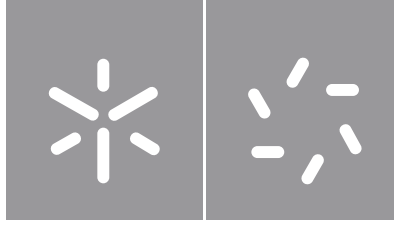


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Margarida Lago Lima

**Separação, Identificação e Caracterização dos compostos neutros da Pitch por HPLC-MS, ESI-MS/MS, GC-MS, FTIR-ATR e RMN e Avaliação da sua Atividade Antioxidante e Antibacteriana**





**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Margarida Lago Lima

**Separação, Identificação e Caracterização dos compostos neutros da Pitch por HPLC-MS, ESI-MS/MS, GC-MS, FTIR-ATR e RMN e Avaliação da sua Atividade Antioxidante e Antibacteriana**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação do  
**Professor Doutor Pier Parpot**  
e da  
**Engenheira Maria José Caridade Costa Rego**

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

### ***Licença concedida aos utilizadores deste trabalho***



**Atribuição**

**CC BY**

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## **Agradecimentos**

Gostaria de começar por agradecer ao Doutor Pier Parpot e à Engenheira Maria Rego, pela orientação fornecida ao longo do estágio, conhecimentos transmitidos, disponibilidade que demonstraram em responder a todas as minhas dúvidas e por todas as sugestões de correções que fizeram acerca do meu trabalho.

Quero agradecer o Doutor Davide Gameiro por disponibilizar as *pitch*, o material de estudo deste trabalho, e o Engenheiro Nuno Costa pela disponibilidade que demonstrou em ler a minha dissertação e dar sugestões de correções.

Agradeço também a Doutora Susana Costa por toda a ajuda que me forneceu ao longo deste trabalho e a Mestre Ana Teixeira pela realização dos ensaios de atividade antioxidante e antibacteriana da *pitch*.

Obrigada a todas as pessoas da empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A. por me receberem tão bem, especialmente a Engenheira Isabel Faria e a Mestre Sara Costa por toda a amizade e por sempre se mostrarem disponíveis para me ajudar ao longo do estágio.

Agradeço ainda a minha família pelo apoio incondicional e pela paciência demonstrada ao longo do meu percurso académico. Um agradecimento especial aos meus amigos Carolina Taborda e Hugo Alvarães pelo apoio e por terem tornado o mestrado mais divertido. Obrigada por todas as gargalhadas e momentos que nunca vou esquecer.

Muito obrigada a todos.

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

# **Separação, Identificação e Caracterização dos compostos neutros da *Pitch* por HPLC-MS, ESI-MS/MS, GC-MS, FTIR-ATR e RMN e Avaliação da sua Atividade Antioxidante e Antibacteriana**

## **Resumo**

A resina é um líquido viscoso produzido pelos pinheiros como um mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos, sendo um dos seus componentes a colofónia. A colofónia é a fração sólida e não volátil da resina, sendo a principal matéria-prima utilizada pela empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A.. Este material é constituído maioritariamente por diversos ácidos resínicos e a empresa foca-se na transformação química desta fração acídica de modo a dar origem a vários produtos utilizados por diversas indústrias químicas. Para além dos ácidos resínicos, na composição da colofónia é possível encontrar compostos neutros em pequenas quantidades. A *pitch* consiste no resíduo resultante do processo de destilação molecular (refinação) da colofónia para obter a colofónia *water white*, uma colofónia transparente de elevada pureza. A *pitch* contém uma quantidade de ácidos resínicos bastante menor relativamente à colofónia *water white* e maior quantidade de compostos neutros. Existe a possibilidade dos compostos neutros da *pitch* apresentarem atividade antioxidante devido a se verificar uma degradação de cor mais significativa da colofónia *water white* à medida que a temperatura aumenta em comparação com a colofónia. Isto indica que a colofónia possui certos compostos com resistência à oxidação e que estes podem ter constituído a composição da *pitch* durante o processo de refinação. Por este motivo, é de interesse avaliar a atividade antioxidante dos compostos neutros deste material. Além do mais, uma vez que a resina é produzida como um mecanismo de defesa, os compostos neutros presentes na *pitch* podem vir a demonstrar atividade antimicrobiana.

Neste estudo pretendeu-se separar, identificar e caracterizar os compostos neutros presentes na *pitch* proveniente de duas espécies de pinheiro - *Pinus elliotii* e *Pinus pinaster* - através das técnicas de ionização por eletrospray acoplada a espetrometria de massa em tandem (ESI-MS/MS), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espetrometria de massa (HPLC-MS), cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (GC-MS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com acessório de refletância total atenuada (FTIR-ATR) e ressonância magnética nuclear (RMN). Também se avaliou o impacto destes compostos no desempenho das colofónias através da realização de análises de qualidade da *pitch* e a sua atividade antioxidante e antibacteriana.

**Palavras-chave:** colofónia, compostos neutros, GC-MS, HPLC-MS, *pitch*

# **Separation, Identification and Characterization of Pitch's neutral compounds by HPLC-MS, ESI-MS/MS, GC-MS, FTIR-ATR and RMN and Evaluation of their Antioxidant and Antibacterial Activity**

## **Abstract**

Resin is a viscous liquid produced by pine trees as a defense mechanism against herbivores and pathogens, one of its components being rosin. Rosin is the solid and non-volatile fraction of the resin, being the main raw material used by the company Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A.. This material consists mainly of different resin acids and the company focuses on the chemical transformation of this acidic fraction in order to give rise to various products used by various chemical industries. In addition to resin acids, in the composition of rosin it is possible to find neutral compounds in small quantities. Pitch consists of the residue resulting from the process of molecular distillation (refining) of rosin to obtain water white rosin, a transparent rosin of high purity. Pitch contains a much smaller quantity of resin acids than water white rosin and a greater quantity of neutral compounds. There is a possibility that the neutral compounds of the pitch have antioxidant activity due to a more significant color degradation of the water white rosin as the temperature increases compared to the rosin. This indicates that the rosin has certain compounds with oxidation resistance and that these may have constituted the pitch composition during the refining process. For this reason, it is of interest to evaluate the antioxidant activity of the neutral compounds of this material. Furthermore, since the resin is produced as a defense mechanism, the neutral compounds present in the pitch may demonstrate antimicrobial activity.

This study aimed to separate, identify and characterize the neutral compounds present in the pitch from two pine species - *Pinus elliotii* and *Pinus pinaster* - through electrospray ionization techniques coupled with tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS), high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance accessory (FTIR-ATR) and nuclear magnetic resonance (RMN). It was also evaluated the impact of these compounds on the performance of rosins by performing analyzes of the quality of the pitch and its antioxidant and antibacterial activity.

**Keywords:** rosin, neutral compounds, GC-MS, HPLC-MS, pitch



## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xxi</b>
<b>Capítulo 1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1) Contextualização do trabalho.....	2
1.2) Objetivos do estágio .....	3
<b>Capítulo 2. Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A.</b> .....	<b>4</b>
<b>Capítulo 3. Enquadramento teórico</b> .....	<b>8</b>
3.1) Género <i>Pinus</i> .....	9
3.1.1) <i>Pinus pinaster</i> .....	9
3.1.2) <i>Pinus elliottii</i> .....	10
3.2) Goma .....	10
3.3) Terebentina .....	12
3.4) Colofónia .....	12
3.5) <i>Pitch</i> .....	20
3.6) Parâmetros de controlo de qualidade da colofónia.....	22

3.6.1) Índice de acidez.....	22
3.6.2) Cor.....	23
3.6.3) Viscosidade.....	24
3.6.4) Cristalização.....	24
3.6.5) Ponto de amolecimento.....	25
3.6.6) Ponto de turvação.....	26
3.7) Técnicas de caracterização.....	27
3.7.1) ESI-MS/MS.....	27
3.7.2) HPLC-MS.....	31
3.7.3) GC-MS.....	35
3.7.4) FTIR-ATR.....	41
3.7.5) RMN.....	44
3.8) Ensaio DPPH.....	46
3.9) Ensaio da microdiluição.....	48
<b>Capítulo 4. Parte experimental.....</b>	<b>49</b>
4.1) Análises da qualidade de amostras de <i>pitch</i> .....	50
4.1.1) Material, equipamento e reagentes.....	50
4.2) Obtenção das frações insaponificáveis de <i>pitch</i> .....	52
4.2.1) Material, equipamento e reagentes.....	52
4.2.2) Método experimental.....	53
4.3) Caracterização dos compostos neutros das frações insaponificáveis de <i>pitch</i> .....	56

4.3.1) ESI-MS/MS e HPLC-MS .....	57
4.3.1.1) Material, equipamento e reagentes.....	57
4.3.1.2) Métodos experimentais .....	58
4.3.2) GC-MS.....	64
4.3.2.1) Material, equipamento e reagentes.....	65
4.3.2.2) Métodos experimentais .....	66
4.3.3) FTIR-ATR.....	69
4.3.3.1) Material e equipamento.....	69
4.3.3.2) Método experimental.....	69
4.3.4) RMN .....	71
4.3.4.1) Material, equipamento e reagentes.....	71
4.3.4.2) Método experimental.....	72
4.4) Avaliação da atividade antioxidante das frações insaponificáveis de <i>pitch</i> .....	73
4.4.1) Material, equipamento e reagentes .....	73
4.4.2) Método experimental .....	73
4.5) Avaliação da atividade antibacteriana das frações insaponificáveis de <i>pitch</i> .....	75
4.5.1) Material, equipamento e reagentes .....	76
4.5.2) Método experimental .....	76
<b>Capítulo 5. Apresentação e discussão de resultados .....</b>	<b>80</b>
5.1) Análises da qualidade de amostras de <i>pitch</i> .....	81
5.2) Caracterização dos compostos neutros das frações insaponificáveis de <i>pitch</i> .....	82

5.2.1) ESI-MS/MS e HPLC-MS .....	82
5.2.2) GC-MS .....	130
5.2.3) FTIR-ATR .....	140
5.2.4) RMN .....	145
5.3) Avaliação da atividade antioxidante das frações insaponificáveis de <i>pitch</i> .....	154
5.4) Avaliação da atividade antibacteriana das frações insaponificáveis de <i>pitch</i> .....	155
<b>Capítulo 6. Conclusão .....</b>	<b>156</b>
<b>Capítulo 7. Bibliografia.....</b>	<b>160</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>171</b>
A) Procedimentos laboratoriais.....	172
A.1) Determinação do índice de acidez .....	172
A.2) Determinação da cor.....	173
A.3) Determinação da viscosidade .....	174
A.4) Determinação da cristalização .....	175
A.5) Determinação do ponto de amolecimento.....	175
A.6) Determinação do ponto de turvação .....	177
B) Fichas de segurança dos reagentes .....	178
B.1) Ficha de segurança do Hidróxido de potássio .....	178
B.2) Ficha de segurança da Fenolftaleína .....	179
B.3) Ficha de segurança do Etanol .....	180
B.4) Ficha de segurança do Tolueno.....	181

B.5) Ficha de segurança da Acetona.....	182
B.6) Ficha de segurança do <i>Test oil</i> /PKWF 6/9 AF.....	183
B.7) Ficha de segurança do Ácido acético glacial .....	183
B.8) Ficha de segurança do Acetonitrilo .....	184
B.9) Ficha de segurança do Metanol.....	185
B.10) Ficha de segurança do Éter etílico.....	186
B.11) Ficha de segurança do Hidróxido de sódio.....	187
B.12) Ficha de segurança do Clorofórmio deuterado.....	188
B.13) Ficha de segurança do Dimetilsulfóxido deuterado.....	189
B.14) Ficha de segurança do DPPH.....	190
B.15) Ficha de segurança do Hidróxido de tetrametilamónio.....	191
B.16) Ficha de segurança do Ácido abiético.....	192
B.17) Ficha de segurança do Acetato de linalilo.....	193
B.18) Ficha de segurança do 2-amino-1,3,4-octadecanotriol.....	194
B.19) Ficha de segurança do Hidrato de quercetina.....	195
B.20) Ficha de segurança do Hidrato de (+)-catequina.....	196
C) Resultados experimentais .....	197
C.1) Análises da qualidade de amostras de <i>pitch</i> .....	197
C.2) Análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS .....	198
C.3) Análises de RMN .....	211

## Lista de Abreviaturas e Siglas

- APCI – Ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric pressure chemical ionization*)
- ASTM – Métodos americanos para testes padrão (*American Standard Test Methods*)
- ATR – Refletância total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*)
- CAS – Serviço de resumos químicos (*Chemical Abstracts Service*)
- CI – Ionização química (*Chemical Ionization*)
- COOH – Carboxílico
- cP – Centipoise
- <sup>13</sup>C-RMN – Ressonância magnética nuclear de carbono-13
- Da – Dalton
- DI-SPME – Microextração em fase sólida por imersão direta (*Direct Immersion Solid-phase Microextraction*)
- DMSO D6 – Dimetilsulfóxido deuterado
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)
- DPPHH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazine*)
- DPPHr – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil reduzido num estado de equilíbrio (*Reduced 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl at Steady State*)
- EI – Impacto eletrônico (*Electron Impact*)
- EN – Norma europeia (*European Norm*)
- ESI – Ionização por eletrospray (*Electrospray Ionization*)
- ESI-MS/MS – Ionização por eletrospray acoplada a espectrometria de massa em tandem (*Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*)
- FTIR – Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*)
- FTIR-ATR – Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com acessório de refletância total atenuada (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance*)
- GC-FID – Cromatografia gasosa com detetor de ionização por chama (*Gas Chromatography With Flame Ionization Detection*)
- GC-FTIR – Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Gas Chromatography–Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)
- GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (*Gas chromatography–Mass Spectrometry*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (*High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*)

<sup>1</sup>H-RMN – Ressonância magnética nuclear de próton

HS – *Headspace*

HS-SPME/GC-MS – Microextração em fase sólida por headspace associada a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (*Headspace Solid-phase Microextraction coupled to Gas chromatography–Mass Spectrometry*)

IR – Infravermelho (*Infrared*)

ISO – Organização internacional para padronização (*International Organization for Standardization*)

KOH – Hidróxido de potássio

LB – Luria Bertani

MIC – Concentração mínima inibitória (*Minimal Inhibitory Concentration*)

MIR – Infravermelho médio (*Mid-infrared*)

MS – Espetrometria de massa (*Mass Spectrometry*)

MS/MS – Espetrometria de massa em tandem (*Tandem Mass Spectrometry*)

m/z – Razão massa-carga

N – Normalidade

NaOH – Hidróxido de sódio

NP – Norma portuguesa

PDA – Matriz de fotodíodos (*Photo Diode Array*)

PDMS – Polidimetilsiloxano

ppm – Partes por milhão

RMN – Ressonância magnética nuclear

RPLC – Cromatografia líquida de fase reversa (*Reversed Phase Liquid Chromatography*)

rpm – Rotações por minuto

SPME – Microextração em fase sólida (*Solid-phase Microextraction*)

TMS – Tetrametilsilano

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema dos diversos produtos desenvolvidos pela empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A. ....	5
<b>Figura 2:</b> Fluxograma da empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A.....	6
<b>Figura 3:</b> Recolha de goma segregada pelo corte no tronco do pinheiro. Extraído de: Resipinus Associação de Destiladores e Exploradores de Resina. <sup>14</sup> .....	11
<b>Figura 4:</b> Estruturas químicas dos hidrocarbonetos monoterpénicos mais comuns, A) $\alpha$ -pineno, B) $\beta$ -pineno e C) 3-careno. ....	12
<b>Figura 5:</b> Estruturas químicas dos ácidos do tipo abiético mais comuns, A) ácido abiético, B) ácido neoabiético, C) ácido palústrico, D) ácido levopimárico e E) ácido dehidroabiético. ....	14
<b>Figura 6:</b> Estruturas químicas dos ácidos do tipo pimárico mais comuns, A) ácido pimárico, B) ácido isopimárico e C) ácido sandaracopimárico. ....	14
<b>Figura 7:</b> Estruturas químicas dos ácidos do tipo labdano mais comuns, A) ácido lambertiânico, B) ácido mercúxico e C) ácido comúxico. ....	15
<b>Figura 8:</b> Fotografia da pitch resultante do processo de refinação da colofónia de A) <i>Pinus pinaster</i> e B) <i>Pinus elliottii</i> .....	21
<b>Figura 9:</b> Esquema das principais etapas do procedimento para a obtenção da colofónia <i>water white</i> , terpenos de elevado peso molecular e <i>pitch</i> .....	21
<b>Figura 10:</b> Equipamento habitualmente utilizado numa titulação ácido-base.....	22
<b>Figura 11:</b> Reação química ácido-base que ocorre durante a titulação de uma amostra de um derivado de colofónia com uma solução de KOH.....	23
<b>Figura 12:</b> Padrões de cor da escala de Gardner de 1963. Adaptado de: Are.na. <sup>33</sup> .....	23
<b>Figura 13:</b> Fotografia do equipamento utilizado para determinar a viscosidade.....	24
<b>Figura 14:</b> Fotografia da presença de cristais numa solução de colofónia de razão 70:30.....	25
<b>Figura 15:</b> Fotografia do equipamento utilizado para determinar o ponto de amolecimento.....	26
<b>Figura 16:</b> Gráfico dos resultados experimentais obtidos no ensaio do ponto de turvação. As curvas a amarelo, rosa e verde correspondem à variação da turvação, em %, temperatura, em °C, e velocidade de agitação, em rotações por minuto (rpm), respetivamente, ao longo do tempo.....	27
<b>Figura 17:</b> Esquema do modo de funcionamento da ESI no modo de ionização positivo. Adaptado de: So, Hu e Yao, 2013. <sup>43</sup> .....	28
<b>Figura 18:</b> Esquema do princípio da MS/MS. Adaptado de: Mellon, 2003. <sup>49</sup> .....	31



<b>Figura 19:</b> Representação esquemática dos principais componentes do equipamento de HPLC com um sistema de fase móvel de modo isocrático. Adaptado de: Verma e Santoyo, 2007. <sup>57</sup> .....	32
<b>Figura 20:</b> Representação esquemática dos principais componentes do equipamento de HPLC com um sistema de fase móvel de modo de gradiente binário. Adaptado de: Verma e Santoyo, 2007. <sup>57</sup> .....	33
<b>Figura 21:</b> Representação esquemática dos principais componentes do equipamento de cromatografia gasosa. Adaptado de: Stauffer, Dolan e Newman, 2008. <sup>44</sup> .....	36
<b>Figura 22:</b> Esquema do processo de amostragem da SPME, A) inserção do <i>holder</i> no vial da amostra e adsorção dos analitos presentes na amostra para a fibra e B) inserção do <i>holder</i> no injetor do cromatógrafo gasoso e posterior dessorção dos analitos para o injetor. Adaptado de: Sparkman, Penton e Kitson, 2011. <sup>67</sup> .....	38
<b>Figura 23:</b> Esquema do princípio da técnica de amostragem do HS estático. Adaptado de: Gong <i>et al.</i> , 2019. <sup>68</sup> .....	39
<b>Figura 24:</b> Princípio da DI-SPME. Adaptado de: Weggler <i>et al.</i> , 2020. <sup>71</sup> .....	40
<b>Figura 25:</b> Reação química de metilação.....	41
<b>Figura 26:</b> Representação esquemática do modo de funcionamento da técnica de espectroscopia de FTIR. Adaptado de: Gurumurthy e Ramesh, 2018. <sup>76</sup> .....	42
<b>Figura 27:</b> Representação esquemática do sistema de FTIR-ATR. Adaptado de: Ausili, Sánchez e Gómez-Fernández, 2015. <sup>82</sup> .....	44
<b>Figura 28:</b> Representação esquemática de um espectrómetro de RMN. Adaptado de: Course Hero. <sup>85</sup> ....	45
<b>Figura 29:</b> Representação esquemática do princípio energético da técnica RMN. Adaptado de: Course Hero. <sup>85</sup> .....	46
<b>Figura 30:</b> Estrutura química do composto DPPH.....	46
<b>Figura 31:</b> Reação química da redução do radical DPPH para DPPHH.....	47
<b>Figura 32:</b> Fotografia da A) montagem do condensador do refluxo adaptado ao balão Erlenmeyer e B) montagem da ampola de decantação para a etapa de extração.....	56
<b>Figura 33:</b> Fotografia da A) montagem do equipamento para a etapa da evaporação do éter e B) placa de Petri contendo a amostra.....	56
<b>Figura 34:</b> Fotografia do A) tubo Falcon contendo a solução de amostra ibérica após a etapa de sonicação e B) balão Erlenmeyer contendo a solução após as etapas de centrifugação e filtração a vácuo.....	59
<b>Figura 35:</b> Fotografia dos equipamentos utilizados nas análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS.....	60

