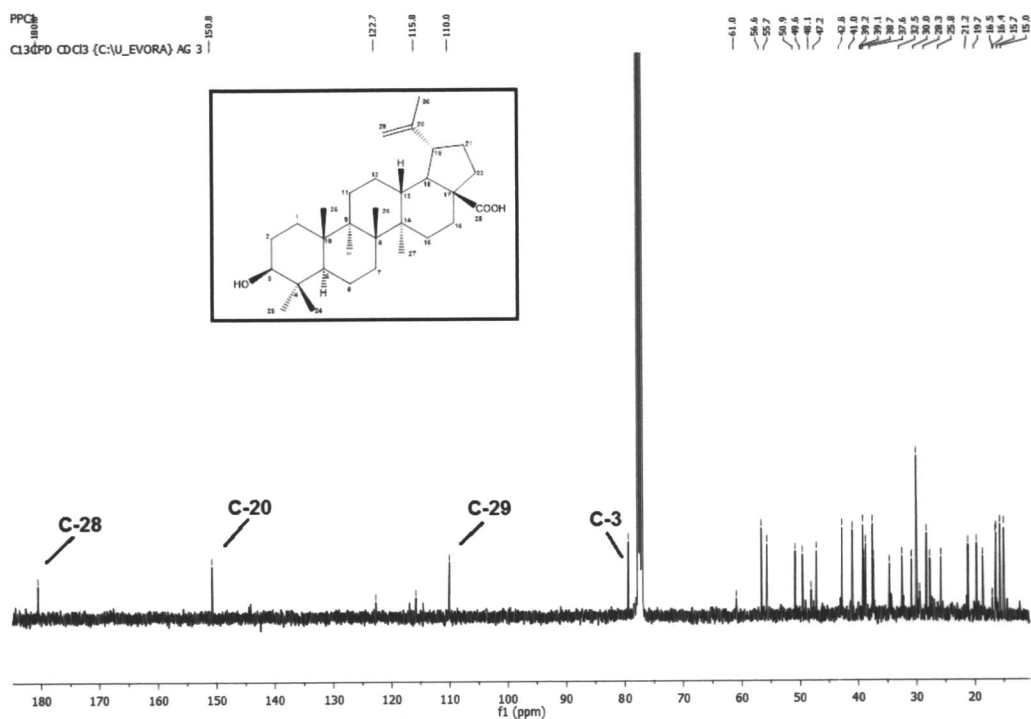


Figura II.21 Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ).

Na tabela II.11 são apresentados os desvios químicos de sinais de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN característicos do ácido betulínico.

Tabela II.11.  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) do ácido betulínico.

Posição	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	--	39,1
2	--	27,7
3	3,19	79,4
4	--	39,2
5	--	55,7
6	--	18,6
7	--	34,7
8	--	41,0
9	--	50,9
10	--	37,6
11	--	21,2

12	--	25,8
13	--	38,7
14	--	42,8
15	--	30,9
16	--	32,5
17	--	56,6
18	--	47,2
19	--	49,6
20	--	150,8
21	--	29,5
22	--	37,4
23	0,93	28,3
24	0,75	15,7
25	0,82	16,5
26	0,97	16,4
27	0,96	15,0
28	--	180,6
29a	4,61	110,0
29b	4,74	
30	1,69	19,7

## CAPÍTULO III

# Parte Experimental





## III.1. Aparelhagem e Condições Experimentais

### III.1.1 Materiais

- Vials de 20 mL
- Tampas de rosca metálica
- Septos PTFE/Silicone
- Aparato de Soxhlet
- Agitadores magnéticos
- Esferas de vidro
- Material de vidro de medição diverso
- Frascos de maceração 500 mL

### III.1.2 Equipamentos

- Purificador de água *Thermo Scientific Smart2pure*
- Balança de precisão *Mettler Toledo PR1203*
- Micropipetas automáticas de volume variável (10-10000 $\mu$ L) *Pipetman Classic<sup>TM</sup>*
- 2 Placas de agitação e aquecimento (*Heidolph MR 3001 e Heidolph MR 2002*)
- Medidor pH (*pH Meter 3310 Jenway*)
- Manta de aquecimento (*Electromantle Electrothermal*)

### III.1.3 Reagentes, solventes e adsorventes

Tabela III.1. Reagentes utilizados no trabalho experimental.