<b>Figura 36:</b> Gráfico da composição dos eluentes A e B em função do tempo de análise das soluções dos padrões ácido abiético, ácido oleico, ácido palmítico, acetato de linalilo, 2-amino-1,3,4-octadecanotriol e hidrato de quercetina e das soluções 80:20 de metanol e éter etílico de amostra ibérica e amostra brasileira.....	61
<b>Figura 37:</b> Gráfico da composição dos eluentes A e B em função do tempo de análise da solução de hidrato de (+)-catequina e das soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira.....	62
<b>Figura 38:</b> Gráfico da composição dos eluentes A e B em função do tempo de análise das soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira.....	62
<b>Figura 39:</b> Fotografia dos cristais de <i>pitch</i> brasileira.....	64
<b>Figura 40:</b> Fotografia da A) montagem do equipamento para a etapa da HS-SPME e B) do equipamento utilizado na análise de GC-MS.....	67
<b>Figura 41:</b> Fotografia do equipamento de GC-MS da empresa Eurochemicals.....	68
<b>Figura 42:</b> Fotografias dos espectrômetros de FTIR com acessório ATR da A) empresa Eurochemicals e B) universidade do Minho.....	70
<b>Figura 43:</b> Fotografia do espectrômetro de RMN.....	72
<b>Figura 44:</b> Representação esquemática das etapas 3-7 do procedimento experimental do ensaio DPPH.....	75
<b>Figura 45:</b> Representação esquemática do procedimento experimental do ensaio da microdiluição.....	79
<b>Figura 46:</b> Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS das soluções 80:20 de metanol e éter etílico da amostra ibérica no A) modo positivo e B) modo negativo e da amostra brasileira no C) modo positivo e D) modo negativo.....	84
<b>Figura 47:</b> Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo positivo das soluções dos padrões A) ácido abiético, B) hidrato de quercetina, C) ácido palmítico, D) ácido oleico, E) acetato de linalilo e F) 2-amino-1,3,4-octadecanotriol.....	85
<b>Figura 48:</b> Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo negativo das soluções dos padrões A) ácido abiético, B) hidrato de quercetina, C) ácido palmítico, D) ácido oleico, E) acetato de linalilo e F) 2-amino-1,3,4-octadecanotriol.....	86
<b>Figura 49:</b> Cromatogramas extraídos para um m/z de 301 no modo negativo das soluções 80:20 de metanol e éter etílico da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira e das soluções dos padrões C) ácido abiético e D) hidrato de quercetina.....	87
<b>Figura 50:</b> Espectros de massa no modo negativo do A) íão 301 e do seu B) íão “filho” 151 da solução filtrada de amostra ibérica.....	88

<b>Figura 51:</b> Esquema da proposta de fragmentação do ácido abiético.....	89
<b>Figura 52:</b> Espectros de massa no A) modo positivo do íon 283 da solução filtrada de amostra brasileira e no B) modo negativo do íon 195 da solução filtrada de amostra ibérica.....	91
<b>Figura 53:</b> Esquema da proposta de fragmentação do ácido oleico.....	92
<b>Figura 54:</b> Esquema da proposta de fragmentação do acetato de linalilo.....	93
<b>Figura 55:</b> Cromatogramas extraídos para um m/z de 318 no modo positivo das soluções 80:20 de metanol e éter etílico da A) amostra ibérica, B) amostra brasileira e C) solução do padrão 2-amino-1,3,4-octadecanotriol.....	94
<b>Figura 56:</b> Espectros de massa no modo positivo do íon 318 da solução filtrada de amostra ibérica.....	94
<b>Figura 57:</b> Esquema da proposta de fragmentação do 2-amino-1,3,4-octadecanotriol.....	95
<b>Figura 58:</b> Espectros de massa no modo positivo do A) íon 287 e do seu B) íon “filho” 269 da solução 80:20 de metanol e éter etílico da amostra ibérica.....	96
<b>Figura 59:</b> Esquema da proposta de fragmentação da cianidina.....	97
<b>Figura 60:</b> Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS da solução do padrão hidrato de (+)-catequina no A) modo positivo e B) modo negativo.....	98
<b>Figura 61:</b> Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo positivo das soluções filtradas da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira. ....	100
<b>Figura 62:</b> Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo negativo das soluções filtradas da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira.....	101
<b>Figura 63:</b> Espectros de massa no modo positivo do A) íon 260, do seu B) íon “filho” 200, C) íon 171, D) íon 187 e do seu E) íon “filho” 145 da solução filtrada de amostra brasileira e do F) íon 181 e G) íon 269 da solução filtrada de amostra ibérica.....	105
<b>Figura 64:</b> Esquema da proposta de fragmentação da ribalinina.....	106
<b>Figura 65:</b> Esquema da proposta de fragmentação do 2-fenilfenol.....	107
<b>Figura 66:</b> Esquema da proposta de fragmentação da ficusina.....	107
<b>Figura 67:</b> Esquema da proposta de fragmentação do ácido cafeico.....	108
<b>Figura 68:</b> Esquema da proposta de fragmentação da formononetina.....	108
<b>Figura 69:</b> Espectros de massa no modo positivo do A) íon 1019 e B) íon 793 da solução filtrada de amostra brasileira.....	110
<b>Figura 70:</b> Espectros de massa no modo negativo do A) íon 223, do seu B) íon “filho” 179, C) íon 375, D) íon 141 e E) íon 337 da solução filtrada de amostra brasileira e do F) íon 387, G) íon 305 e do seu H) íon “filho” 201 da solução filtrada de amostra ibérica.....	114

<b>Figura 71:</b> Esquema da proposta de fragmentação do ácido 13-oxo-9,11-tridecadienóico.....	115
<b>Figura 72:</b> Esquema da proposta de fragmentação do ácido mussaenosídico .....	116
<b>Figura 73:</b> Esquema da proposta de fragmentação do ácido <i>cis,cis</i> -mucónico.....	117
<b>Figura 74:</b> Esquema da proposta de fragmentação do ácido erúcido.....	118
<b>Figura 75:</b> Esquema da proposta de fragmentação do ácido isocalolongico.....	119
<b>Figura 76:</b> Esquema da proposta de fragmentação da (+)-galocatequina.....	120
<b>Figura 77:</b> Espetros de massa no modo positivo do A) ião 529 e do seu B) ião “filho” 491 da solução filtrada de amostra brasileira.....	121
<b>Figura 78:</b> Esquema da proposta de fragmentação do metil (2 <i>R</i> )-2-(acetiloxi)-2-[(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>R</i> )-13-(furan-3-il)-6,6,8,12-tetrametil-17-metilideno-5,15-dioxo-2,14-dioxatetraciclo[7.7.1.0 <sup>1,12</sup> .0 <sup>3,8</sup> ]heptadecan-7-il]acetato.....	123
<b>Figura 79:</b> Espetros de massa no modo negativo do A) ião 349, do seu B) ião “filho” 317, C) ião 333 e do seu D) ião “filho” 289 da solução filtrada de amostra brasileira.....	125
<b>Figura 80:</b> Esquema da proposta de fragmentação da andrografolida.....	126
<b>Figura 81:</b> Esquema da proposta de fragmentação do (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3,5,7-trihidroxi-6-metil-2-(3,4,5-trihidroxifenil)croman-4-ona.....	127
<b>Figura 82:</b> Cromatograma obtido da análise de HS-SPME/GC-MS recorrendo à fibra de PDMS de 7 µm da amostra ibérica.....	131
<b>Figura 83:</b> Cromatogramas obtidos das análises de HS-SPME/GC-MS recorrendo à fibra de PDMS de 100 µm da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira.....	132
<b>Figura 84:</b> Cromatograma obtido da análise de HS-SPME/GC-MS dos cristais de <i>pitch</i> brasileira.....	134
<b>Figura 85:</b> Cromatogramas obtidos das análises de GC-MS precedidas por metilação da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira.....	135
<b>Figura 86:</b> Cromatograma obtido da análise de GC-MS precedida por metilação dos cristais de <i>pitch</i> brasileira.....	136
<b>Figura 87:</b> Espetros FTIR-ATR da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira.....	141
<b>Figura 88:</b> Espetros FTIR-ATR do A) precipitado ibérico e B) precipitado brasileiro.....	143
<b>Figura 89:</b> Espectro FTIR-ATR dos cristais da <i>pitch</i> brasileira.....	143
<b>Figura 90:</b> Fotografia da parte insolúvel observada na solução de 10 mg de amostra ibérica em DMSO D6.....	146
<b>Figura 91:</b> A) Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de 10 mg da amostra ibérica em clorofórmio deuterado e B) alargamento da zona espectral entre 2,5-7,5 ppm.....	147

<b>Figura 92:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de 5 mg de ácido abiético em clorofórmio deuterado.....	149
<b>Figura 93:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de acetato de linalilo em clorofórmio deuterado.....	150
<b>Figura 94:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de ácido oleico em clorofórmio deuterado.....	151
<b>Figura 95:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de 5 mg de 2-amino-1,3,4-octadecanotriol em clorofórmio deuterado.....	152
<b>Figura 96:</b> A) Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de 5 mg dos cristais de <i>pitch</i> brasileira em clorofórmio deuterado e B) alargamento da zona espectral entre 0,5-6,0 ppm.....	153
<b>Figura 97:</b> Gráficos da absorvância lida a 600 nm das bactérias fitopatogênicas A) <i>Xylophilus ampelinus</i> , B) <i>Xanthomonas arboricola</i> , C) <i>Pseudomonas syringae</i> e D) <i>Pectobacterium parmenteri</i> em função do tempo de incubação.....	155
<b>Figura 98:</b> Fotografia do colorímetro.....	174
<b>Figura 99:</b> Fotografia do início do ensaio do ponto de amolecimento.....	177
<b>Figura 100:</b> Fotografia do equipamento Chemotronic Cool utilizado no ensaio do ponto de turvação.....	178
<b>Figura 101:</b> Gráfico resultante do ensaio do ponto de turvação realizado para a amostra <i>pitch</i> ibérica. As curvas a amarelo, rosa e verde correspondem à variação da turvação, em %, temperatura, em °C, e velocidade de agitação, em rpm, respetivamente, ao longo do tempo.....	197
<b>Figura 102:</b> Gráfico resultante do ensaio do ponto de turvação realizado para a amostra <i>pitch</i> brasileira. As curvas a amarelo, rosa e verde correspondem à variação da turvação, em %, temperatura, em °C, e velocidade de agitação, em rpm, respetivamente, ao longo do tempo.....	197
<b>Figura 103:</b> Espectros de massa no modo positivo correspondentes a um tempo de retenção de 15,2 min da A) solução do padrão ácido oleico e B) solução 80:20 de metanol e éter etílico da amostra brasileira e no modo negativo correspondentes a um tempo de retenção de 0,8 min da C) solução do padrão acetato de linalilo e D) solução 80:20 de metanol e éter etílico da amostra ibérica.....	199
<b>Figura 104:</b> Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo positivo das soluções filtradas da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira. Os picos que surgem entre 8 e 12 min são provenientes de impurezas nas soluções filtradas das amostras.....	200
<b>Figura 105:</b> Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo negativo das soluções filtradas da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira. Os picos que surgem entre 8 e 12 min são provenientes de impurezas nas soluções filtradas das amostras.....	201
<b>Figura 106:</b> Espectros de massa no modo positivo da solução filtrada de amostra ibérica correspondente a um tempo de retenção de 0,12 min.....	202

<b>Figura 107:</b> Espectros de massa no modo positivo da solução filtrada de amostra brasileira correspondentes a um tempo de retenção de A) 4,19 min, B) 5,43 min e C) 6,37 min.....	203
<b>Figura 108:</b> Espectros de massa no modo negativo da solução filtrada de amostra ibérica correspondentes a um tempo de retenção de A) 4,97 min, B) 5,50 min e C) 6,37 min.....	205
<b>Figura 109:</b> Espectros de massa no modo negativo da solução filtrada de amostra brasileira correspondentes a um tempo de retenção de A) 5,68 min, B) 6,37 min e C) 6,74 min.....	206
<b>Figura 110:</b> Espectros de massa no modo positivo da A) solução filtrada de amostra ibérica de 150-2000 m/z e B) de 285-800 m/z e da C) solução filtrada de amostra brasileira de 150-2000 m/z e D) de 150-800 m/z.....	208
<b>Figura 111:</b> Espectros de massa no modo negativo da A) solução filtrada de amostra ibérica de 150-2000 m/z e B) de 75-400 m/z e da C) solução filtrada de amostra brasileira de 150-2000 m/z e D) de 150-400 m/z.....	210
<b>Figura 112:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de 10 mg da amostra brasileira em clorofórmio deuterado.....	211
<b>Figura 113:</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN de 10 mg da amostra ibérica em clorofórmio deuterado.....	211

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Compostos neutros presentes na colofónia proveniente de diversas espécies de árvore e respetivas técnicas de caracterização utilizadas para os identificar.....	16
<b>Tabela 2:</b> Materiais e equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais e respetivas marcas e incertezas.....	50
<b>Tabela 3:</b> Nome, fórmula química, massa molar e número do Serviço de Resumos Químicos (CAS) dos reagentes utilizados nos procedimentos experimentais.....	51
<b>Tabela 4:</b> Materiais e equipamentos utilizados no procedimento experimental e respetivas marcas e incertezas.....	52
<b>Tabela 5:</b> Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados no procedimento experimental.....	53
<b>Tabela 6:</b> Materiais e equipamentos utilizados nas análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS e respetivas marcas e incertezas.....	57
<b>Tabela 7:</b> Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados nas análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS.....	58
<b>Tabela 8:</b> Materiais e equipamentos utilizados nas análises de HS-SPME/GC-MS e DI-SPME/GC-MS e respetivas marcas e incertezas.....	65
<b>Tabela 9:</b> Materiais e equipamentos utilizados nas análises de GC-MS precedida pela etapa de metilação e respetivas marcas e incertezas.....	65
<b>Tabela 10:</b> Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados nas análises de GC-MS precedida pela etapa de metilação.....	66
<b>Tabela 11:</b> Materiais e equipamentos utilizados nas análises de FTIR-ATR e respetivas marcas.....	69
<b>Tabela 12:</b> Materiais e equipamentos utilizados nas análises de RMN e respetivas marcas e incertezas.....	71
<b>Tabela 13:</b> Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados nas análises de RMN.....	71
<b>Tabela 14:</b> Materiais e equipamentos utilizados no ensaio DPPH e respetivas marcas e incertezas.....	73
<b>Tabela 15:</b> Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados no ensaio DPPH.....	73
<b>Tabela 16:</b> Materiais e equipamentos utilizados no ensaio da microdiluição e respetivas marcas e incertezas.....	76

<b>Tabela 17:</b> Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados no ensaio da microdiluição.....	76
<b>Tabela 18:</b> Valores dos parâmetros de controlo da qualidade obtidos para as amostras de <i>pitch</i> ibérica e <i>pitch</i> brasileira.....	81
<b>Tabela 19:</b> Compostos identificados nas análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS.....	128
<b>Tabela 20:</b> Identificação dos picos numerados presentes nos cromatogramas.....	137
<b>Tabela 21:</b> Números de onda e atribuição das bandas de absorção observadas nos espetros FTIR-ATR das amostras ibérica e brasileira.....	142
<b>Tabela 22:</b> Números de onda e atribuição das bandas de absorção observadas nos espetros FTIR-ATR dos precipitados sólidos ibérico e brasileiro e dos cristais de <i>pitch</i> brasileira.....	144
<b>Tabela 23:</b> Massa de amostra de colofónia a pesar em função do índice de acidez.....	173



## Capítulo 1. Introdução

## 1.1) Contextualização do trabalho

A colofónia é a principal matéria-prima utilizada pela empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A.. A colofónia é constituída maioritariamente por diversos ácidos resínicos e a empresa foca-se na transformação química desta fração ácida de modo a dar origem a vários produtos, como, por exemplo, ésteres. Estes produtos são utilizados por diversas indústrias químicas e, por este motivo, o conhecimento da composição das matérias-primas e dos respetivos produtos é de extrema importância nestas indústrias, pois permite a adaptação dos processos produtivos das mesmas às características químicas dos materiais utilizados.

Para além dos ácidos resínicos, na composição da colofónia é possível encontrar compostos neutros (como, por exemplo, álcoois diterpénicos, hidrocarbonetos, aldeídos, polifenóis e ésteres metílicos). Apesar de estarem presentes em pequenas quantidades estes componentes são, geralmente, desvalorizados e afetam as características e o desempenho do produto final. Existem poucos estudos sobre a composição neutra da colofónia e nunca houve uma investigação da composição neutra da *pitch* - um dos produtos resultantes da destilação molecular da colofónia - sendo este trabalho o primeiro a abordar este tema.

Existe a possibilidade dos compostos neutros da *pitch* apresentarem atividade antioxidante. Esta hipótese deve-se ao facto de se verificar uma degradação de cor da colofónia *water white* - um produto resultante da destilação molecular da colofónia - mais significativa à medida que a temperatura aumenta em comparação com a colofónia, o que indica que a colofónia possui certos compostos com resistência à oxidação, e que estes podem ter constituído a composição da *pitch* durante o processo de destilação. Caso compostos apresentando esta atividade estejam presentes neste material seria vantajoso alterar futuramente o processo de destilação de modo que estes compostos estejam presentes na colofónia *water white*, para fornecer-lhe resistência à oxidação. Por este motivo é de interesse avaliar a atividade antioxidante dos compostos neutros da *pitch*. Além disso, uma vez que a resina é produzida como um mecanismo de defesa, também existe a possibilidade dos compostos neutros presentes na *pitch* demonstrarem atividade antimicrobiana.

Esta dissertação descreve o trabalho de investigação desenvolvido no âmbito do estágio do mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química da Universidade do Minho, realizado na empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A..

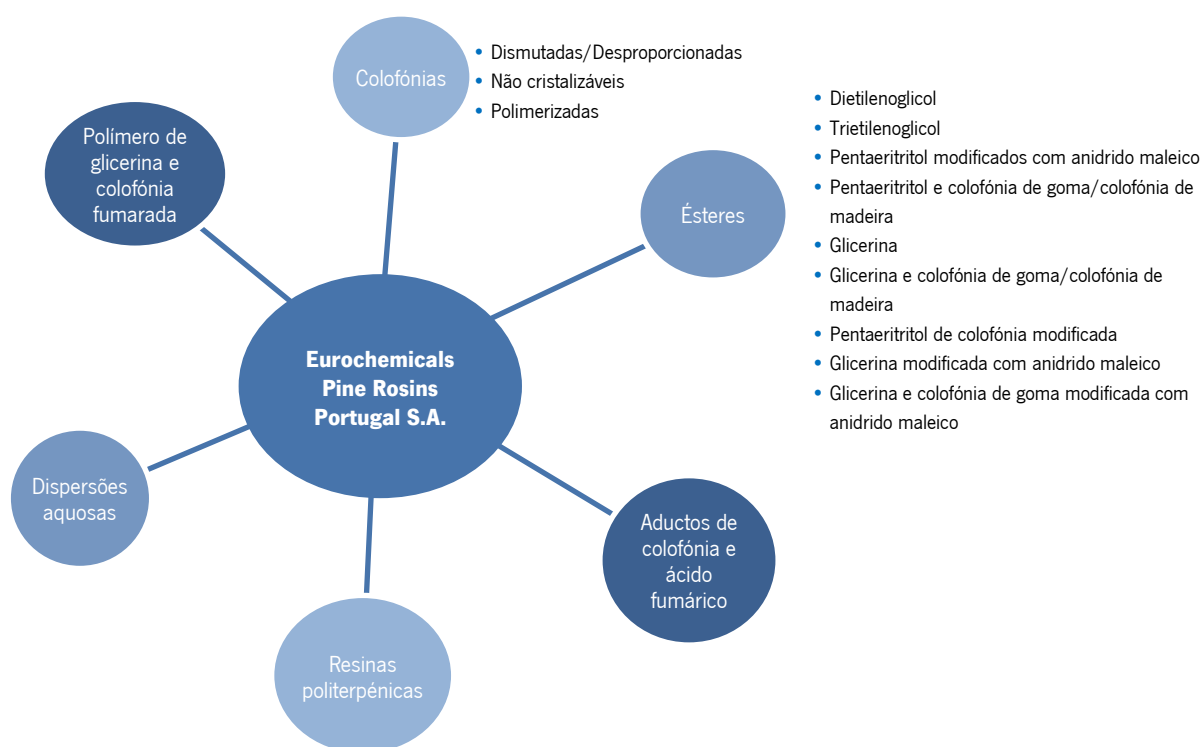
## **1.2) Objetivos do estágio**

O principal objetivo deste trabalho consistiu na separação, identificação e caracterização dos compostos neutros presentes nas *pitch* e na avaliação do seu impacto no desempenho das colofónias. Além disso, avaliou-se a atividade antioxidante e antibacteriana da *pitch*.

O estágio teve também como objetivo proporcionar a integração e a experiência de trabalho em ambiente empresarial, através do contacto com as técnicas envolvidas no desenvolvimento dos derivados de colofónia. Outros objetivos consistiram na obtenção de conhecimentos relativos aos métodos de controlo de qualidade e na familiarização com as técnicas de análise de amostras de colofónia.

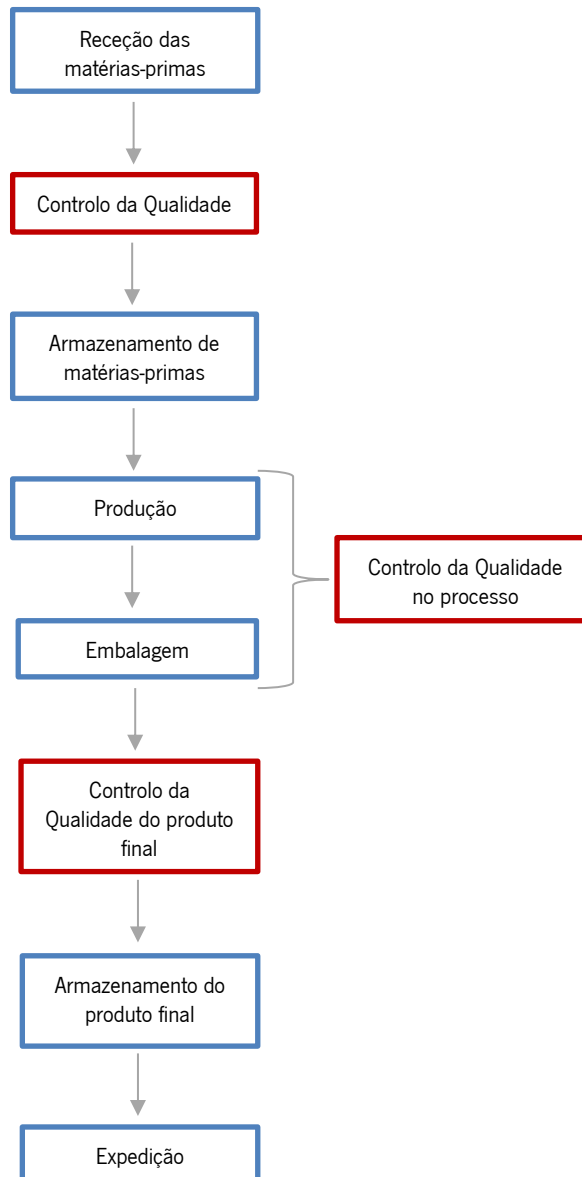
## Capítulo 2. Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A.

A Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A. é uma empresa química de 2ª transformação localizada na freguesia de São Romão de Neiva do distrito de Viana do Castelo. Esta empresa é responsável pela conceção, desenvolvimento e produção de resinas naturais provenientes de árvores do género *Pinus*, disponibilizando resinas derivadas de colofónia ou ésteres derivados de colofónia bem como misturas formuladas de alto desempenho *state-of-the-art*. Estes serão utilizados como matérias-primas para as mais diversas indústrias, nomeadamente cosmética, alimentar, tintas e vernizes, adesivos, marcação de estradas e borracha.<sup>1</sup> Os produtos desenvolvidos por esta empresa estão representados na **Figura 1**.



**Figura 1:** Esquema dos diversos produtos desenvolvidos pela empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A..

No momento em que a empresa recebe matérias-primas, ao longo do processo de produção e no embalamento são realizadas várias análises físicas e químicas, de acordo com as normas e procedimentos reconhecidos mundialmente, para garantir a segurança e o controlo de qualidade do produto final. As principais etapas realizadas pela Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A. estão representadas na **Figura 2**.



**Figura 2:** Fluxograma da empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A..

A empresa foi criada em 1970 com a designação de Sociedade Portuguesa Resina Dismutada S.A., tendo como objetivo a produção de resina dismutada. Desde o seu ano de criação a empresa sofreu diversas alterações a nível de produção e a nível de gestão. Em 1983 foi adquirida pelo grupo ENI e o seu nome alterado em 1987 para EniChem Portugal Indústria Química S.A., iniciando-se a produção de novos produtos de “derivados de resina” em 1993. A empresa mudou outra vez o nome em 2002 para Polimeri Europa Portugal S.A. e em 2011 foi adquirida por capitais portuguesas, sendo denominada Eurochemicals Portugal S.A.. Em 2016 criou-se uma *joint venture* com a empresa KEMI Pine Rosins Portugal S.A., que se encontra localizada no concelho de Cantanhede do distrito de Coimbra, passando a designar-se Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A..<sup>1</sup>

Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A. tem integrado o Sistema de Gestão (Qualidade, Ambiente e Segurança e Saúde do Trabalho) e é certificada de acordo com normas portuguesas (NP) que resultaram da adoção de uma norma europeia (EN), que por sua vez resultou da adoção de uma norma da organização internacional para padronização (ISO) – NP EN ISO 9001:2015 e NP EN ISO 14001:2015 – e de acordo com a NP ISO 45001:2019.<sup>1</sup>

## Capítulo 3. Enquadramento teórico



### **3.1) Género *Pinus***

O pinheiro (*Pinus* spp.) é o maior e mais heteromórfico género da família dos pinheiros (*Pinaceae*) e, com mais de 100 espécies diferentes amplamente distribuídas em todo o mundo, representa o maior género de coníferas.<sup>2</sup> Por estar muito difundido no Hemisfério Norte e também, devido ao seu uso intensivo nas indústrias de madeira e celulose, *Pinus* spp. é considerado o maior produtor de resina.<sup>3</sup>

O pinheiro é uma árvore de crescimento rápido, resistente a baixas temperaturas e pode crescer em solos pobres em nutrientes.<sup>4</sup> Os pinheiros são ecologicamente importantes como um componente principal e frequentemente dominante das florestas boreais, subalpinas, temperadas e tropicais, bem como das florestas áridas, podendo crescer em florestas mistas com outras coníferas. Algumas espécies são especialmente adaptadas a incêndios florestais, por exemplo, *Pinus banksiana*, em que o fogo é essencial para a abertura do cone e a dispersão de sementes. Além disso, algumas espécies de pinheiros podem ter uma vida muito longa como *Pinus longaeva*, que pode viver mais de 3000 anos.<sup>5</sup>

#### **3.1.1) *Pinus pinaster***

*Pinus pinaster*, descrito em 1789 por William Aiton, é habitualmente conhecido por pinheiro-bravo.<sup>6</sup> Ocorrendo naturalmente na bacia do Mediterrâneo de Portugal à Argélia, *P. pinaster* é uma espécie de pinheiro de copa aberta que pode crescer até 40 metros.<sup>7</sup>

Esta espécie cresce frequentemente em solos arenosos e dunas entre carvalhos e arbustos e em altitudes baixas a moderadas, mas estendendo-se até 1500 metros. Valorizado pelo potencial de resina e para controlo de erosão, *P. pinaster* tem sido vastamente plantado na América do Sul, Australásia (região que inclui a Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné e algumas ilhas menores da parte oriental da Indonésia) e África do Sul.<sup>7</sup> Além destas utilizações, o pinheiro-bravo é também uma árvore ornamental popular, frequentemente plantada em parques e jardins, e é usada como fonte de flavonóides, catequinas, proantocianidinas e ácidos fenólicos.<sup>6</sup>

### 3.1.2) *Pinus elliottii*

*Pinus elliottii*, conforme descrito em 1880 por Georg Engelmann, é habitualmente conhecido por pinheiro de corte, pinheiro de corte amarelo ou pinheiro de pântano.<sup>8</sup> O nome comum de *P. elliottii* refere-se ao terreno pantanoso coberto de vegetação conhecido como "cortes" que constituem o seu habitat nativo; *P.elliotti* cresce nas áreas de planícies, ao longo de riachos e margens de pântanos e baías onde há bastante humidade no solo.<sup>9</sup> Esta espécie é composta de duas variedades distintas - *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus elliottii* var. *densa* – e é nativa do sudeste dos Estados Unidos da América.<sup>8</sup>

*P.elliotti* é uma espécie de árvore conífera perene que atinge alturas de 30 metros com um tronco de até 0,8 metros de diâmetro e apresenta uma copa cônica que se torna arredondada ou achatada com a idade. A variedade típica (var. *elliottii*) é a de crescimento mais rápido e é muito plantada nos Estados Unidos fora da sua área nativa. Esta variedade é valorizada pela resina, mas é considerada cada vez mais importante nas plantações como fonte de madeira e celulose.<sup>8</sup> Devido ao seu rápido crescimento e produção de produtos de madeira de elevado valor, esta variedade foi amplamente introduzida noutros países, como, por exemplo, no Brasil, dando uma importante contribuição para a indústria de produção de resinas.<sup>9</sup> Ao contrário da variedade mais comum, var. *densa* não é usada nesta indústria, no entanto, é plantada para produção de madeira.<sup>8</sup>

### 3.2) Goma

A goma ou gema, vulgarmente denominada de resina, proveniente dos pinheiros é um líquido viscoso inflamável amarelo/castanho que apresenta um odor forte e é produzida pela árvore como um mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos devido à toxicidade e função aderente.<sup>10</sup>

Existem vários métodos de extração da goma (resinagem). Um dos métodos mais utilizados consiste em fazer um corte no tronco e aplicar um composto químico para estimular e manter o fluxo da goma (**Figura 3**).<sup>11</sup> A profundidade do corte e o componente estimulante variam entre os países.<sup>11</sup> Geralmente, o estimulante mais utilizado é o ácido sulfúrico uma vez que estimula e acelera a produção da goma durante quatro semanas.<sup>12</sup> São muitos os países produtores de goma, sendo que a China tem dominado a produção e o comércio mundial, mas a Indonésia e o Brasil também são importantes produtores.<sup>13</sup>



**Figura 3:** Recolha de goma segregada pelo corte no tronco do pinheiro. Extraído de: Resipinus Associação de Destiladores e Exploradores de Resina.<sup>14</sup>

A goma é constituída por dois componentes: terebentina e colofónia. A terebentina é a fração líquida da goma, apresentando uma cor clara e um gosto amargo. Esta fração contém os elementos mais voláteis da goma, sendo responsável pelo odor característico da mesma. A colofónia é a fração sólida e não volátil da goma, tendo um aspeto vítreo, quebradiço, semi-transparente e brilhante.<sup>3,15</sup>

A goma extraída dos pinheiros (goma bruta) é enviada para indústrias de 1ª transformação, onde é limpa e filtrada. O processo de limpeza a que este material é submetido é designado de malaxagem. Esta etapa é necessária para remover as várias impurezas presentes na goma tais como, cascas e agulhas de pinheiro, insetos, entre outras. Após os processos de malaxagem e filtração a goma bruta é designada de goma limpa.

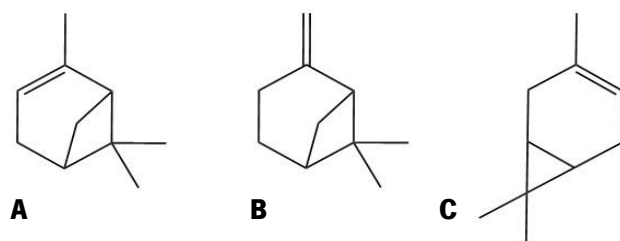
Para ocorrer a separação da fração volátil da goma da fração não volátil realiza-se um processo de destilação. A terebentina pode ser removida da colofónia por destilação descontínua ou contínua, sendo que a destilação descontínua é o método mais utilizado, apesar da destilação contínua ser mais eficiente por ser muito mais simples de operar.<sup>16</sup> Após o processo de destilação a colofónia e a terebentina são encaminhadas para indústrias de 2ª transformação, onde são convertidas em diversos derivados resínicos.

A produção mundial de colofónia por ano é, aproximadamente, 1,2 milhões de toneladas enquanto a produção anual mundial de terebentina é 330 mil toneladas aproximadamente.<sup>17</sup>

### 3.3) Terebentina

A terebentina é um líquido inflamável, imiscível em água e possui um ponto de ebulição acima de 150°C. Ela apresenta na sua composição diversos compostos orgânicos e esta pode variar substancialmente dependendo da espécie de pinheiro da qual é extraída, o que acaba por influenciar bastante o seu valor comercial e aplicação industrial.<sup>13</sup>

Em geral, a terebentina contém quatro classes principais de componentes: hidrocarbonetos, álcoois terpênicos, éteres e sesquiterpenos. O principal componente é o hidrocarboneto monoterpênico bicíclico e insaturado com fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$ . Os três isômeros mais predominantes na terebentina são  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e 3-careno (**Figura 4**), além de possuir quantidades menores de canfeno e triciclono. Os hidrocarbonetos monocíclicos também estão presentes em baixas concentrações.<sup>16</sup>



**Figura 4:** Estruturas químicas dos hidrocarbonetos monoterpênicos mais comuns, A)  $\alpha$ -pineno, B)  $\beta$ - pineno e C) 3-careno.

No passado a terebentina era usada como solvente em tintas mas atualmente é utilizada como matéria-prima na síntese de fragrâncias e sabores químicos.<sup>18,19</sup> Geralmente, a terebentina é submetida a destilação fracionada para isolar compostos químicos desejáveis, principalmente  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, que são convertidos em derivados de elevado valor comercial.<sup>13</sup> Um desses derivados é óleo de pinho sintético, sendo este posteriormente usado em solventes, desodorizantes, bactericidas e na indústria têxtil.<sup>18,19</sup>

### 3.4) Colofónia

A colofónia é um material amorfo, sólido e não volátil cuja cor varia entre amarelo-claro e amarelo-avermelhado, consoante a sua composição e grau de oxidação. A colofónia é insolúvel em água, mas solúvel na maioria dos solventes orgânicos tais como, tolueno e etanol. Por ser um material amorfo

e com uma composição bastante complexa não apresenta ponto de fusão, mas amolece para um fluido viscoso à medida que a temperatura aumenta.<sup>16</sup>

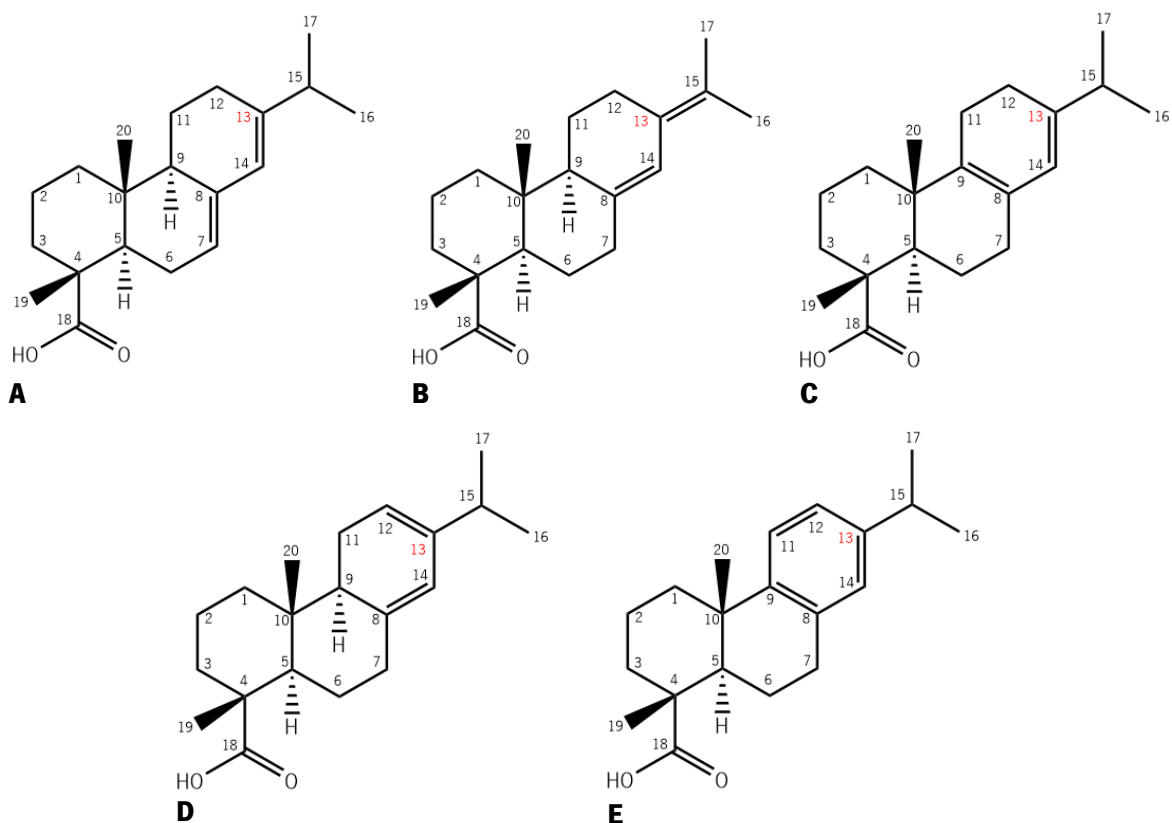
Existem três tipos distintos de colofónia que se diferenciam pelo método utilizado para a sua extração: colofónia de goma (*Gum rosin*), obtida pela destilação da goma colhida diretamente de árvores resinosas vivas, colofónia de madeira (*Wood rosin*) que é extraída dos cepos de árvores resinosas virgens através da utilização de um solvente orgânico sendo, posteriormente, destilada e a colofónia de Tall-oil (*Tall-oil rosin*), obtida pela destilação do *Tall-oil* bruto, sendo este um subproduto do fabrico da pasta de papel pelo método de Kraft.<sup>16</sup>

Independentemente da sua origem (colofónia de goma, madeira ou *Tall-oil*), a colofónia é composta principalmente por ácidos diterpénicos monocarboxílicos (90–95%), habitualmente conhecidos como ácidos resínicos, cuja fórmula genérica é  $C_{19}H_{29}COOH$ . Os restantes 5-10% são essencialmente compostos neutros, cuja natureza depende da origem específica da colofónia.<sup>16</sup>

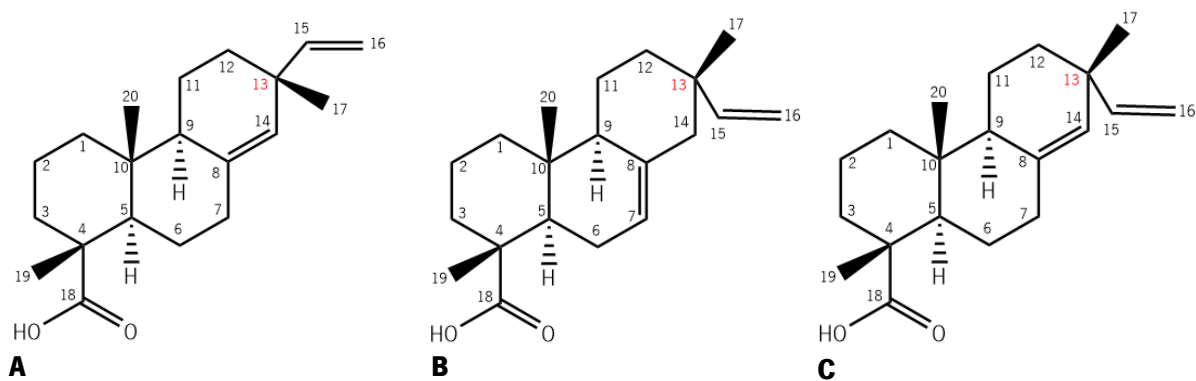
Os ácidos resínicos mais comuns encontrados na colofónia do pinheiro são derivados de três esqueletos de carbono tricíclicos básicos: abiético, pimárico e isopimárico. Os ácidos resínicos menos comuns derivam do esqueleto de carbono bicíclico, o labdano. O esqueleto abiético é partilhado por quatro ácidos resínicos, nomeadamente, os ácidos abiético, neoabiético, palústrico e levopimárico cujas estruturas estão representadas na **Figura 5**. Estes ácidos são conhecidos como ácidos abietadienóicos e diferem apenas na posição do sistema de ligação dupla conjugada da sua estrutura.<sup>3</sup> Os ácidos abietadienóicos, ao sofrerem desidrogenação (remoção de hidrogénio), são convertidos no ácido dehidroabiético aromático.<sup>16</sup> Embora os ácidos do tipo abiético sejam as estruturas dominantes na maioria das colofónias, a sua abundância relativa é bastante variável, dependendo da espécie de pinheiro, origem geográfica, condições de processamento e manuseio (por exemplo, temperatura e pH).<sup>3</sup>

Os ácidos do tipo pimárico mais comuns são os ácidos pimárico, isopimárico e sandaracopimárico (**Figura 6**). Em contraste com os ácidos do tipo abiético, este grupo de ácidos possui um sistema de ligação dupla não conjugada, o que reduz significativamente a reatividade química destes compostos.<sup>3</sup> Além disso, possui grupos substituintes diferentes no carbono 13 do anel, enquanto os ácidos do tipo abiético possuem um grupo isopropilo, os ácidos do tipo pimárico possuem um grupo etil e um grupo metil no carbono 13.<sup>16</sup> Os ácidos do tipo pimárico e isopimárico diferem apenas em serem

epiméricos no carbono 13, isto é, neste átomo de carbono apresentam  $\alpha$ -metil e  $\beta$ -metil, respectivamente.<sup>16</sup> O ácido sandaracopimárico é um isômero ótico do ácido pimárico.

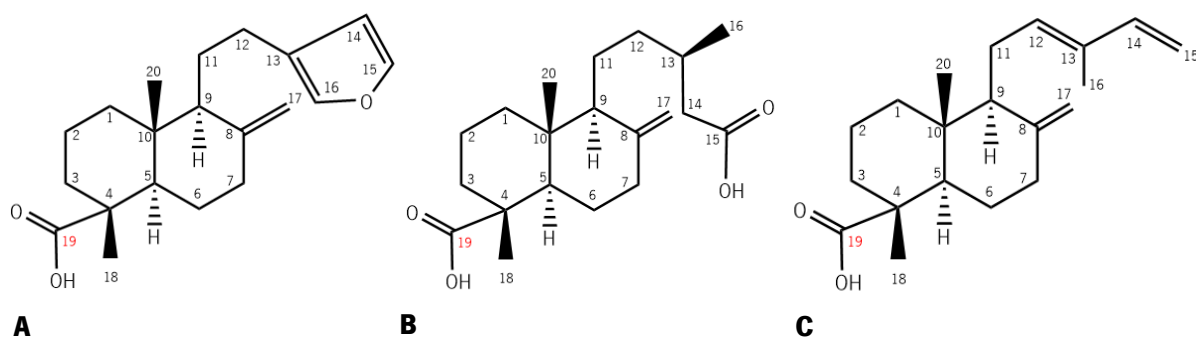


**Figura 5:** Estruturas químicas dos ácidos do tipo abiético mais comuns, A) ácido abiético, B) ácido neoabiético, C) ácido palústrico, D) ácido levopimárico e E) ácido dehidroabiético.