Produto	CAS	Pureza	Marca
2,4-6-TCA	87-40-1	99%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
2,3,6-TCA	50375-10-5	99%	Fluka
Etanol	64-17-5	96%	Manuel Vieira & C <sup>a</sup> , Sucrs. Lda
NaCl	7647-14-5		
Metanol	67-56-1	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
n-Hexano	110-54-3	99%	Ensure <sup>®</sup> ACS
Carvão Activado	--	--	Riedel- deHaën <sup>®</sup>

### III.1.4 Amostras de cortiça

Foram utilizados neste estudo rolhas naturais (45x24mm) e discos de (26x5mm) gentilmente cedidos pela empresa Amorim Florestal (Fig.III.1). Ambos foram utilizados sem que tenham sido efectuados quaisquer processos de lavagem ou tratamento da sua superfície.

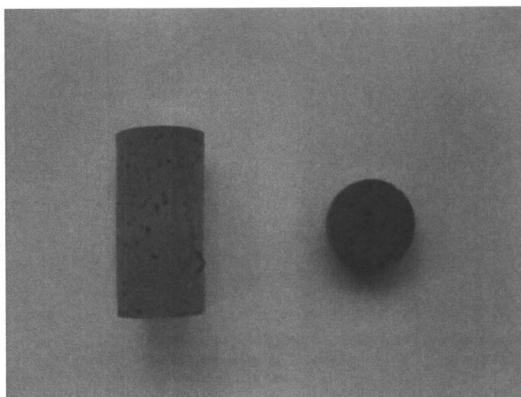


Figura III.1. Exemplo de discos e rolhas utilizados no trabalho experimental.

A amostragem foi realizada de forma completamente aleatória, para avaliar o processo de extracção.

O cálculo do número de discos e rolhas por amostra é calculado de modo a que a área de superfície em contacto com as soluções hidroalcoólicas seja o mesmo em ambas.

De acordo com as medidas de rolhas e discos acima descritos pelo cálculo da área total (EQ.1) concluímos que temos de utilizar 10 rolhas e 28 discos para termos a mesma proporção.

$$A_{sup} = 2\pi r^2 + 2\pi r h \quad (\text{EQ.1})$$

### III.1.5 Condições experimentais

As análises de cromatografia gás-liquído foram realizadas num equipamento *Varian CP-3800 Gas Chromatograph*, equipado com um detector de captura de electrões (ECD) e uma fonte radioactiva de  $^{63}\text{Ni}$  (15 mCi). Utilizou-se uma coluna capilar com 30 m de comprimento, um diâmetro interno de 250  $\mu\text{m}$  e uma velocidade de arraste  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Recorreu-se a um sistema de injeção automática COMBIPAL (CTC Analytics PALsystem). As condições de operação foram as seguintes: temperatura de injeção  $270^\circ\text{C}$ , temperatura do detector  $280^\circ\text{C}$ . Utilizou-se hélio como gás de arraste e azoto como gás makeup (ambos *Alphagaz<sup>TM</sup>*). O programa de temperaturas do forno parte de uma temperatura inicial de  $90^\circ\text{C}$  até se atingir os  $280^\circ\text{C}$ .

A quantidade de 2,4,6-TCA foi calculada com recurso a calibração com padrão interno, neste caso, 2,3,6-TCA.

Os pontos da recta de calibração foram efectuados em duplicado e as amostras em análise em triplicado. Os valores usados são sempre valores médios.

Na preparação das macerações utilizaram-se frascos de vidro de 500mL. O vidro é escolhido em detrimento de outros materiais, como o plástico, pois não apresenta capacidade para adsorver TCA. Cada frasco foi preenchido com 28 discos de 26mm ou

10 rolhas de 45x24mm, mantendo constante nas amostras a área de superfície em contacto com a solução.