**Figura 6:** Estruturas químicas dos ácidos do tipo pimárico mais comuns, A) ácido pimárico, B) ácido isopimárico e C) ácido sandaracopimárico.

Os ácidos do tipo labdano geralmente apresentam o grupo carboxílico (COOH) no carbono 19.<sup>16</sup> As estruturas mais comuns deste grupo de ácidos estão representadas na **Figura 7**.



**Figura 7:** Estruturas químicas dos ácidos do tipo labdano mais comuns, A) ácido lambertiânico, B) ácido mercúscico e C) ácido comúncico.

A reatividade química dos ácidos resínicos é determinada pela presença do sistema de ligação dupla (sistema oleofínico) e do grupo COOH.<sup>16</sup> O grupo COOH está sobretudo envolvido na esterificação, formação de sal, descarboxilação, formação de nitrilo e anidridos, entre outras reações químicas. Por sua vez, o sistema olefínico pode estar envolvido em reações de oxidação, redução, hidrogenação e desidrogenação. Dado o caráter conjugado deste sistema nos ácidos do tipo abiético, e a maior reatividade associada a ele, muita mais atenção tem sido dedicada a estas estruturas. Em termos de aplicações industriais, a formação de sal, esterificação e adições de Diels-Alder são as reações mais relevantes dos ácidos resínicos.<sup>3</sup>

Os compostos neutros presentes na colofónia podem ser classificados como saponificáveis (anidridos e ésteres) ou insaponificáveis (outros compostos não-ácidos). A quantidade de compostos neutros em todas as colofónias, tanto do tipo saponificável como do não saponificável, variam, mas, habitualmente, são da ordem dos 10%. A porção saponificável da fração neutra pode ser estimada para qualquer colofónia a partir das diferenças entre o índice de acidez e o índice de saponificação. A fração insaponificável de colofónias não modificadas varia cerca de 2 a 4%.<sup>16</sup>

O primeiro trabalho sobre a composição da colofónia foi publicado em 1826 por Baupe. Desde esse ano muitos mais trabalhos sobre este tema foram publicados, mas a grande maioria deles abordam a composição ácida das colofónias. Alguns autores investigaram a composição da fração neutra das colofónias, nomeadamente, Smith *et al.*<sup>20</sup> que descobriram a presença de diversos aldeídos nos fumos

produzidos pelas colofónias quando estas quebram ao estarem expostas a temperaturas de soldagem tais como, formaldeído, acetaldeído, propionaldeído e hexanal. Num artigo mais recente diversas classes de compostos neutros foram identificadas na colofónia de abeto (*Abies cilicica* subsp. *isaurica*), nomeadamente, álcoois, aldeídos, hidrocarbonetos e ésteres.<sup>15</sup>

Na **Tabela 1** é possível observar compostos neutros que foram identificados na colofónia e as diversas técnicas analíticas utilizadas para os caracterizar e identificar tais como, GC-MS, cromatografia gasosa com detetor de ionização por chama (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (GC-FTIR).

**Tabela 1:** Compostos neutros presentes na colofónia proveniente de diversas espécies de árvore e respetivas técnicas de caracterização utilizadas para os identificar.

<b>Classe do composto e nome</b>	<b>Espécie</b>	<b>Técnica de caracterização</b>
<b>Hidrocarbonetos</b>		
kaur-16-eno; cicloisolongifoleno,9,10-desidro; abieta-8(14),9(11),12-trieno	<i>Abies cilicica</i> subsp. <i>isaurica</i>	GC-MS e GC-FID <sup>15</sup>
$\beta$ -felandreno; $\alpha$ -felandreno; para-cimeno; alocimeno; pimaradieno; dehidroabietano; abietadieno	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
3-careno	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
	<i>Pinus brutia</i>	GC-MS <sup>22</sup>
canfeno; $\beta$ -pineno; limoneno; terpinoleno	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
	<i>Pinus brutia</i>	GC-MS <sup>22</sup>
$\alpha$ -pineno; $\beta$ -cariofileno	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
	<i>Pinus brutia</i>	GC-MS <sup>22</sup>
	<i>Pinus merkusii</i>	GC-MS <sup>24</sup>
$\alpha$ -terpineno	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>



longifoleno	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
	<i>Pinus heldreichii</i>	GC-MS <sup>25</sup>
	<i>Pinus brutia</i>	GC-MS <sup>22</sup>
ciclohexeno; tolueno; $\gamma$ -fencheno; triciclono; longipineno; longiciclono; isolongifoleno; isocariofileno; $\alpha$ -humuleno	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
$\gamma$ -terpineno; $\beta$ -mirceno	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
	<i>Pinus brutia</i>	GC-MS <sup>22</sup>
cembreno; isocembreno	<i>Pinus heldreichii</i>	GC-MS <sup>25</sup>
valenceno; pregn-14-eno, (5 $\beta$ )	–	GC-MS <sup>26</sup>
ciclofencheno	<i>Pinus pinaster</i>	GC-MS <sup>26</sup>
	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
biciclo[5.2.0]nonano, 4-metileno- 2,8,8-trimetil-2-vinil; 2,4b-dimetil-8- metileno-2-vinil-1,2,3,4,4a,4b, 5,6,7,8,8a,9-dodecahidrofenantreno	–	GC-MS <sup>27</sup>
<b>Aldeídos</b>		
propanal; acroleína; butanal; isobutanal; valeraldeído; isovaleraldeído; 2-metilbutanal; furfural; hexanal; ciclohexanocarboxaldeído; benzaldeído	–	GC-MS <sup>20</sup>
formaldeído; acetaldeído	–	GC-MS <sup>20</sup> , Cromatografia de camada fina <sup>23</sup>
abieta-8,11,13-trieno-18-al	<i>Abies cilicica</i> subsp. <i>isaurica</i>	GC-MS e GC-FID <sup>15</sup>
pimarinal; palustrinal; isopimarinal; dehidroabietinal; abietinal; neoabietinal	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>

eliotinal	–	GC-FID <sup>21</sup>
sandaracopimarinal	<i>Pinus palustris</i> <i>Pinus caribaea</i>	Difração de raios X <sup>28</sup>
	–	GC-MS <sup>27</sup>
<b>Álcoois</b>		
kaura-5,16-dieno-18-ol	<i>Abies cilicica</i> subsp. <i>isaurica</i>	GC-MS e GC-FID <sup>15</sup>
<i>trans</i> -dihidro- $\alpha$ -terpineol; <i>cis</i> -dihidro- $\alpha$ -terpineol; $\beta$ -terpineol	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
borneol	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
$\alpha$ -terpineol	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
	<i>Pinus brutia</i>	GC-MS <sup>22</sup>
palustrinol; dehidroabietinol; pimarinol; sandaracopimarinol; isopimarinol; eliotinol, abietinol; neoabietinol	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
$\beta$ -sitosterol	–	GC-FID <sup>21</sup>
$\alpha$ -fenchol	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
isocembrol; cembrol	<i>Pinus heldreichii</i>	GC-MS e <sup>1</sup> H-RMN <sup>25</sup>
$\beta$ -fenchol; terpineno-4-ol; linalol	<i>Pinus brutia</i>	GC-MS <sup>22</sup>
4,14-retro-retinol	–	GC-MS <sup>26</sup>
verticiol	–	GC-MS <sup>27</sup>
<b>Ésteres</b>		
acetato de retinol; neoabietato de metilo	<i>Abies cilicica</i> subsp. <i>isaurica</i>	GC-MS e GC-FID <sup>15</sup>
acetato de bornilo	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
metacrilato de 2-hidroxi-propilo; metacrilato de 3-hidroxi-propilo; propionato de linalilo; acetato de linalilo; propanoato de geranilo	<i>Pinus brutia</i>	GC-MS <sup>22</sup>

dehidroabietato de metilo; abalino; <i>cis</i> -comunato de metilo;	–	GC-MS <sup>27</sup>
pimara-8(14),15-dieno-18-oato de metilo		
éster 4-metoxifenil 3-metilfenil, ácido ftálico	–	GC-MS <sup>26</sup>
<b>Éteres</b>		
4-alilanisola; 3,5-dimetoxistilbeno	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
epóxido de humuleno	<i>Pinus brutia</i>	GC-MS <sup>22</sup>
<b>Cetonas</b>		
ciclohexanona	–	GC-FID e GC-FTIR <sup>23</sup>
pimara-7,15-dieno-3-ona	–	GC-MS <sup>26</sup>
	–	GC-MS <sup>27</sup>
<b>Amida</b>		
erucamida	–	GC-MS <sup>27</sup>
<b>Outros</b>		
palustridieno	<i>Pinus ponderosa</i>	GC-FID <sup>21</sup>
4-ciano-4'-bifenilil 4-( <i>trans</i> -4-pentilciclohexil) benzoato	–	GC-MS <sup>26</sup>
dilaurina	–	GC-MS <sup>27</sup>

A exploração de colofónia é, pelo menos, tão antiga quanto a construção de navios de madeira. Nessa altura era usada para impermeabilizar os navios. Foi apenas durante a primeira metade do século XX que a química deste recurso natural foi estudada mais profundamente e novas transformações e aplicações desenvolvidas em bases mais científicas.<sup>3</sup>

A maior parte da colofónia é utilizada de uma forma quimicamente modificada, em vez de ser aplicada no estado bruto, uma vez que a colofónia no estado natural apresenta baixo ponto de amolecimento e tem tendência a cristalizar e oxidar. A acidez intrínseca da colofónia, juntamente com outras propriedades químicas, permite-lhe ser transformada num grande número de derivados que são utilizados numa vasta gama de aplicações. Os derivados da colofónia podem ser aplicados em tintas, vernizes, papel químico, agir como um ligante em adesivos, plastificante em borrachas, emulsificante

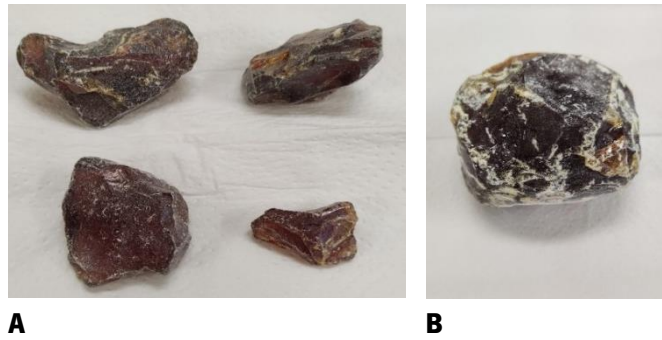
em refrigerantes e como agente de vitrificação em medicina e na pastilha elástica. Derivados da colofónia também podem ser usados em cosméticos e vernizes dentais e a colofónia demonstrou ser promissora na indústria farmacêutica como agente emulsificante, mascarador de sabor, microencapsulante e agente ligante e formador de matriz.<sup>29</sup>

### 3.5) *Pitch*

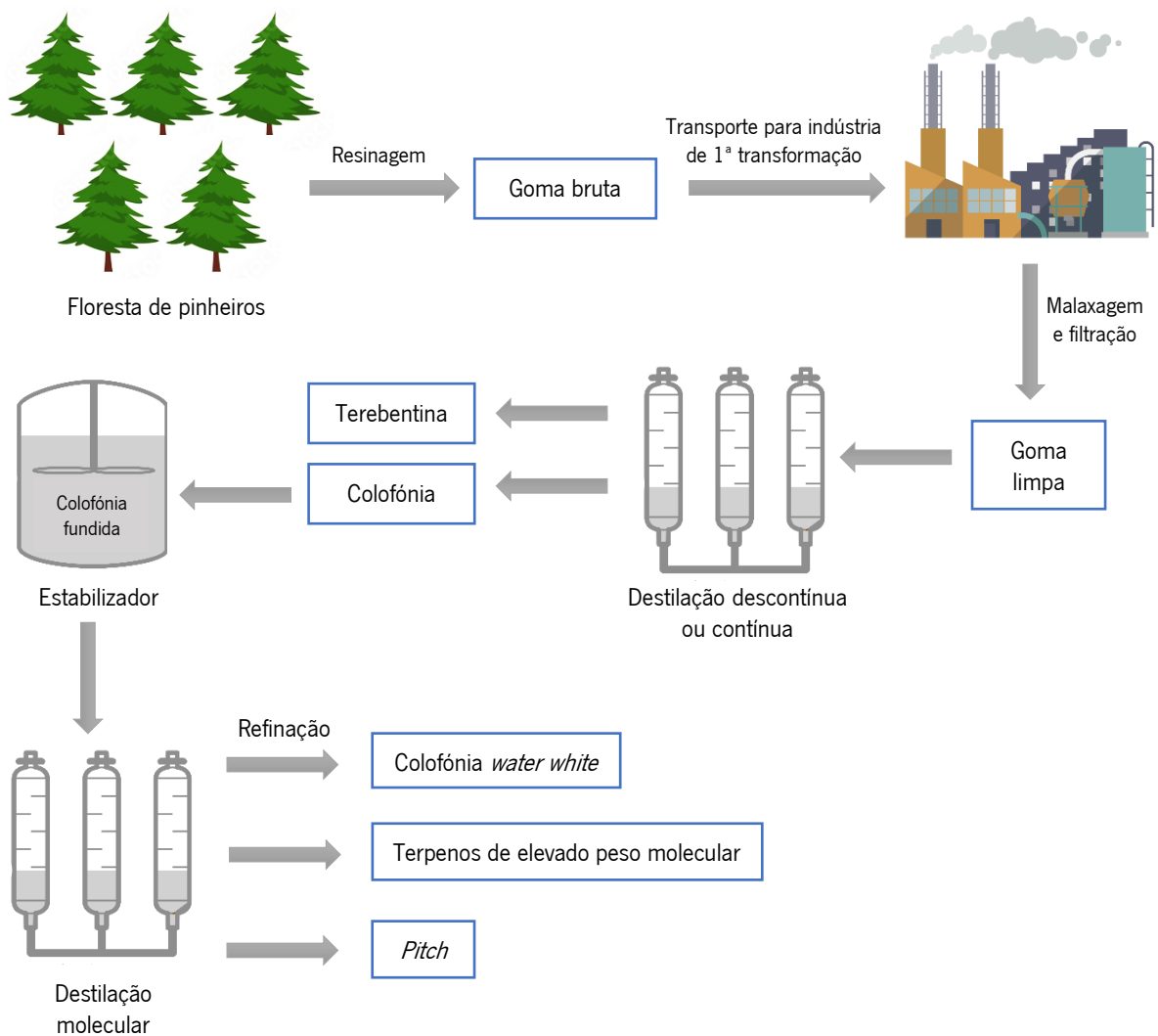
Um dos produtos que pode ser fabricado pelas indústrias químicas de 1ª transformação é a colofónia *water white*, uma colofónia transparente sem odor, obtida pela refinação de colofónia de goma. Esta colofónia é de elevada pureza, contendo uma elevada percentagem de ácidos resínicos e baixa quantidade de compostos neutros e compostos voláteis, sendo por este motivo considerada um produto de qualidade superior e destinada a aplicações específicas.<sup>30</sup>

Para se obter a colofónia *water white* é necessário a colofónia passar pelo processo de destilação molecular, o qual origina também terpenos de elevado peso molecular e *pitch*. A destilação molecular é um processo de elevado vácuo, no qual o material destila de uma superfície de evaporação para uma superfície de condensação relativamente fria, posicionada diretamente oposta a ela, sob uma pressão de operação tal que o caminho livre médio das moléculas de destilação é maior que a distância entre o evaporador e o condensador. Deste modo, o risco térmico para o material é reduzido ao mínimo. Este método de destilação é extremamente útil para compostos com peso molecular de 250 a 1000 g/mol, volatilidades demasiado baixas para que a destilação convencional ocorra e termicamente instáveis.<sup>31</sup> A destilação molecular é usada em todo o mundo e apresenta diversas aplicações, nomeadamente, na indústria. A sua inclusão em processos industriais pode vir a aumentar no futuro consideravelmente devido ao seu potencial como processo de baixo impacto ambiental e como técnica de separação para obtenção de produtos de elevada qualidade.<sup>32</sup>

A *pitch* consiste no resíduo resultante do processo de refinação da colofónia de goma (**Figura 8**). A *pitch* contém uma quantidade de ácidos resínicos bastante menor relativamente à colofónia *water white* e maior quantidade de compostos neutros. Na **Figura 9** apresenta-se um esquema das principais etapas do procedimento de obtenção da *pitch*.



**Figura 8:** Fotografia da pitch resultante do processo de refinação da colofónia de A) *Pinus pinaster* e B) *Pinus elliottii*.



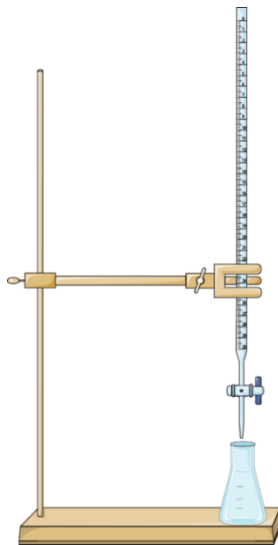
**Figura 9:** Esquema das principais etapas do procedimento para a obtenção da colofónia *water white*, terpenos de elevado peso molecular e *pitch*.

### 3.6) Parâmetros de controlo de qualidade da colofónia

Os derivados de colofónia têm várias características físicas e químicas que precisam de estar de acordo com as especificações pedidas pelos clientes. Algumas das características avaliadas ao longo do processo de controlo da qualidade da colofónia e seus derivados incluem índice de acidez, cor, viscosidade, cristalização, ponto de amolecimento e ponto de turvação. Todas as análises físico-químicas realizadas no Laboratório de Qualidade da empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A. seguem normas de referência.

#### 3.6.1) Índice de acidez

O índice de acidez é determinado segundo a norma métodos americanos para testes padrão (ASTM) D 463 e consiste na quantidade de hidróxido de potássio (KOH) expressa em miligramas, necessária para neutralizar os ácidos resínicos livres existentes em 1 grama de amostra. Para determinar este índice realiza-se uma titulação ácido-base utilizando a fenolftaleína como indicador (**Figura 10**).

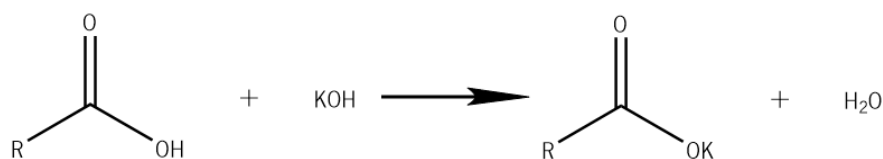


**Figura 10:** Equipamento habitualmente utilizado numa titulação ácido-base.

Resumidamente, o procedimento envolve dissolver uma determinada quantidade de amostra, cujo valor depende do índice de acidez esperado, numa solução de etanol previamente neutralizada e, posteriormente, titular com uma solução de KOH até se visualizar a mudança da cor do indicador fenolftaleína para a cor rosa. Na **Figura 11** está representada a reação química que ocorre durante a titulação. O índice de acidez calcula-se segundo a equação 1 sendo  $v$  o volume de solução de KOH gasto

na titulação expresso em mililitros, g a massa da amostra em gramas, N a normalidade da solução de KOH expressa em eg/L e 56,11 a massa molecular em g/mol do KOH.

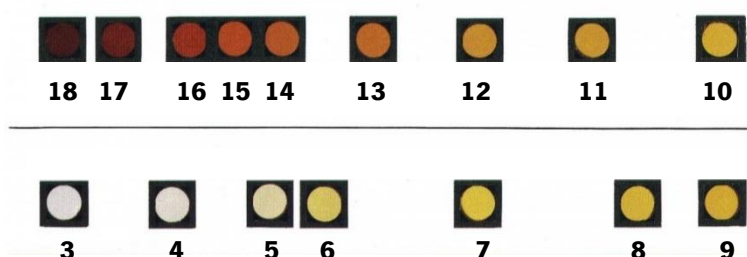
$$(Equação 1) \quad \text{Índice de acidez} = \frac{56,11 \times v \times N}{g}$$



**Figura 11:** Reação química ácido-base que ocorre durante a titulação de uma amostra de um derivado de colofónia com uma solução de KOH.

### 3.6.2) Cor

A avaliação da cor da amostra segue o procedimento descrito na norma ASTM D 1544. De modo a determinar a cor de uma amostra dissolve-se 2 g de amostra num tubo de ensaio contendo 2 g de tolueno (50:50) e, posteriormente, coloca-se o tubo no colorímetro. A cor do tubo é comparada com padrões de vidro da escala de Gardner de 1963 (**Figura 12**), que estão numerados de 1 a 18, sendo 1 a cor mais clara e 18 a mais escura, escolhendo-se o número da cor do padrão que mais se assemelha à amostra.



**Figura 12:** Padrões de cor da escala de Gardner de 1963. Adaptado de: Are.na.<sup>33</sup>

As características da colofónia podem ser influenciadas por vários fatores, nomeadamente, o grau de oxidação, a espécie e localização geográfica do pinheiro da qual a goma é extraída, os métodos de extração e purificação utilizados e a época do ano em que ocorre a recolha da goma.<sup>29,34,35</sup> Além disso, em muitos casos uma cor escura está associada à presença de contaminantes indesejáveis. A cor da

colofônia é uma propriedade muito importante a nível industrial. Muitas indústrias preferem colofônias mais claras às mais escuras como, por exemplo, a indústria da produção de papel. Para a produção de papel, os graus de cor clara da colofônia são preferíveis pois os graus mais escuros reduzem a claridade do papel, uma propriedade que a indústria do papel tenta melhorar meticulosamente.<sup>16</sup>

### 3.6.3) Viscosidade

Para a determinação da viscosidade das colofônias, segue-se a norma ASTM D 2196 – 99, recorrendo-se à utilização do viscosímetro de Brookfield (**Figura 13**). Segundo esta norma para determinar a viscosidade coloca-se 8 g de amostra numa cuba, em seguida, a cuba é colocada no viscosímetro e define-se uma temperatura de aquecimento e um *spindle*. O *spindle* é escolhido com base na gama de viscosidade da amostra. O valor da viscosidade é medido em centipoise (cP) apresentado no mostrador do viscosímetro. Um fluido que apresente um valor de cP baixo fluirá e mover-se-á com maior facilidade e rapidez, demonstrando menor viscosidade relativamente a um fluido com um valor de cP mais elevado, que fluirá muito mais devagar.<sup>36</sup>



**Figura 13:** Fotografia do equipamento utilizado para determinar a viscosidade.

### 3.6.4) Cristalização

Embora a cristalização das colofônias tenha apresentado problemas por muitos anos, não existe um teste padronizado para medir a tendência de uma colofônia cristalizar.<sup>16</sup> O teste geralmente usado é



o que foi desenvolvido por Palkin e Smith.<sup>37</sup> Num tubo de ensaio introduz-se 14 g de amostra e 6 g de acetona para fazer uma proporção de 70:30 ou, no caso de se querer fazer uma proporção 50:50, pesa-se 10 g de amostra e 10 g de acetona. Monitoriza-se o tempo decorrido desde a preparação da solução até ao aparecimento da primeira cristalização, quanto maior o intervalo de tempo decorrido, menor a tendência para cristalizar.

O resultado obtido é descrito como “cristalizou” quando, ao longo do tempo de ensaio, formarem-se cristais, precipitação ou turvação na solução (**Figura 14**), ou “não cristalizou” quando, no final do tempo de ensaio, a solução encontra-se com um aspeto semelhante ao que se verificava no início do ensaio, ou seja, não ocorreu a formação de cristais, precipitação ou turvação na solução.

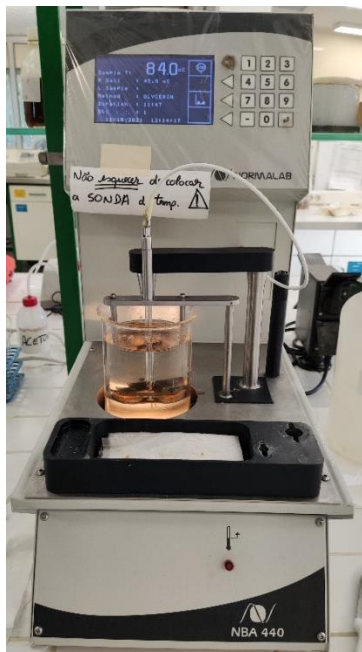


**Figura 14:** Fotografia da presença de cristais numa solução de colofónia de razão 70:30.

### **3.6.5) Ponto de amolecimento**

O ponto de amolecimento da colofónia é determinado segundo a norma ASTM E 28 – o método de anel e bola. Inicialmente a amostra é aquecida numa placa de aquecimento até se tornar suficientemente viscosa para ser transferida para duas argolas e é deixada a arrefecer. De seguida, as argolas são niveladas para garantir que tem sempre a mesma quantidade de colofónia no seu interior. Coloca-se as argolas num suporte com duas esferas de aço (com peso e dimensões padronizadas) por cima, sendo depois o suporte mergulhado num copo contendo um fluido inerte. A escolha do fluido inerte a utilizar depende do ponto de amolecimento esperado e pode ser água, glicerina, óleo de silicone, entre outros. O fluido inerte sofre uma subida de temperatura gradual até se atingir o ponto de amolecimento, que corresponde à temperatura a que uma argola de colofónia se deforma até atingir a flecha de 25,4

mm, pela ação do peso da esfera de aço. Na **Figura 15** observa-se o equipamento utilizado na determinação do ponto de amolecimento.



**Figura 15:** Fotografia do equipamento utilizado para determinar o ponto de amolecimento.

O ponto de amolecimento é reduzido por compostos neutros, ácidos gordos e componentes resínicos oxidados.<sup>38</sup> Reações que aumentam o peso molecular da colofónia induzem um aumento do seu ponto de amolecimento; o aumento mais significativo do ponto de amolecimento ocorre quando a colofónia é fortificada com ácido fumárico.<sup>16</sup>

### 3.6.6) Ponto de turvação

O ensaio do ponto de turvação, também designado por ponto nuvem, determina a temperatura à qual a mistura homogénea de colofónia e *test oil* inicia a sua precipitação provocando, deste modo, a turvação da amostra em análise.

A determinação do ponto de turvação da amostra segue o procedimento descrito na norma ASTM D 6038. Num tubo de ensaio são colocados 2 g de amostra e 18 g de *test oil*, em seguida, introduz-se um agitador magnético e uma sonda de temperatura no tubo e insere-se o tubo no analisador de turbidez Chemotronic. Ao longo do ensaio existe um aumento gradual da temperatura até atingir 230°C, após a estabilização neste valor, há uma progressiva diminuição da temperatura até se atingir o ponto de

turvação, sendo possível determiná-lo por observação do gráfico que se forma durante a análise da amostra (**Figura 16**).



**Figura 16:** Gráfico dos resultados experimentais obtidos no ensaio do ponto de turvação. As curvas a amarelo, rosa e verde correspondem à variação da turvação, em %, temperatura, em °C, e velocidade de agitação, em rotações por minuto (rpm), respetivamente, ao longo do tempo.

### 3.7) Técnicas de caracterização

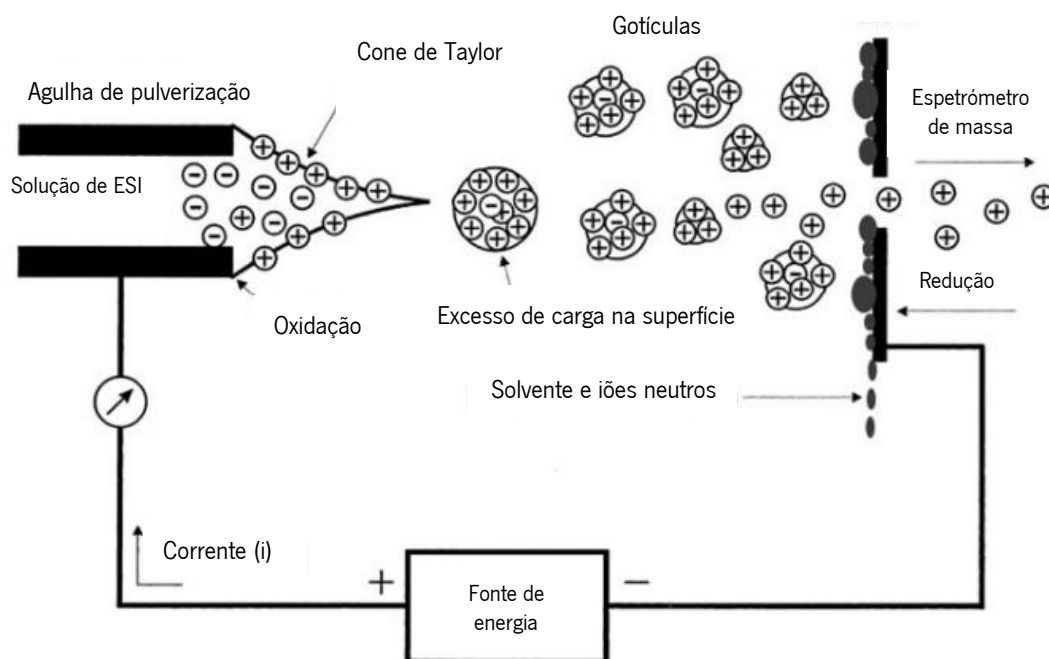
#### 3.7.1) ESI-MS/MS

A ionização por eletrospray (ESI) é uma técnica de ionização à pressão atmosférica habitualmente usada em sistemas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (MS).<sup>39</sup> Esta técnica requer a introdução de amostras no estado líquido e usa energia elétrica para auxiliar na transferência de iões da solução para a fase gasosa antes de serem submetidos à análise de MS, deste modo, espécies iónicas em solução podem ser analisadas com maior sensibilidade. Compostos neutros também podem ser convertidos para a forma iónica em solução ou em fase gasosa por protonação ou cationização.<sup>40</sup>

Em ESI a fonte de eletrospray consiste num tubo capilar, através do qual é bombeada a amostra dissolvida, seja ela um efluente de uma coluna de cromatografia líquida ou de uma bomba de seringa, e um contra eléctrodo.<sup>39</sup> Uma diferença de potencial elevada (2-6 kV) é aplicada entre a ponta do capilar e o contra eléctrodo criando um forte campo eléctrico, o que resulta na dispersão da solução da amostra num aerossol de gotículas altamente carregadas.<sup>39,41</sup> A nebulização da solução pode ser facilitada pela introdução de um gás nebulizador tal como o azoto. Este fluxo de gás também ajuda a direccionar o spray

que sai da ponta do capilar para o espectrômetro de massa. As gotículas carregadas diminuem de tamanho à medida que o solvente evapora, sendo esta evaporação auxiliada pelo fluxo de azoto (gás de secagem).<sup>41</sup> À medida que o solvente evapora, a densidade de carga elétrica na superfície da gotícula aumentará até que as forças repulsivas de Coulomb entre cargas semelhantes excederão as forças de tensão superficial levando à quebra da gotícula inicial em gotículas menores. Este processo repete-se, produzindo-se gotículas cada vez menores e, eventualmente, um íon da gotícula é ejetado. Estes íons em fase gasosa passam por um cone de amostragem e são concentrados em regiões de vácuo bombeadas diferencialmente antes de serem transportados para o analisador do espectrômetro de massa.<sup>39</sup>

A ESI pode ser usada em modo de ionização positivo ou negativo, dependendo da afinidade de próton do composto em análise. No modo de ionização positivo (**Figura 17**) apenas analitos com, pelo menos, uma carga elementar positiva podem ser detetados, em contraste, no modo de ionização negativo apenas analitos com, pelo menos, uma carga elementar negativa são detetados. No modo de ionização positivo moléculas que possuem características básicas podem ser facilmente ionizadas através da produção de aductos com prótons, enquanto as moléculas que apresentam grupos funcionais ácidos e não apresentam grupos funcionais básicos, normalmente, dão melhores espectros no modo de ionização negativo.<sup>42</sup>



**Figura 17:** Esquema do modo de funcionamento da ESI no modo de ionização positivo. Adaptado de: So, Hu e Yao, 2013.<sup>43</sup>

A técnica ESI é de ionização suave, permitindo uma menor transferência de energia para as moléculas em análise, em consequência, as partículas carregadas ficam num estado de leve excitação e tendem a ter muito menos fragmentação.<sup>44</sup> Além disso, a ESI é particularmente útil porque espécies com carga múltipla podem ser formadas, permitindo a análise de moléculas com pesos moleculares superiores a 50 000 dalton (Da). Como a maioria dos espectrómetros de massa pode detetar apenas razões massa-carga ( $m/z$ ) inferiores a 2000 ou 3000 Da, a utilização desta técnica melhorou muito a capacidade de estudar grandes biomoléculas, como, por exemplo, proteínas.<sup>45</sup> Se a ESI é acoplada à cromatografia líquida, o modo de ionização positivo é geralmente escolhido, uma vez que é esperado que mais compostos ionizem neste modo, no entanto, o modo de ionização negativo tem a grande vantagem de fornecer menor ruído de fundo.<sup>46,47</sup>

Os espectrómetros de massa fornecem informações estruturais sobre compostos químicos por meio de uma série de processos que geram um espectro de massa e podem ser aplicados a análises quantitativas, no entanto, eles são usados com mais frequência para análises qualitativas.<sup>44</sup> A detecção de MS é baseada no fenómeno de que moléculas podem ser ionizadas em alto vácuo, produzindo espécies carregadas.<sup>48</sup> Estas espécies são, posteriormente, separadas com base na sua  $m/z$  e detetadas, sendo a quantidade relativa de iões de vários valores de  $m/z$  organizada e apresentada na forma de um espectro de massa. O espectro de massa pode ser considerado uma forma de identificação para a maioria dos compostos orgânicos, porém, no caso de isómeros pode ser difícil diferenciá-los, principalmente com estereoisómeros.<sup>44</sup>

Todos os espectrómetros de massa têm quatro componentes principais: uma fonte de iões, onde as moléculas da amostra podem ser ionizadas por vários métodos, um analisador de massa que separa os iões de acordo com a sua  $m/z$ , um detetor que mede a abundância dos iões separados como um sinal elétrico e um dispositivo de gravação que converte o sinal do detetor numa forma adequada para estudo e processamento adicionais.<sup>49</sup>

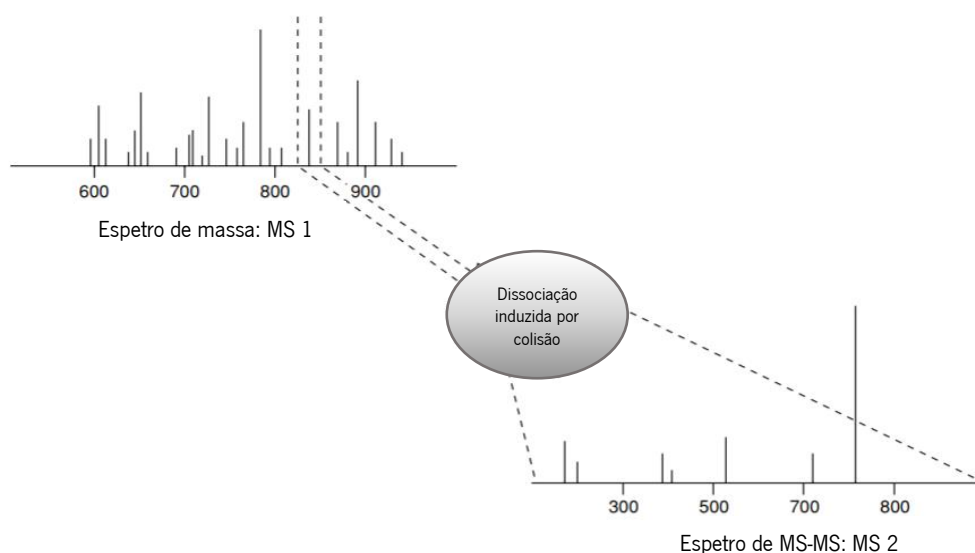
Existem vários tipos de analisadores de massa tais como, tempo-de-voo, sector magnético, armadilha iónica quadropolo, entre outros. Os analisadores de massa de armadilha iónica usam uma combinação de campos elétricos ou magnéticos para capturar ou “aprisionar” iões dentro do analisador.<sup>50</sup> Existem várias configurações de armadilhas de iões, sendo um deles a armadilha iónica linear. Este tipo

de analisador é composto por quatro varas paralelas com forma hiperbólica, segmentadas em três secções, acopladas com eléctrodos em cada extremidade para facilitar o aprisionamento de iões. Esta armadilha aprisiona os iões radialmente através de um campo eléctrico de radiofrequência bidimensional e axialmente num campo eléctrico estático utilizando voltagens de corrente directa, o que gera um campo homogéneo em toda a região de aprisionamento. A análise de massa envolve ejetar os iões presos na direcção radial através de duas fendas paralelas na secção central da armadilha iónica linear, sendo um detetor colocado em cada lado da armadilha para maximizar a sensibilidade de deteção de iões. Duas grandes vantagens deste tipo de analisador de massa é que possui maiores volumes de captura e, portanto, pode analisar mais iões por ciclo e pode fazer várias fragmentações sucessivas de iões ( $MS^n$ , sendo  $n < 10$ ).<sup>51</sup> Além disso, apresenta taxas de varrimento mais rápidas e maior sensibilidade.<sup>52</sup>

Nos últimos anos a espetrometria de massa em tandem tem sido bastante utilizada. A espetrometria de massa em tandem, também conhecida como MS/MS ou  $MS^2$ , é útil em estudos com compostos conhecidos e desconhecidos. Com esta técnica, um ião "parental" da fragmentação inicial – a fragmentação que dá origem ao espectro de massa convencional – é selecionado e permitido ou induzido a fragmentar-se ainda mais dando origem a iões "filhos". Em misturas complexas, estes iões "filhos" fornecem evidências da presença de um composto conhecido e para compostos novos ou desconhecidos eles providenciam informações estruturais adicionais.<sup>53</sup> No caso do analisador armadilha iónica quadropolo cada etapa das análises de MS/MS é realizada no mesmo analisador, sequencialmente no tempo. Inicialmente uma amostra é ionizada, os iões são aprisionados na armadilha e, posteriormente, ejetados e detetados dando origem a um espectro de massa. Em seguida, para fragmentar um valor  $m/z$  de interesse do espectro de massa obtido, os iões de  $m/z$  inferior e superior ao ião "parental" devem ser ejetados da armadilha. Isto é feito através da aplicação de uma voltagem suplementar suficientemente alta na armadilha, à medida que as frequências dos iões entram em ressonância com a voltagem suplementar eles serão ejetados. Posteriormente, o ião "parental" é excitado vibracionalmente pela colisão com um gás neutro, sendo este fenómeno conhecido como dissociação induzida por colisão (**Figura 18**), resultando na geração de iões fragmentados (iões "filhos").<sup>54</sup>

Uma utilização habitual de MS/MS consiste em ionizar uma amostra em bruto, escolher de forma seletiva um ião característico para o composto em análise e obter o espectro dos iões "filhos" produzidos a partir desse ião, permitindo a deteção de um composto numa amostra em bruto sem a necessidade de cromatografia ou outras etapas de separação prévias. Deste modo, a MS/MS tem a

vantagem de não necessitar de separações complexas de misturas para várias análises qualitativas de rotina.<sup>53</sup>



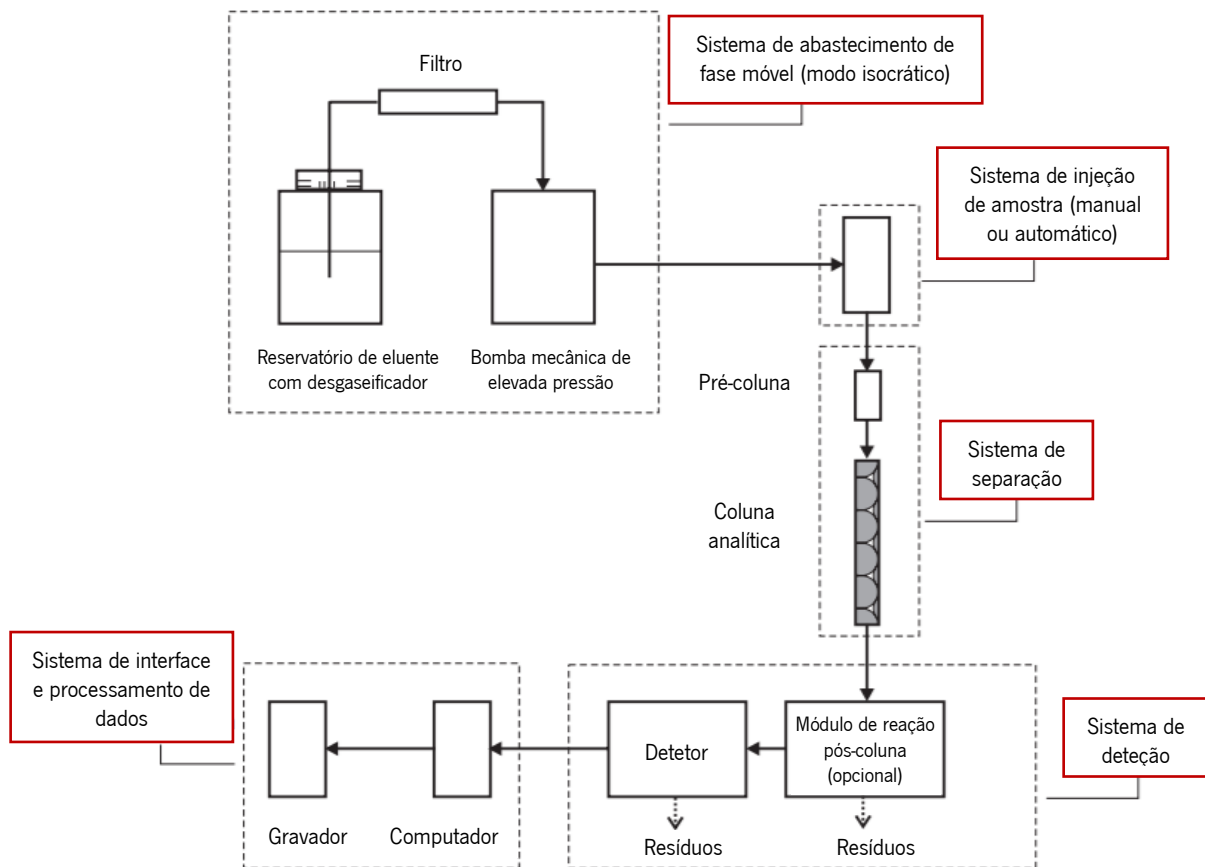
**Figura 18:** Esquema do princípio da MS/MS. Adaptado de: Mellon, 2003.<sup>49</sup>

Desvantagens da técnica ESI-MS/MS incluem uma baixa tolerância a contaminantes na amostra e uma maior complexidade dos espectros resultantes devido à presença de estados de carga múltipla.<sup>55</sup> Além disso, não é uma técnica adequada para analisar compostos apolares e não existem atualmente bibliotecas espectrais desta técnica, o que dificulta a identificação de compostos com base nos espectros de massa observados.