Após o período de extracção simples ou exaustiva, fizeram-se recolha de alíquotas de 10mL para posterior análise em SPME/GC-ECD.

Em vials de 20mL foram adicionados aproximadamente 2g de NaCl, 10 mL de amostra e 100 $\mu$ L de padrão interno (2,3,6-TCA) à concentração de 2 ppb. Uma vez preparada a amostra, o vial foi fechado com uma capsula metálica vedada com um septo PTFE/Silicone e colocados no suporte automático para análise.

As concentrações analisadas não dizem respeito à concentração total de 2,4,6-TCA existente na rolha ou disco, mas é sim uma quantificação da quantidade de TCA em solução (*releasable* TCA), isto é, a quantidade de 2,4,6-TCA que estará em equilíbrio entre o sólido (cortiça) e a matriz líquida (solução hidroalcoólica). Este método foi validado pela *International Organization for Standardization*, norma ISO20752.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão ( $^1\text{H}$ -RMN) e de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN), foram registados a 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e a 100.61 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), num espectrómetro Bruker Avance III HD 400. Usou-se o deuteroclorofórmio como solvente. Os dados obtidos são indicados em valores de desvio químico ( $\delta$ , em ppm.).

A análise de soluções bem como todo o trabalho experimental foram realizadas no laboratório de Investigação e Desenvolvimento do Grupo Amorim (AFL-Salteiros). A ressonância magnética nuclear foi realizada na Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora.

## III.2. Procedimento Experimental

### III.2.1. Extração Simples

Todos os ensaios foram realizados para rolhas (10) e discos (28) intactos e de seguida para os mesmos triturados. Desde modo, cada ensaio engloba outros quatro.

Tabela III.2.Descrição resumida do procedimento para os ensaios de extração simples.

Ensaio 1	Ensaio 2
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura ambiente</li> <li>• Agitação simples</li> <li>• Sistema extractor (H<sub>2</sub>O/EtOH (88:12))</li> <li>• Volume total: 500 mL</li> <li>• Duração total: 120h (5 dias)</li> <li>• Avaliação TCA: ciclos 24h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura ambiente</li> <li>• Agitação simples</li> <li>• Sistema extractor (H<sub>2</sub>O/EtOH (80:20))</li> <li>• Volume total: 500 mL</li> <li>• Duração total: 120h (5 dias)</li> <li>• Avaliação TCA: ciclos 24h</li> </ul>
Ensaio 3	Ensaio 4
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura ambiente</li> <li>• Agitação simples</li> <li>• Sistema extractor (H<sub>2</sub>O/EtOH (88:12))</li> <li>• Volume total: 500 mL</li> <li>• Duração total: n dias</li> <li>• Avaliação TCA: ciclos 24h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura ambiente</li> <li>• Agitação simples</li> <li>• Sistema extractor (H<sub>2</sub>O/EtOH (80:20))</li> <li>• Volume total: 500 mL</li> <li>• Duração total: n dias</li> <li>• Avaliação TCA: ciclos 24h</li> </ul>

As amostras de discos e rolhas foram colocadas em frascos de 500mL de vidro aos quais se adicionou 500mL de solução hidroalcoólica. Depois de garantir que todo o

material estava imerso iniciou-se a maceração com o auxílio de placas de agitação ( $\pm 300$  rpm), à temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ).

No ensaio 1 utilizou-se como sistema extractor uma solução hidroalcoólica  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (88:12). A cada intervalo de 24 horas foi retirada uma alíquota para análise, repetindo-se o processo durante 5 dias (120h), sem renovação do solvente durante este período.

O ensaio 2 foi realizado com o mesmo procedimento do ensaio 1, contudo utilizou-se um sistema *mais orgânico*, isto é uma solução  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (80:20).

No ensaio 3, utilizou-se como sistema extractor  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (88:12), mas a cada intervalo de 24 horas foi retirada uma alíquota para análise, trocando-se o solvente anterior pela mesma quantidade de solvente *fresco*. As recolhas efectuaram-se em ciclos de 24 horas, durante vários dias.