### 3.7.2) HPLC-MS

A cromatografia é definida como um método físico de separação em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma delas é estacionária (fase estacionária) enquanto a outra move-se numa direção definida (fase móvel).<sup>56</sup> Independentemente do tipo de cromatografia, as amostras são dissolvidas na fase móvel que viaja através da fase estacionária. A separação é possível devido a diferentes compostos terem diferentes afinidades para as fases móvel e estacionária, afetando, deste modo, a sua distribuição entre as duas fases e o seu comportamento resultante no sistema.<sup>44</sup> Existem vários tipos de métodos cromatográficos como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

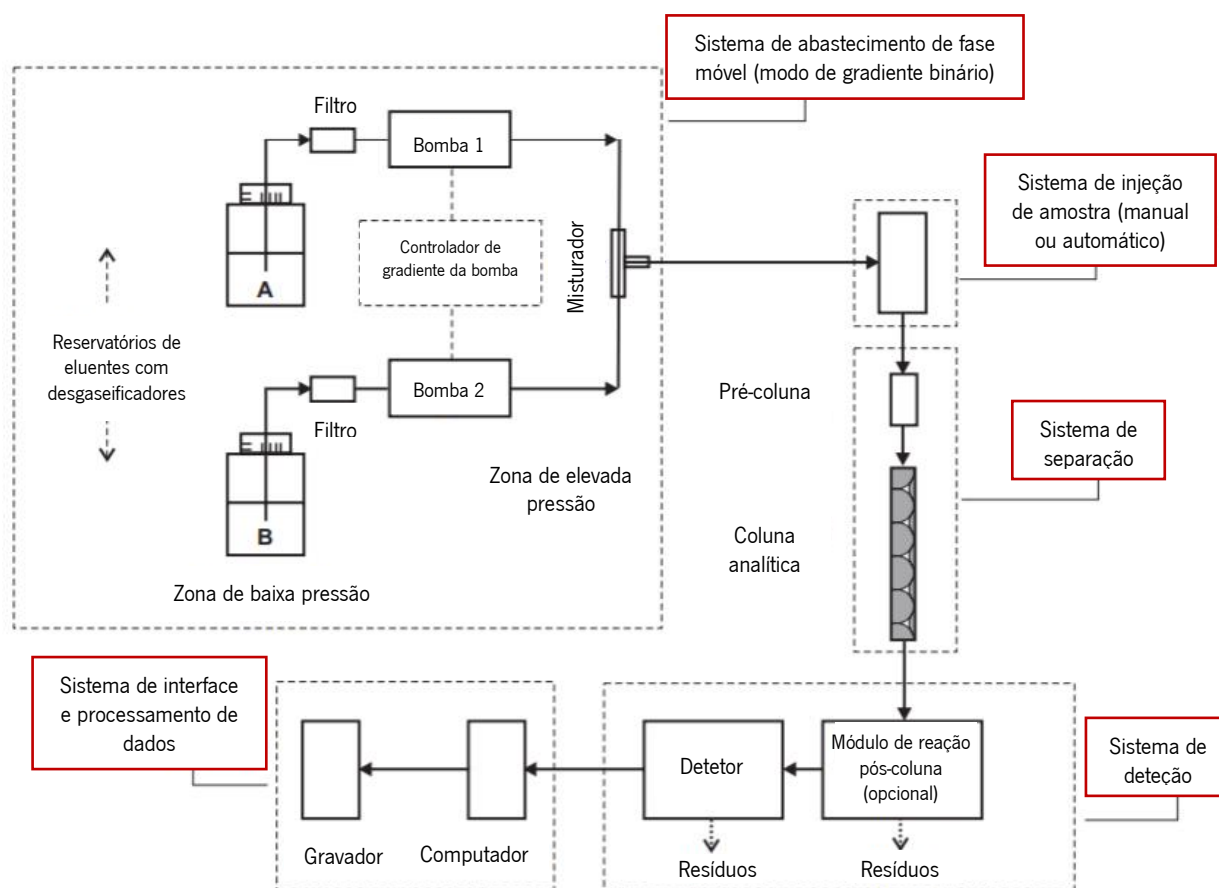
A HPLC é uma técnica para a separação de diferentes analitos numa amostra com base nos seus coeficientes de distribuição entre uma fase estacionária (coluna) e uma fase móvel (eluente) num sistema de alta pressão. Um sistema HPLC consiste, basicamente, em cinco componentes principais: um sistema de abastecimento de fase móvel, sistema de injeção de amostra, sistema de separação, sistema de deteção e um sistema de interface e processamento de dados. Quando apenas um eluente (ou fase móvel) é introduzido no sistema usando uma única bomba mecânica de elevada pressão e este flui através do sistema a uma determinada taxa de fluxo, denomina-se este modo de HPLC de modo isocrático (**Figura 19**). O analito da amostra é geralmente dissolvido na fase móvel antes de ser injetado na coluna analítica através do uso de uma micro-seringa (modo manual) ou um mecanismo de injeção automática mais sofisticado como um amostrador automático.<sup>57</sup>



**Figura 19:** Representação esquemática dos principais componentes do equipamento de HPLC com um sistema de fase móvel de modo isocrático. Adaptado de: Verma e Santoyo, 2007.<sup>57</sup>



Quando duas bombas, em vez de uma única bomba, estão envolvidas no sistema de abastecimento da fase móvel para misturar dois eluentes o modo é chamado de gradiente binário (**Figura 20**). Tal como no modo isocrático este sistema cromatográfico consiste em cinco módulos, a principal diferença está no primeiro módulo, no qual duas fases móveis (A e B) podem ser bombeadas usando o controlador de gradiente da bomba. Com o modo de gradiente binário, a composição da fase móvel muda continuamente para alcançar uma separação eficiente dos componentes da amostra, o que resulta, habitualmente, num melhor desempenho relativamente ao modo isocrático.<sup>57</sup>



**Figura 20:** Representação esquemática dos principais componentes do equipamento de HPLC com um sistema de fase móvel de modo de gradiente binário. Adaptado de: Verma e Santoyo, 2007.<sup>57</sup>

Em HPLC os componentes da amostra são separados à medida que migram através da coluna a diferentes velocidades e eluem do sistema em tempos diferentes. Analitos que são fortemente retidos na fase estacionária eluem tarde, em contrapartida, analitos que não interagem fortemente com a fase estacionária migram mais rápido e eluem mais cedo. A deteção de analitos eluídos pode ser realizada por um único detetor ou por vários detetores conectados em série.<sup>58</sup>

HPLC é praticada em diversos modos que empregam diferentes mecanismos de separação. Um dos principais mecanismos de separação é a cromatografia da fase normal e da fase reversa. A fase normal consiste em distribuir os analitos entre uma fase estacionária polar (por exemplo, sílica) e uma fase móvel de baixa polaridade (por exemplo, hexano, clorofórmio ou diclorometano). As interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogénio são os principais contribuintes; com a fase normal analitos não polares eluem rapidamente, enquanto analitos polares interagem fortemente com a fase estacionária eluindo mais tarde. Na fase reversa as polaridades são invertidas, sendo a fase estacionária menos polar do que a fase móvel. Analitos polares permanecem maioritariamente na fase móvel, mostrando pouca atração pela fase estacionária e eluem rapidamente, analitos não polares são retidos pela fase estacionária por uma combinação de interações, incluindo interações hidrofóbicas não específicas. A cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) é o mecanismo de separação mais utilizado, em grande parte devido à sua natureza mais robusta e à sua compatibilidade com amostras aquosas. No entanto, a RPLC é restrita à análise de compostos de polaridade e peso molecular médio. Os compostos polares ou de elevada massa molar são geralmente problemáticos, exemplos destes compostos são aminoácidos, nucleotídeos, ácidos orgânicos e aminas que não são retidos em RPLC.<sup>58</sup>

Há vários parâmetros que influenciam as separações cromatográficas em HPLC, nomeadamente, coeficiente de partilha, fator de capacidade, fator de seletividade, número de pratos teóricos e resolução. O conceito de pratos teóricos é frequentemente usado para analisar o alargamento dos picos em cromatografia. Considera-se que a coluna cromatográfica é composta por um número de segmentos ou pratos e, dentro de cada segmento, é suposto existir equilíbrio. Para uma determinada coluna, quanto maior o número de pratos teóricos, maior é o número de estados de equilíbrio ideais no sistema e mais eficiente é a separação.<sup>59</sup> A eficiência afeta a largura dos picos, um sistema eficiente resultará em picos estreitos, enquanto uma coluna menos eficiente contribuirá para o alargamento dos picos. Deste modo, o número de pratos teóricos (N) afeta a resolução (R) do sistema cromatográfico. Outros fatores que afetam a resolução consistem no fator de capacidade (k) e fator de seletividade ( $\alpha$ ) como se pode ver na equação 2.

$$\text{(Equação 2)} \quad R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \times \left(\frac{k}{k+1}\right) \times \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)$$

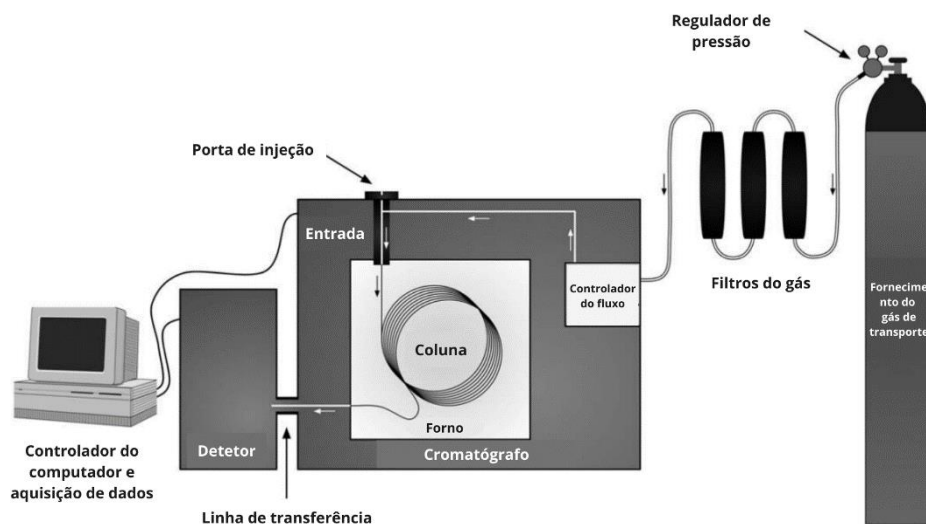
A HPLC é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação devido à sua sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas, adequação à separação de espécies não voláteis e

vasta aplicabilidade a substâncias com grande interesse para a indústria. Ao acoplar esta técnica cromatográfica com a MS – HPLC-MS – as capacidades de separação física da cromatografia líquida são combinadas com as capacidades de análise de massa da MS, obtendo-se informação estrutural adicional sobre os compostos em análise.

Como já foi referido anteriormente a geração de iões em cromatografia líquida acoplada a MS pode ser feita através da técnica de ESI, mas também pode ser alcançada por outras técnicas como, por exemplo, a técnica de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e de ionização química (CI). Na técnica de APCI utiliza-se calor e um gás de nebulização para formar um aerossol do eluente de um sistema de cromatografia líquida. Ao contrário da ESI, os iões não são formados em solução ou na fase líquida, em vez disso, são formados na fase gasosa através de uma descarga corona (elevada voltagem aplicada à agulha na fonte de ionização) para ionizar moléculas do solvente e analitos no aerossol. Os iões libertados para a fase gasosa são depois analisados pelo espectrómetro de massa.<sup>50</sup> A técnica de CI recorre a um gás reagente, como amónia ou metano, que são ionizados por um feixe de eletrões. O gás ionizado reage com os analitos formando complexos ião-molécula relativamente estáveis; como os complexos de ocorrência mais frequentes são aductos simples, como  $[M+H]^+$  ou  $[M+NH_4]^+$ , a massa molecular dos analitos pode ser facilmente calculada.<sup>48</sup> Ambas técnicas são de ionização suave.

### 3.7.3) GC-MS

A técnica de cromatografia gasosa recorre a um gás como fase móvel e uma fase estacionária sólida (cromatografia gás-sólido) ou líquida (cromatografia gás-líquido). Esta técnica é capaz de separar misturas altamente complexas com base, principalmente, nas diferenças de ponto de ebulição/pressão de vapor e de polaridade. A cromatografia gasosa opera introduzindo uma amostra por meio de uma porta de injeção na entrada (também chamada de injetor). O gás de transporte, que constitui a fase móvel, passa pela entrada e arrasta a amostra para a coluna, onde está localizada a fase estacionária. Por sua vez, a coluna está colocada num forno com temperatura controlada. A separação cromatográfica ocorre à medida que a mistura viaja pela coluna. Quando os componentes separados da amostra saem da coluna entram num detetor, que fornece um sinal eletrónico proporcional à quantidade de analitos eluentes.<sup>44</sup> Na **Figura 21** está representada a estrutura típica de um equipamento de cromatografia gasosa.



**Figura 21:** Representação esquemática dos principais componentes do equipamento de cromatografia gasosa. Adaptado de: Stauffer, Dolan e Newman, 2008.<sup>44</sup>

Geralmente, o gás de transporte é um gás com capacidade de adsorção baixa ou insignificantes tais como, o hidrogênio, hélio ou azoto. A natureza do gás de transporte pode influenciar as características de separação do sistema de cromatografia gasosa e modificar a sensibilidade da detecção. Os injetores podem ser classificados em dois grupos principais: injetores de vaporização e em coluna. Os injetores de vaporização utilizam altas temperaturas (100-300°C) para vaporizar uma amostra líquida rapidamente. Após a vaporização da amostra, ela mistura-se com o gás de transporte e é transportada para a coluna. Os injetores em coluna depositam a amostra diretamente na coluna, ocorrendo a vaporização da amostra durante o aquecimento inicial da coluna.<sup>48</sup>

As colunas para cromatografia gasosa podem ser divididas em dois grupos: colunas empacotadas e colunas capilares (também chamadas tubulares abertas).<sup>60</sup> A coluna empacotada é uma coluna rígida de metal ou vidro preenchida com pequenas partículas que são frequentemente revestidas com uma fina camada de um polímero de elevado peso molecular. O comprimento de uma coluna empacotada é limitado a, aproximadamente, 3 metros por causa das elevadas pressões que são necessárias para manter as taxas de fluxo do gás de transporte nas velocidades necessárias para um desempenho ideal. A coluna capilar é um tubo de sílica fundida de diâmetro interno muito pequeno (geralmente entre 0,20-0,53 mm). A maioria das fases estacionárias da coluna capilar tem ligações cruzadas e covalentes com a superfície de sílica fundida. As colunas empacotadas têm uma capacidade de amostra 10 a 1000 vezes superior à das colunas capilares, o que torna estas colunas a escolha mais

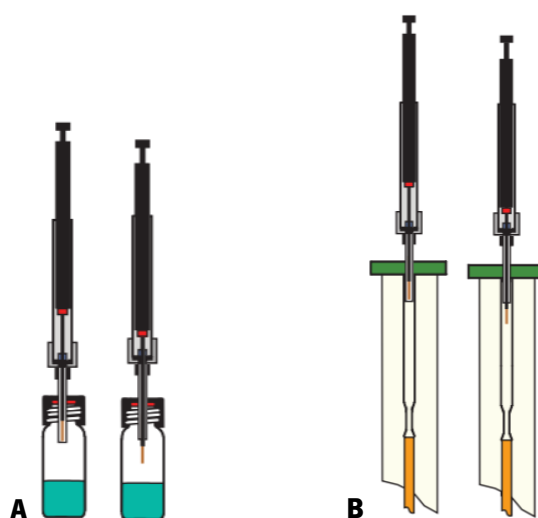
adequada para analitos onde grandes quantidades de amostra precisam ser analisadas. No entanto, as colunas capilares possuem uma capacidade de separação muito elevada, permitindo a resolução de picos em amostras complexas que não são separadas adequadamente por colunas empacotadas. Devido ao melhor desempenho de separação estas colunas têm sido usadas mais frequentemente em cromatografia gasosa do que as colunas empacotadas. Para obter uma separação eficaz a coluna deve ser termostaticada a uma temperatura constante (modo de separação isotérmica) ou pode ser modificada de acordo com um programa de temperatura predeterminado (gradiente de temperatura). A temperatura da coluna é um dos parâmetros mais decisivos na análise de cromatografia gasosa e, por este motivo, a sua regulação exata é de vital importância.<sup>48</sup>

Os detetores interagem com as moléculas de soluto à medida que elas saem da coluna. Esta interação é convertida num sinal elétrico que é enviado a um dispositivo de gravação ou armazenamento de dados, formando-se um cromatograma, isto é, um gráfico da intensidade do sinal em função do tempo decorrido. Muitos detetores diferentes foram desenvolvidos para a deteção sensível e seletiva e a quantificação dos componentes da amostra tais como, o detetor de ionização por chama, captura de eletrões e condutividade térmica.<sup>48</sup>

Ao longo das últimas décadas, os métodos de cromatografia gasosa acoplados com vários sistemas de deteção de MS encontraram aplicação crescente em análises de amostras. Uma das principais vantagens da GC-MS em relação à HPLC-MS é a elevada reprodutibilidade dos espectros de massa gerados usando a técnica de impacto eletrónico (EI). Na técnica de EI, a fragmentação e a carga dos analitos são realizadas pela produção de colisões entre os analitos e os eletrões gerados a partir de um filamento quente (geralmente um filamento de tungsténio ou rénio).<sup>48</sup> Esta técnica é de ionização forte, conferindo maior energia às moléculas, resultando em maior fragmentação.<sup>44</sup> O processo de ionização por EI resulta na produção de espectros de massa muito reprodutíveis de um instrumento para outro, inclusive, existem grandes bibliotecas espectrais de massa e que estão disponíveis para pesquisa de biblioteca de espectros adquiridos de qualquer espectrómetro de massa.<sup>61</sup>

Outras vantagens da GC-MS incluem a deteção ser mais simples e mais sensível do que em cromatografia líquida, dada a maior facilidade de ionização de moléculas na fase gasosa do que na fase líquida, rapidez, facilidade de automatização e maior resolução.<sup>62-64</sup>

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração e/ou pré-concentração especialmente adequada para métodos de análise química onde a cromatografia gasosa ou HPLC são utilizadas para posterior separação, detecção, identificação e quantificação dos analitos da amostra em análise. Esta técnica baseia-se no princípio de adsorção e dessorção e recorre a uma fibra de sílica fundida revestida com adsorvente para concentrar compostos voláteis e semi-voláteis de uma amostra, podendo esta ser líquida, sólida ou gasosa. A fibra é um dos componentes do suporte de fibras - *holder* - e quando esta é exposta a uma amostra os analitos da mesma são adsorvidos para a fibra. Após um determinado tempo de extração, a fibra é removida e inserida diretamente num cromatógrafo para dessorção e análise (**Figura 22**).<sup>65,66</sup>

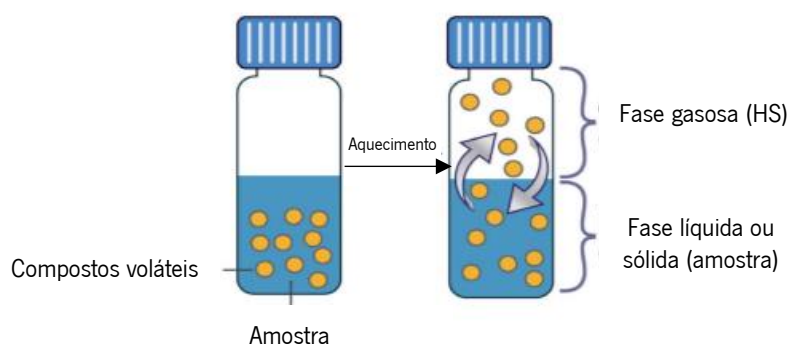


**Figura 22:** Esquema do processo de amostragem da SPME, A) inserção do *holder* no vial da amostra e adsorção dos analitos presentes na amostra para a fibra e B) inserção do *holder* no injetor do cromatógrafo gasoso e posterior dessorção dos analitos para o injetor. Adaptado de: Sparkman, Penton e Kitson, 2011.<sup>67</sup>