O ensaio 4 foi realizado com o mesmo procedimento do ensaio 3, contudo utilizou-se o sistema mais orgânico, isto é uma solução  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (80:20).

Estes procedimentos foram repetidos para as mesmas amostras trituradas. Com o auxílio de uma tesoura, cortaram-se os discos e as rolhas em pedaços de tamanho mais ou menos uniforme (5mm).

As alíquotas recolhidas (10mL) nos ensaios 1, 2, 3 e 4 foram analisadas por cromatografia gás-líquido a fim de avaliar o seu teor em 2,4,6-TCA. Da análise dos espectros obteve-se o valor das concentrações de 2,4,6-TCA em partes por trilião (ppt). Os resultados obtidos (valores médios), são referidos nas tabelas II.1, II.2, II.3 e II.4, respectivamente.

### III.2.2. Extração em Soxhlet

Todos os ensaios são realizados para rolhas (10) e discos (28) intactos e de seguida para os mesmos triturados. Desde modo, cada ensaio engloba outros quatro.

Tabela III.3. Descrição resumida do procedimento para os ensaios de extração simples.

Ensaio 1	Ensaio 2
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema extractor (H<sub>2</sub>O/EtOH (88:12))</li> <li>• Volume total: 500 mL</li> <li>• Duração total: 5 ciclos</li> <li>• Avaliação TCA: por ciclo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema extractor (H<sub>2</sub>O/EtOH (80:20))</li> <li>• Volume total: 500 mL</li> <li>• Duração total: 5 ciclos</li> <li>• Avaliação TCA: por ciclo</li> </ul>
Ensaio 3	Ensaio 4
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema extractor (H<sub>2</sub>O/EtOH (88:12))</li> <li>• Volume total: 500 mL</li> <li>• Duração total: n ciclos</li> <li>• Avaliação TCA: por ciclo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema extractor (H<sub>2</sub>O/EtOH (80:20))</li> <li>• Volume total: 500 mL</li> <li>• Duração total: n ciclos</li> <li>• Avaliação TCA: por ciclo</li> </ul>

As alíquotas recolhidas nos ensaios 1, 2, 3 e 4 foram analisadas por cromatografia gás-líquido a fim de avaliar o seu teor em 2,4,6-TCA. Da análise dos espectros obteve-se o valor das concentrações de 2,4,6-TCA em partes por trilião (ppt). Os resultados obtidos (valores médios) são referidos nas tabelas II.5, II.6, II.7 e II.8, respectivamente.

### **III.2.3. Sistemas de extracção em soxhlet na presença de carvão activado**

#### **Ensaio 1**

Pesou-se aproximadamente 1,0g de carvão activado que se adicionou a 500mL de solução hidroalcoólica 12%, no balão de Soxhlet. O ensaio foi realizado com 28 discos de cortiça e foram efectuados 5 ciclos de Soxhlet consecutivos sem troca de solvente entre eles. Por cada ciclo foi recolhida uma alíquota para análise.

#### **Ensaio 2**

Pesou-se aproximadamente 1,0g de carvão activado e juntou-se, no balão de Soxhlet a 500mL de solução hidroalcoólica 20%. O ensaio foi realizado com 28 discos de cortiça e foram efectuados 5 ciclos de Soxhlet consecutivos sem troca de solvente entre eles. Por cada ciclo foi recolhida uma alíquota para análise.

#### **Ensaio 3**

Pesou-se aproximadamente 1,0g de carvão activado e juntou-se, num frasco de 500mL com 500mL de solução hidroalcoólica a 20%. Deixou-se por 24 horas à temperatura ambiente.



## IV. Conclusões

Os processos de redução/eliminação de TCA em amostras de cortiça foram avaliados com recurso a sistemas de extracção simples e exaustiva sólido-líquido (Soxhlet), em diferentes condições experimentais (sistema extractor de H<sub>2</sub>O/EtOH (88:12 e 80:20), com e sem substituição de solvente, presença e ausência de adsorvente, etc);

Obtiveram-se excelentes correlações entre os diferentes tipos de sistemas extractores, que permitiram uma melhor compreensão do comportamentos deste tipo de materiais quando sujeitos diferentes processos extractivos.

A extracção simples, com renovação de solvente, sistema extractor H<sub>2</sub>O/EtOH (80:20), revelou excelentes resultados, com a diminuição da quantidade de TCA nas amostras para valores abaixo do limiar de percepção, para os ensaios com carvão activado.

A extracção exaustiva sólido-líquido (Soxhlet) revelou igualmente resultados interessantes quanto ao comportamento das amostras no processo extractivo. Como este tipo de extracção implica o uso de temperaturas mais elevadas, existe a possibilidade real de uma maior abertura dos canais lenticulares da cortiça, o que aumenta as superfícies de contacto com o solvente, o que faz com que as quantidades de TCA em solução oscilem nos vários ciclos de extracção.

O carvão activado revelou uma enorme capacidade adsorvente para o TCA o que potencia futuras aplicações deste adsorvente associado a sistemas extractivos.

O aumento da percentagem de etanol no sistema extractor revelou-se de extrema importância, pois além de permitir a extracção eficaz de TCA das amostras pressupõe que após o tratamento, as rolhas e os discos não *libertem* TCA quando colocados em contacto com soluções de menores concentrações alcoólicas (vinhos, espumantes).

## V. Perspectivas Futuras

Terminado este trabalho experimental, “Avaliação de Processos de Redução/Eliminação de TCA em amostras de cortiça”, e olhando para os resultados obtidos, verifica-se a importância de continuar a investigar sobre este assunto, dada a sua importância para a indústria corticeira. Numa continuidade a este trabalho, as seguintes linhas poderão ser seguidas:

- Optimização do processo de extracção simples com renovação de solvente para o sistema H<sub>2</sub>O/MeOH (80:20).
- Adaptação de um processo de filtração/purificação do solvente de extracção com recurso a carvão activado.

De acordo com o Estado de Arte apresentado no início deste trabalho, é necessário que de futuro se consigam otimizar os processos de Redução/Eliminação de TCA de modo a que estes deixem de ser apenas eficientes à superfície e passem a ser eficientes até ao interior da cortiça.

## VI. Referências Bibliográficas

- [1] Estudo de Caracterização sectorial. **2011**. APCOR.
- [2] Gil, L.; *Cortiça, da produção à aplicação*. **2005**. Câmara Municipal do Seixal
- [3] Sampaio, G.; *Flora Portuguesa*. 3ª Ed. Instituto Nacional de Investigação Científica. **1988**.
- [4] Pereira, H.; *Cork: Biology, Production and Uses*. 1<sup>ST</sup> Ed. Elsevier. **2007**
- [5] Relatório de Sustentabilidade. Corticeira Amorim, S.G.P.S., S.A. **2010**
- [6] Bugalho, M.; Caldeira, M.; Pereira, J.; Aronson, J.; Pausas, J.; *Frontiers in Ecology and the Environment*. **2011**. 9, 278-286.
- [7] Pereira, H.; *Wood Sci. Technol.* **1988**. 22, 211-218
- [8] Bureau, C.I., *Cortiça – História*. **2010**
- [9] Carrot, P.; Carrot, M.; Lima, R.; *Carbon*. **1999**. 37, 515-517
- [10] Carrot, P.; Carrot, M.; Mourão, P.; Lima, R.; *Adsorption Science and Technology*. **2003**. 21, 669-681
- [11] Fernandes, A.; *J.Agric. Food Chem.* **2009**. 57, 11154-11160
- [12] Sousa, A.; Pinto, P.; Silvestre, A.; Neto, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**. 54, 6888-6893
- [13] Castola, V.; Biguelli, A.; Rezzi, S.; Melloni, G.; Gladiali, S.; Desjobert, J.; Casanova, J.; *Industrial Crops and Products*. **2002**. 15, 15-22
- [14] <https://www.sigmaaldrich.com/portugal.html> (consultado a 28-8-2014)
- [15] Santo, M.; Bragança, M.; Casimiro, P. *Silva Lusitana*. **2005**. 13(1), 75-93
- [16] Buser, H.; Zanier, C.; Tanner, H.; *J.Agric. Food Chem.* **1982**. 30, 359-362