A SPME é uma técnica sensível devido ao fator de concentração obtido pela fibra e seletiva devido aos diferentes materiais de revestimento que podem ser usados tais como, polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato, carboxeno e misturas destes materiais.<sup>65</sup> Através do controlo da polaridade e da espessura do revestimento da fibra, a SPME permite a obtenção de resultados altamente consistentes e quantificáveis, mesmo quando os analitos estão presentes em baixas concentrações. Algumas das vantagens desta técnica incluem ser fácil de automatizar, não destrutiva para as amostras e as fibras utilizadas serem reutilizáveis e de baixo custo. Além disso, a operação de extração em SPME pode ser

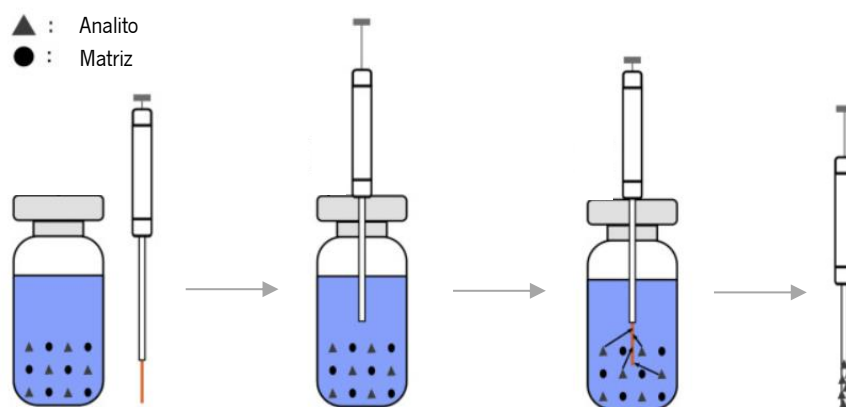
feita por imersão direta, onde a fibra é imersa diretamente na amostra líquida ou gasosa, ou por headspace (HS), onde a fibra é exposta à fase de vapor acima de uma amostra, sendo este modo mais adequado para amostras sólidas.<sup>66</sup>

HS é uma técnica de preparação de amostra para a determinação de compostos voláteis em amostras sólidas e líquidas em que apenas a fase gasosa acima da amostra é introduzida na coluna de cromatografia gasosa, sendo muito utilizada devido à sua simplicidade e por ser um método muito limpo de introdução de analitos voláteis no cromatógrafo. HS pode ser classificado como estático ou dinâmico. Como se pode ver pela **Figura 23** no modo estático a amostra é colocada num *vial* a temperatura ambiente, deixando uma quantidade significativa de espaço livre acima da amostra, em seguida, o *vial* é selado e aquecido. Os compostos voláteis começam a mover-se para a fase gasosa acima da amostra até que um estado de equilíbrio seja alcançado, neste momento a razão das concentrações do analito na fase gasosa e na fase líquida ou sólida é uma constante, sendo esta constante designada como coeficiente de partição. Após o equilíbrio ser alcançado, uma alíquota da fase gasosa da amostra pode ser removida do *vial* com um *holder* e a fibra é introduzida no cromatógrafo. Para libertar os analitos da fibra a mesma é aquecida no cromatógrafo (dessorção térmica). No HS dinâmico, um gás inerte é borbulhado através da amostra e os compostos voláteis são transferidos para uma armadilha de adsorvente, posteriormente, a armadilha é aquecida e os compostos são libertados ou dessorvidos e transferidos para o cromatógrafo. Em seguida, a armadilha é aquecida a uma temperatura mais alta do que a usada durante a etapa de dessorção com o objetivo de remover analitos residuais e humidade. HS dinâmico geralmente permite limites de deteção mais baixos relativamente ao HS estático mas tem a desvantagem de necessitar de maior manutenção.<sup>67</sup>



**Figura 23:** Esquema do princípio da técnica de amostragem do HS estático. Adaptado de: Gong *et al.*, 2019.<sup>68</sup>

Como referido anteriormente, no caso da SPME por imersão direta (DI-SPME) a fibra do *holder* é imersa num pequeno volume da amostra no estado líquido ou gasoso (**Figura 24**). Os analitos da amostra são concentrados no revestimento da fibra sob as condições ideais de trabalho (tempo, temperatura, agitação e pH).<sup>69,70</sup> Após um determinado tempo a concentração do analito na fibra atinge um nível de equilíbrio com o seu ambiente, esta etapa de concentração permite que a quantidade máxima de analito seja retirada nas respetivas condições de amostragem.<sup>71</sup> Posteriormente, a fibra é inserida no injetor do cromatógrafo gasoso para dessorção térmica ou num solvente de dessorção apropriado para posterior análise de HPLC.<sup>69,70</sup> Este modo de SPME é mais habitualmente usado para amostras polares e não-voláteis.<sup>72</sup>

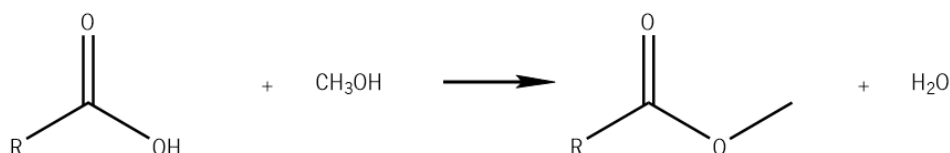


**Figura 24:** Princípio da DI-SPME. Adaptado de: Weggler *et al.*, 2020.<sup>71</sup>

É comum recorrer à técnica de derivatização na cromatografia gasosa de modo a aumentar a volatilidade e estabilidade térmica e diminuir a polaridade dos compostos.<sup>62-64</sup> Também é utilizada para aumentar a sensibilidade e o desempenho do cromatógrafo gasoso para compostos específicos, como, por exemplo, ácidos, álcoois e aminas. Este tipo de compostos é difícil de analisar devido à presença de hidrogénios ativos na sua composição, a sua análise por GC-MS pode induzir uma reação com a superfície interna do injetor ou com a coluna analítica, resultando em picos de rejeição e de baixa resposta. A derivatização remove os hidrogénios ativos destes compostos e substitui-os por outros grupos funcionais, conseqüentemente, aumentando a sua volatilidade e reduzindo o potencial de adsorção quando entram no sistema de cromatografia gasosa.<sup>73</sup>



Existem três métodos de derivatização diferentes, consoante o reagente utilizado e a reação química que ocorre, que são a acetilação, sililação e alquilação. A escolha da técnica de derivatização a utilizar depende de vários fatores, nomeadamente da massa do produto derivatizado, que não deve exceder os limites de deteção do equipamento de GC-MS, e das condições necessárias para que a reação seja completa, garantindo que os produtos sejam obtidos com o maior rendimento possível. Além disso, a técnica escolhida não deve ser seletiva em relação aos componentes presentes numa mistura, assegurando a derivatização de todos eles.<sup>13</sup> A reação de derivatização mais comum é a sililação, que envolve a substituição de um átomo de hidrogénio ativo por um grupo trimetilsilil. Este método é bastante utilizado devido aos derivados trimetilsilil serem muito fáceis de preparar e a reação ser muito rápida.<sup>62-64</sup> A sililação é habitualmente empregada na derivatização de metabolitos tais como, esteróis, álcoois, aminoácidos e monossacarídeos.<sup>74</sup> A acetilação envolve a substituição dos átomos de hidrogénio por grupos acetil e é utilizada para derivatizar álcoois, fenóis e aminas. Por sua vez, a reação de alquilação consiste na adição de um grupo alquilo a um grupo funcional ativo. A reação de alquilação mais comum consiste na conversão de um ácido carboxílico no respetivo éster metílico (**Figura 25**).<sup>62-64</sup>

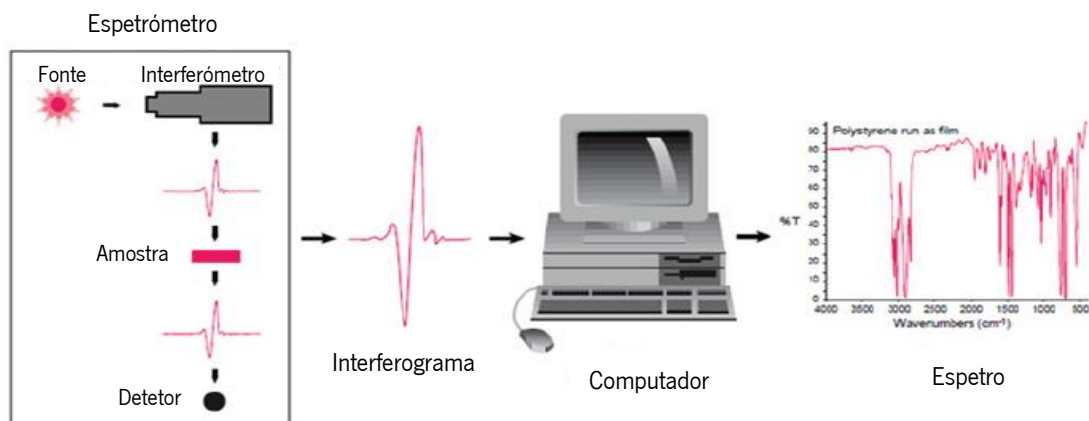


**Figura 25:** Reação química de metilação.

#### 3.7.4) FTIR-ATR

A espectroscopia de infravermelho (IR) auxilia na elucidação e identificação de grupos químicos dos compostos orgânicos e inorgânicos de amostras sólidas, líquidas ou gasosas com base nas ligações químicas que têm níveis de energia e capacidades de alongamento e torção diferentes.<sup>75</sup>

A espectroscopia de IR com transformada de Fourier (FTIR) usa o processo matemático (transformada de Fourier) para traduzir os dados brutos (interferograma) no espectro real. O espectro FTIR é traçado com os valores de intensidade das bandas, que podem ser expressas em transmitância ou absorvância, em função dos valores de número de onda, geralmente, da região do IR médio – MIR (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) – onde vibrações de alongamento e de torção de grupos químicos característicos da amostra surgem. Na **Figura 26** é possível observar um esquema do funcionamento da espectroscopia de FTIR.



**Figura 26:** Representação esquemática do modo de funcionamento da técnica de espectroscopia de FTIR. Adaptado de: Gurumurthy e Ramesh, 2018.<sup>76</sup>

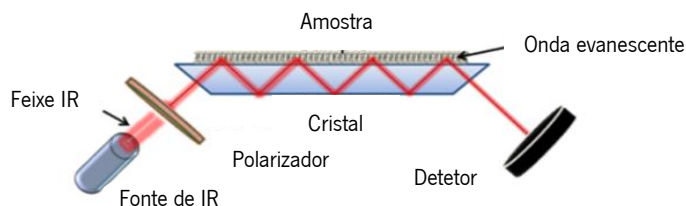
Um espectrômetro FTIR típico inclui uma fonte de IR, interferômetro, detetor, laser e um computador. O feixe policromático de radiação IR que surge da fonte entra no interferômetro onde um padrão especial do sinal - o interferograma - é produzido. O feixe resultante passa pelo compartimento da amostra, onde é transmitido através da amostra ou refletido na sua superfície, dependendo do tipo de análise que está sendo realizada. As frequências específicas de energia, que são exclusivas da amostra, são absorvidas.<sup>77</sup> Depois de passar pelo interferômetro a radiação atinge o detetor, sendo o sinal amplificado e convertido num sinal digital, posteriormente, o sinal é transferido para o computador onde a transformada de Fourier é realizada.<sup>78</sup> Os espectrômetros FTIR podem ser de feixe único ou feixe duplo, produzindo um espectro de transmitância. A maioria dos sistemas multiplica o valor da transmitância por 100 para obtê-la em percentagem, no entanto, a escala de absorvância é cada vez mais usada para análises quantitativas, seguindo a lei de Beer que afirma que há uma relação linear entre a absorvância e a concentração de amostra.<sup>77</sup>

A radiação IR não tem energia suficiente para provocar transições eletrônicas, apenas ocorrem transições vibracionais acompanhadas de transições rotacionais, ocorrendo excitação das moléculas até atingirem um estado vibracional mais elevado. Todas as vibrações de uma ligação ocorrem a uma frequência característica; a espectroscopia de IR mede as frequências de vibração das ligações na molécula, originando um espectro em que a quantidade de luz absorvida pela amostra é medida enquanto a frequência vai sendo variada.

O espectro de IR é característico de cada molécula, mas certos grupos de átomos originam bandas numa gama de frequências - bandas de absorção características dos grupos funcionais - independentemente da estrutura do resto da molécula. O espectro de IR também apresenta uma região de impressão digital. Uma vez que cada molécula possui uma impressão digital única, isto torna a espectroscopia de FTIR uma ferramenta preciosa para identificação química dos compostos (análise qualitativa).<sup>79</sup> O tamanho dos picos no espectro consiste numa indicação direta da quantidade de material presente na amostra o que torna a espectroscopia de FTIR uma ferramenta que pode ser usada, também, em análise quantitativa.<sup>76</sup>

Atualmente, a técnica da refletância total atenuada (ATR) também é usada na região do MIR para resolver problemas específicos para os quais os métodos de transmissão tradicionais não fornecem informações adequadas.<sup>77</sup> ATR é uma das técnicas de amostragem mais populares usadas porque é uma técnica rápida, não destrutiva, não requer preparação de amostra e é muito simples e conveniente de usar.<sup>80,81</sup> ATR permite a análise de amostras sólidas e líquidas e, por ser uma técnica de contacto, é muito usada na análise de superfícies ou materiais demasiado espessos ou altamente absorventes para serem analisados por métodos de transmissão mais tradicionais.<sup>80,81</sup>

Na técnica FTIR-ATR a amostra é depositada sobre um cristal que possui um índice de refração muito elevado e baixa absorção no IR. Os cristais habitualmente podem ser de seleneto de zinco, germânio, silício, diamante e KRS-5 (iodeto de tálio ou brometo de tálio).<sup>81</sup> O feixe IR irá incidir no cristal e sofrer refração no interior do cristal antes de atingir a amostra. A reflexão do feixe será total quando o ângulo de incidência for maior do que o ângulo crítico, sendo este fenómeno denominado de reflexão interna total. Nestas condições, parte do feixe no limite do cristal penetrará na amostra a uma profundidade de alguns micrómetros sob a forma de “onda evanescente”, ocorrendo a redução da intensidade da luz refletida, sendo este fenómeno chamado de refletância total atenuada.<sup>81</sup> Após uma ou várias reflexões o feixe IR atenuado sai do cristal e segue em direção ao detetor, onde é analisado originando o espectro de IR. Um esquema deste princípio de FTIR-ATR é demonstrado na **Figura 27**. Nos espectros obtidos por ATR a espessura da amostra não influencia a intensidade das bandas de absorção pois apenas a zona interfacial da amostra vai interagir com o feixe IR refletido no cristal, sendo estes semelhantes aos espectros de IR obtidos por transmissão relativamente à posição das bandas, mas variando em termos de intensidade das mesmas.



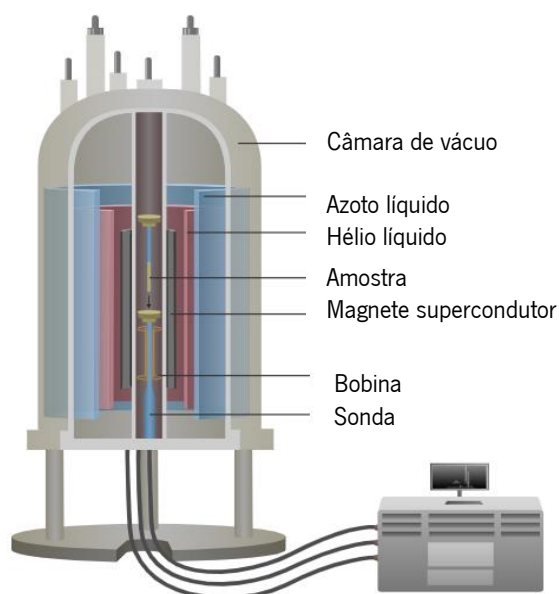
**Figura 27:** Representação esquemática do sistema de FTIR-ATR. Adaptado de: Ausili, Sánchez e Gómez-Fernández, 2015.<sup>82</sup>

### 3.7.5) RMN

A RMN é uma técnica espectroscópica utilizada para a determinação de estruturas químicas das moléculas.<sup>83</sup> Além de permitir obter informação estrutural também se pode obter informação física, química e eletrônica das moléculas e informação acerca da estrutura tridimensional e da dinâmica das moléculas no estado líquido ou sólido de um modo não destrutivo.<sup>84</sup>

A RMN de próton (<sup>1</sup>H-RMN) baseia-se na absorção de energia na gama das radiofrequências por parte do núcleo de hidrogénio, na presença de um campo magnético forte, permitindo diferenciar prótons que possuem diferentes ambientes químicos numa molécula através das suas frequências.<sup>83,84</sup> Efetivamente, a posição onde se situa o sinal de frequência de um núcleo depende das características do próprio núcleo, mas depende também da sua vizinhança química e, conseqüentemente, da estrutura da molécula em que esse átomo está inserido, ou seja, prótons ligados a diferentes grupos funcionais têm valores de frequência diferentes.<sup>84</sup> Os valores de frequência são apresentados num espectro de RMN como "desvios químicos", que são definidos como diferenças de frequência em relação a uma referência (tetrametilsilano - TMS) e expressos em partes por milhão (ppm).<sup>83</sup>

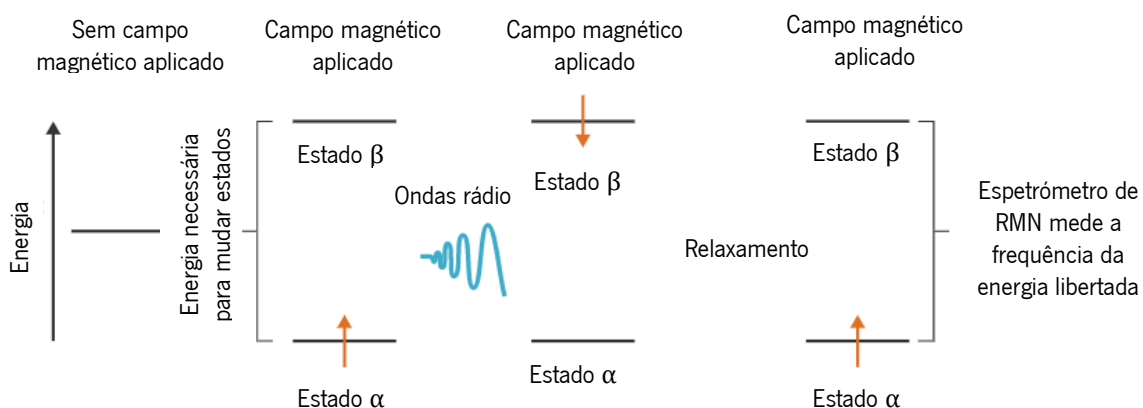
A RMN requer *spin* nuclear, que é o momento magnético resultante do momento angular total de certos núcleos, como aqueles com um número ímpar de prótons ou neutrões. Um espectrómetro de RMN é um instrumento que usa o momento magnético para obter informações sobre a estrutura de um composto.<sup>85</sup> O espectrómetro é basicamente constituído por um ímã capaz de criar um campo homogêneo numa região onde é introduzida a amostra, um sistema de transmissão-recepção de radiofrequências, uma sonda e um computador (**Figura 28**).<sup>84</sup>



**Figura 28:** Representação esquemática de um espectrômetro de RMN. Adaptado de: Course Hero.<sup>85</sup>

Os *spins* individuais, que são normalmente aleatórios na orientação, alinham-se paralelamente ao campo magnético aplicado (com o campo) ou antiparalelo (contra o campo). Como podemos ver pela **Figura 29**, o estado energético que é paralelo ao campo e requer menos energia é chamado de estado  $\alpha$ , em contrapartida, o estado energético que é antiparalelo ao campo e requer energia mais alta é chamado de estado  $\beta$ . Os prótons podem absorver energia para mudar o seu *spin* do estado  $\alpha$  para o estado  $\beta$ . O espectrômetro de RMN envia pulsos de ondas de rádio através do campo magnético para fornecer aos prótons a energia necessária para alterar os *spins*, quando isto ocorre o próton está em ressonância com o campo nuclear, ou seja, está em RMN. Posteriormente, é libertada energia pelos prótons quando eles relaxam de volta ao estado fundamental (estado  $\alpha$ ) e essa energia é registada pelo espectrômetro.<sup>85</sup>

A RMN é uma técnica altamente reprodutível que fornece bom poder de quantificação e facilidade de manuseamento da amostra. Algumas limitações desta técnica são as dificuldades na automação e nas análises de alto rendimento.<sup>86,87</sup> Experiências de RMN com outros núcleos para além do hidrogénio podem ser realizadas, como o carbono ( $^{13}\text{C}$ ), azoto ( $^{15}\text{N}$ ) e fósforo ( $^{31}\text{P}$ ). A sensibilidade espectral é maior em  $^1\text{H}$ -RMN relativamente à RMN de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) devido à elevada abundância natural e maior razão giromagnética de hidrogénio em relação a  $^{13}\text{C}$ . No entanto,  $^{13}\text{C}$ -RMN tem uma maior seletividade espectral devido à maior dispersão dos “desvios químicos”, permitindo uma caracterização estrutural mais detalhada.<sup>88</sup>