- [17] Aung, L.; Smilanick, J.; Vail, P.; Hartsell, P.; Gomez, E.; *J. Agric. Food Chem.* **1996.** 44, 3294-3296
- [18] Olivella, M.; Caixach, J.; Planas, C.; Oliveras, A.; Jové, P.; *Chemosphere.* **2012.** 86, 754-758
- [19] Allard, A.; Remberger, M.; Neilson, A.; *Applied and Environmental Microbiology* . **1987.** 839-845
- [20] Oliveira, J.; Silveira, L.; *Vivências.* **2011.** 7(12), 91-104
- [21] Malheiro, A.; *Análise de Cloroanisóis e Clorofenóis em Solos de Montado de Sobro com Vista à Avaliação do Risco de Contaminação da Cortiça com 2,4,6-Tricloroanisol.* Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química. FEUP. **2010**
- [22] Chatonnet, P.; Bonnet, S.; Boutou, S.; Labadie, M; *J. Agric. Food Chem.* **2004.** 52, 1255- 1262
- [23] Macku, C.; Gonzalez, L.; Schleussner, C.; Mesquita, A.C.; Herwatt, J.W.; Kirch, L.C.; Schwartz, R.J.; *J. Agric. Food Chem.*, **2009.** 57(17), 7962-7968
- [24] Instituto Superior Técnico de Lisboa & Cork Supply Portugal, S.A. **2004.** Patente 1 444 075 B1
- [25] Howland, P.R.; Pollnitz, A.P.; Liacopoulos, D.; Mclean, H.J.; Sefton, M.A.; *Aus. J. Grape Wine Res.* **1997.** 3(3), 141-145.
- [26] Zat, M.; Benetti, A.; *Eng Sanit Ambient.* **2011.** 16(4), 353-360
- [27] Pereira, C.; Gil, L.; *Silva Lusitana.* **2006.** 14(1), 101-111
- [28] Fleischer, K.; **1980.** Patente DE3035646
- [29] Zucchini, G.; Donati, A.; **1993.** Patente PT89361
- [30] Taylor, M.; Young T.; Butzke, C.; Ebeler, S.; *J. Agric. Food Chem.* **2000,** 48, 2208-2211
- [31] Hervé, E.; Price, S.; Burns, G.; Weber, P.; *ETS Laboratories.* **2000**

- [32] Mahato, S.; Kundu, A., *Phytochemistry*, **1994**, *37*, 1517–1575.
- [33] Siddiqui, S.; Hafeez, F.; Begum, S.; Siddiqui, B., *J. Nat. Prod.*, **1988**, *51*, 229–233.
- [34] Otsuka, H.; Fujioka, S.; Komiya, T.; Goto, M.; Hiramatsu, Y.; Fujimora, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **1981**, *29*, 3099–3104.
- [35] Sholichin, M.; Yamasaki, K.; Kasai, R.; Tanaka, O., *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, *28*, 1006–1008.
- [36] Machado, A.; Desenvolvimento de membranas catalíticas poliméricas bifuncionais: aplicações à síntese da cânfora. Dissertação de Doutoramento em Engenharia Química e Bioquímica. FCT-UNL. **2013**
- [37] Morrison, R.; Boyd, R.; *Química Orgânica*. 13<sup>a</sup> Ed. Fundação Calouste Gulbenkian. **1996**
- [38] Fonseca, A.; Brazinha, C.; Pereira, H.; Crespo, J.; Teodoro, O.; *J. Agric. Food Chem.* **2013**. *61*, 9672-9679
- [39] Dias, S.; Valente, D.; Abreu, J.; *Grasas e Aceites*. **2003**. *54*(4),378-383