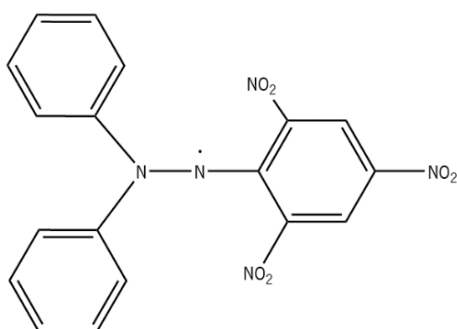


**Figura 29:** Representação esquemática do princípio energético da técnica RMN. Adaptado de: Course Hero.<sup>85</sup>

Também podem ser realizadas experiências com vários níveis de correlação usando RMN uni e bidimensional, bem como espectroscopia de correlação, espectroscopia de correlação total e espectroscopia quântica simples heteronuclear. As técnicas bidimensionais tem a vantagem de melhorar a sensibilidade e reduzir os tempos de aquisição.<sup>87</sup>

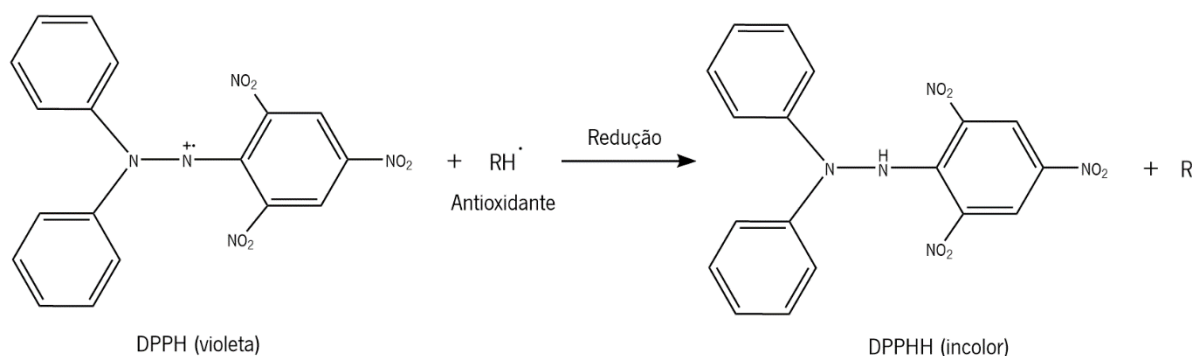
### 3.8) Ensaio DPPH

O ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é utilizado para determinar a atividade antioxidante de amostras através do uso de um radical livre, estável à temperatura ambiente, com uma cor violeta intensa – o composto DPPH (**Figura 30**). Este ensaio colorimétrico foi desenvolvido por Blois em 1958 e baseia-se na medição da capacidade de eliminação dos antioxidantes em relação ao radical DPPH.<sup>89</sup>



**Figura 30:** Estrutura química do composto DPPH.

O radical DPPH é caracterizado por apresentar deslocalização do elétron extra sobre a molécula como um todo, deste modo, ele não dimeriza ao contrário da maioria de outros radicais livres. Esta deslocalização dá origem à cor violeta intensa, com uma absorção em solução de etanol a 517 nm. Como se pode ver pela **Figura 31** ao misturar a solução de DPPH com moléculas antioxidantes, o elétron ímpar do átomo de azoto no DPPH é reduzido ao receber um átomo de hidrogénio dos antioxidantes ocorrendo a conversão do radical DPPH para 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPHH).<sup>89,90</sup> Esta redução induz a perda da cor violeta, dando origem a uma solução de etanol incolor, e conseqüentemente, ocorre a diminuição da absorção a 517 nm, que é proporcional à atividade antioxidante da amostra examinada.<sup>90,91</sup> Deste modo, a diminuição da absorvância dos radicais DPPH pode ser monitorizada para avaliar o potencial antioxidante de amostras.



**Figura 31:** Reação química da redução do radical DPPH para DPPHH.

Os resultados deste ensaio são expressos em termos de percentagem do DPPH reduzido num estado de equilíbrio (DPPHr). Esta percentagem calcula-se usando os valores da absorvância registada no estado de equilíbrio ( $Abs_e$ ) e absorvância inicial (registada a  $t = 0$  min,  $Abs_i$ ) do seguinte modo:

$$\text{(Equação 3)} \quad \%DPPHr = \left[ \frac{(Abs_i - Abs_e)}{Abs_i} \right] \times 100$$

O método DPPH é uma maneira fácil e rápida de avaliar antioxidantes por espectrofotometria, sendo útil para avaliar vários produtos ao mesmo tempo.<sup>92</sup> Além disso, é um método simples, barato e amplamente utilizado para medir a capacidade de compostos de atuarem como retiradores de radicais livres ou doadores de hidrogénio e também pode ser usado para quantificar antioxidantes em sistemas biológicos complexos, para amostras sólidas ou líquidas.<sup>90</sup> Este ensaio pode ser utilizado em solventes orgânicos aquosos e apolares para examinar antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos.<sup>93</sup>

### **3.9) Ensaio da microdiluição**

Um dos primeiros métodos de teste de suscetibilidade antimicrobiana foi o da macrodiluição, também chamado de método de diluição em tubo. Este procedimento envolve a preparação de diluições de antibióticos em série duas vezes (por exemplo, 1, 2, 4 e 8 mg/mL) em tubos de ensaio contendo meio de crescimento líquido.<sup>94,95</sup> Posteriormente, estes tubos são inoculados com uma suspensão bacteriana padronizada. Após a incubação durante a noite, os tubos são examinados quanto ao crescimento bacteriano visível e determina-se a concentração mínima inibitória (MIC) por medições de intensidade de fluorescência ou turbidez do tubos.<sup>96</sup> A MIC representa a menor concentração de antibiótico que inibe completamente o crescimento de microrganismos.<sup>97</sup>

A vantagem desta técnica consiste na geração de um resultado quantitativo – a MIC. As principais desvantagens do método de macrodiluição são a possibilidade de erros na preparação das soluções antibióticas e a quantidade relativamente grande de reagentes, espaço e tempo necessários para cada ensaio.<sup>96</sup> Por este motivos foi desenvolvido um método de macrodiluição miniaturizado através do uso de placas de poços de plástico para preparar as suspensões celulares. A este método deu-se a designação método da microdiluição.

Geralmente, o método da microdiluição envolve a utilização de microplacas de 96 poços, permitindo o estudo de um máximo de 12 antibióticos com diluições em série oito vezes numa única microplaca. Baixos volumes de antibióticos diluídos são introduzidos nos poços da microplaca, após a adição de uma pequena quantidade de suspensão bacteriana padronizada a cada poço a microplaca é incubada durante a noite. Após a incubação determina-se a MIC. Com este método é possível a preparação de centenas de microplacas idênticas a partir de um único conjunto mestre de diluições num período de tempo relativamente curto.<sup>95,98</sup> Outras vantagens deste método incluem o baixo custo e a redução de espaço de trabalho e reagentes.<sup>99,100</sup>



## Capítulo 4. Parte experimental

Neste capítulo são apresentadas as características dos materiais, equipamentos e reagentes manuseados ao longo do trabalho laboratorial, assim como os métodos experimentais utilizados. Este capítulo encontra-se dividido em cinco subcapítulos principais, o primeiro dedicado às análises da qualidade de amostras de *pitch*, o segundo dedicado à obtenção das amostras para serem analisadas por ESI-MS/MS, HPLC-MS, GC-MS, FTIR-ATR e RMN, o terceiro aborda estas técnicas analíticas utilizadas para caracterizar os compostos neutros presentes nestas amostras e o quarto e cinco subcapítulos abordam a avaliação da atividade antioxidante e da atividade antibacteriana das amostras, respetivamente.

#### 4.1) Análises da qualidade de amostras de *pitch*

Os parâmetros de controlo da qualidade determinados para as amostras de *pitch* ibérica (*Pinus pinaster*) e *pitch* brasileira (*Pinus elliottii*) foram índice de acidez, cor, viscosidade, cristalização, ponto de amolecimento e ponto de turvação. Todos os parâmetros foram determinados de acordo com procedimentos laboratoriais internos da empresa que estão descritos detalhadamente no **Anexo A**.

##### 4.1.1) Material, equipamento e reagentes

Na **Tabela 2** e **Tabela 3** estão apresentadas as características de todos os materiais e equipamentos e as características dos reagentes utilizados durante as análises de qualidade das amostras de *pitch*, respetivamente.

**Tabela 2:** Materiais e equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais e respetivas marcas e incertezas.

Material/Equipamento	Marca	Incerteza
Balança analítica	Mettler Toledo	0,0001 g
Espátulas	SELECTA	–
Pipetas de Pasteur	Labbox	–
Balões Erlenmeyer de vidro neutro de 250 mL	NORMAX	–
Proveta de 25 mL	NORMAX	0,25 mL
Bureta automática graduada de 25 mL	EM	0,045 mL
Colorímetro	Lovibond 3-FIELD	–

Tubos de ensaio de vidro neutro de 7 mL com tampa de silicone	Labbox	–
Viscosímetro	Brookfield DV-E	5%
<i>Termosel, spindle</i> e cuba metálica	Brookfield DV-E	–
Tubos de fundo redondo com rolha em rosca	Labbox	–
Suporte para tubos	Kartell	–
Cadinhos de porcelana	HALDENWANGER	–
Placa de aquecimento	SBS	–
Gobelé de 600 mL	LBG	–
Equipamento de medição do ponto de amolecimento	<i>Normalab</i> NBA440	2°C
Argolas e esferas de aço com 9,53 mm de diâmetro	STANHOPE-SETA	–
Chemotronic Cool	Novomatics	1°C
Tubos de ensaio de vidro do equipamento Chemotronic	Novomatics	–
Agitador magnético	Novomatics	–

Os reagentes que foram utilizados durante os procedimentos experimentais têm alguns perigos associados e devem ser manuseados com as devidas precauções. Estas informações estão presentes no **Anexo B**. Todos reagentes usados são de grau analítico (pureza superior a 90%) com a exceção do KOH, que tem uma pureza de 86,8%.

**Tabela 3:** Nome, fórmula química, massa molar e número do Serviço de Resumos Químicos (CAS) dos reagentes utilizados nos procedimentos experimentais.

Nome	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	CAS
Hidróxido de potássio	KOH	56,10	1310-58-3
Fenolftaleína	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	318,30	77-09-8
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	64-17-5
Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92,14	108-88-3
Acetona	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	58,08	67-64-1
Glicerina	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	92,09	56-81-5
<i>Test oil</i> /PKWF 6/9 AF	–	–	–

## 4.2) Obtenção das frações insaponificáveis de *pitch*

As amostras de *pitch* contêm uma menor quantidade de ácidos resínicos relativamente às colofônias que são submetidas ao processo de refinação e, conseqüentemente, uma maior concentração de compostos neutros. Uma vez que um dos objetivos deste trabalho é caracterizar e identificar os compostos neutros presentes na *pitch* optou-se por realizar um procedimento experimental para obter frações insaponificáveis da *pitch*. As frações insaponificáveis englobam os compostos não ácidos e não saponificáveis tais como, aldeídos, éteres, álcoois, hidrocarbonetos, entre outros.

As frações insaponificáveis de *pitch* ibérica e *pitch* brasileira constituem as amostras a serem analisadas por ESI-MS/MS, HPLC-MS, GC-MS, FTIR-ATR e RMN.

### 4.2.1) Material, equipamento e reagentes

Na **Tabela 4** e **Tabela 5** estão apresentadas as características de todos os materiais e equipamentos e as características dos reagentes utilizados durante o procedimento experimental da obtenção das frações insaponificáveis da *pitch*, respetivamente.

**Tabela 4:** Materiais e equipamentos utilizados no procedimento experimental e respetivas marcas e incertezas.

<b>Material/Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Incerteza</b>
Balança analítica	Mettler Toledo	0,0001 g
Espátulas	SELECTA	–
Balão Erlenmeyer de vidro neutro de 500 mL com rolha esmerilada	Labbox	–
Balão Erlenmeyer de vidro neutro de 300 mL	SCHOTT DURAN	–
Balão volumétrico de 1000 mL	Linex	0,4 mL
Balão volumétrico de 100 mL	Linex	0,1 mL
Esferas de vidro de 6 mm	Labbox	–
Provetas de 100 mL	Linex	1 mL
Condensador de refluxo	Linex	–
Placa de aquecimento	Labbox instruments H20SQC series	–

Ampola de decantação de 500 mL	Labbox	–
Suporte, garras, anel e noz	SELECTA	–
Gobelés de 250 mL	LBG	–
Gobelé de 400 mL	LBG	–
Recipiente redondo de vidro de 150 mm de diâmetro	Labbox	–
Placa de Petri	Linex	–
Estufa	WTB binder	–
Parafilme	BEMIS	–

Os reagentes utilizados apresentam alguns perigos e devem ser manuseados com as devidas precauções que estão descritas no **Anexo B**. Todos reagentes usados são de grau analítico com a exceção do KOH, que tem uma pureza de 86,8%.

**Tabela 5:** Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados no procedimento experimental.

Nome	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	CAS
Hidróxido de potássio	KOH	56,10	1310-58-3
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	64-17-5
Água destilada	H <sub>2</sub> O	18,01	7732-18-5
Éter etílico	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74,12	60-29-7
Hidróxido de sódio	NaOH	39,99	1310-73-2

#### 4.2.2) Método experimental

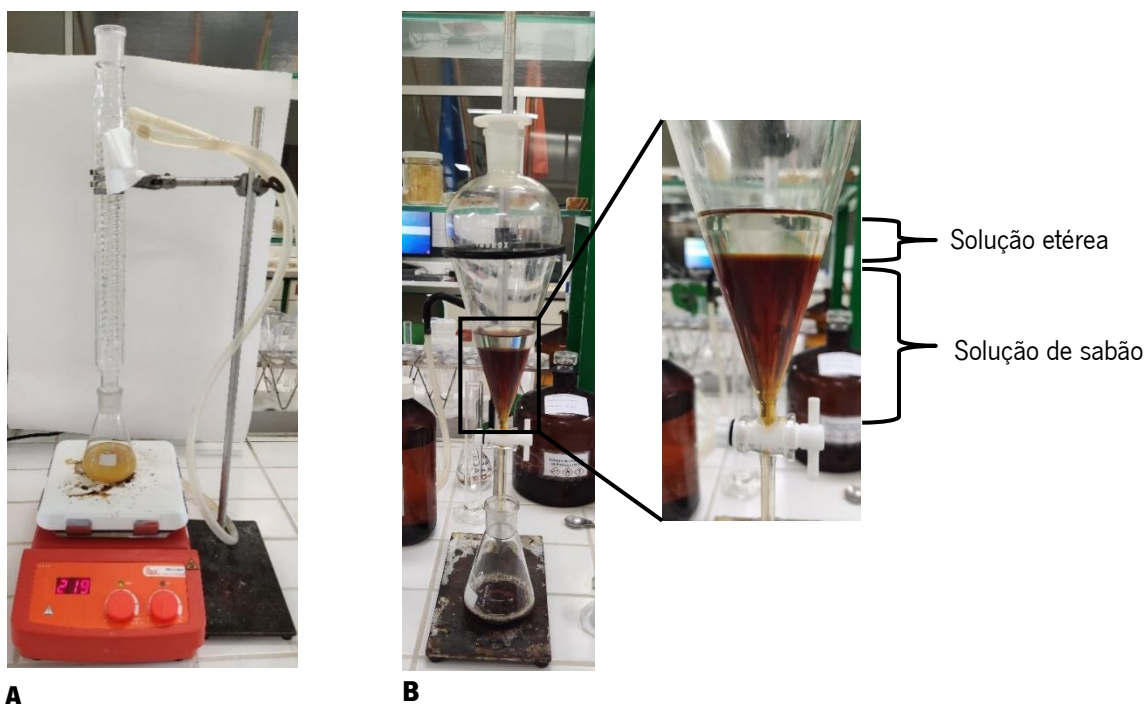
Para obter as frações insaponificáveis da *pitch* realizou-se o procedimento “Determinação da Fração de Insaponificáveis” da empresa Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A. com algumas alterações. As soluções preparadas para este procedimento consistiram na solução etanólica de KOH 0,5 N que foi feita através da dissolução de 33 g de KOH, em pellets, em 1 L de etanol a 96% num balão volumétrico de 1 L, e a solução aquosa de NaOH a 1% feita através da dissolução de 1 g de NaOH em 100 mL de água destilada num balão volumétrico de 100 mL.

O procedimento foi efetuado do seguinte modo:

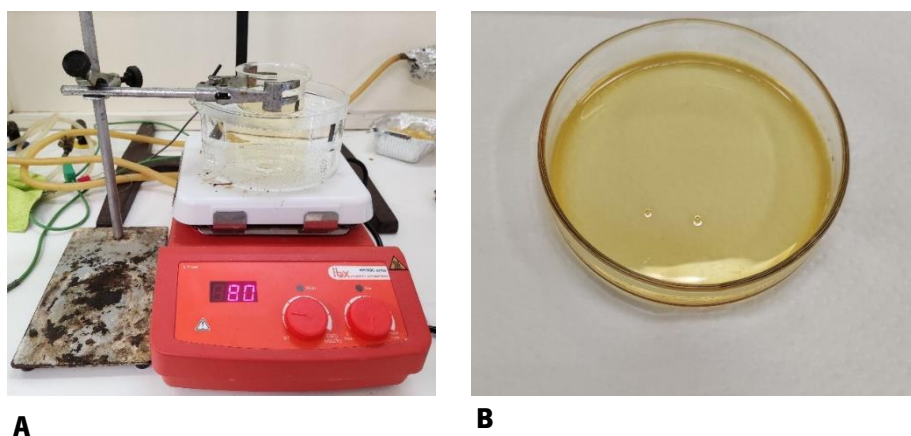
- 1) Pesar 10 g de *pitch* num balão Erlenmeyer esmerilado de 500 mL;
- 2) Adicionar 100 mL da solução de KOH 0,5 N e 100 mL de água destilada ao balão. Introduzir oito esferas de vidro;
- 3) Ligar o Erlenmeyer ao condensador e colocá-lo na placa de aquecimento a 250°C. Abrir a torneira para haver passagem de água pelo condensador. Após o início da ebulição deixar refluxar durante 1 h e 30 min;
- 4) Desligar o condensador e retirá-lo. Baixar a temperatura da placa de modo a não ocorrer ebulição e deixar evaporar lentamente até que o volume no balão diminua 1/4;
- 5) Transferir o líquido concentrado quente para a ampola de decantação de 500 mL. Lavar o balão Erlenmeyer com 20 mL de água destilada quente e transferir esta água para a ampola. Repetir esta lavagem mais duas vezes;
- 6) Quando o líquido arrefecer adicionar 100 mL de solução aquosa de NaOH e agitar lentamente. Após a agitação deixar o líquido repousar durante alguns minutos;
- 7) Verter 80 mL de éter etílico na ampola e extrair, com agitação forte, durante 1 min. Ao longo da extração libertar a pressão na ampola retirando a tampa durante alguns segundos;
- 8) Deixar repousar até que haja separação em duas fases (**Figura 32.B**) – a solução de sabão (fase inferior) e a solução etérea (fase superior);
- 9) Recolher para um balão Erlenmeyer de 300 mL a solução de sabão e a solução etérea para o gobelé de 250 mL;
- 10) Transferir a solução de sabão do balão para a ampola. Repetir os passos 7-10 mais três vezes com 60 mL de éter etílico de cada vez. Juntar o extrato etéreo obtido em cada extração ao gobelé que contém o extrato obtido na primeira extração;

- 11) Transferir os extratos etéreos do gobelé para a ampola, lavar o gobelé duas vezes com éter etílico e juntar à ampola;
- 12) Adicionar 100 mL de água destilada à ampola, agitar por 30 s e deixar repousar até ocorrer separação das fases. Rejeitar a fase aquosa (fase inferior) para um gobelé de 400 mL. Repetir mais duas vezes esta lavagem usando 100 mL de água destilada de cada vez;
- 13) Transferir o extrato etéreo presente na ampola para um gobelé de 250 mL. Lavar a ampola com 30 mL de éter etílico e juntar ao gobelé;
- 14) Colocar um recipiente com água na placa de aquecimento a 80°C. Quando a água estiver quente introduzir o gobelé no banho de água com o auxílio do suporte, garras e noz (**Figura 33.A**). Deixar evaporar o éter presente no gobelé até à secura;
- 15) Após a evaporação do éter transferir o resíduo para uma placa de Petri e colocar a placa na estufa a 160°C durante 30 min. Retirar a placa da estufa, deixar arrefecer até à temperatura ambiente e cobrir a sua superfície com parafilme.

A realização deste procedimento experimental permitiu obter, aproximadamente, 1 g de fração insaponificável de *pitch* ibérica e 0,8 g de fração insaponificável de *pitch* brasileira, o que significa que a *pitch* ibérica e a *pitch* brasileira contém cerca de 10% e 8% de compostos neutros na sua composição, respetivamente. Doravante, a amostra de fração insaponificável de *pitch* ibérica será designada de amostra ibérica e a amostra de fração insaponificável de *pitch* brasileira será designada de amostra brasileira.



**Figura 32:** Fotografia da A) montagem do condensador do refluxo adaptado ao balão Erlenmeyer e B) montagem da ampola de decantação para a etapa de extração.



**Figura 33:** Fotografia da A) montagem do equipamento para a etapa da evaporação do éter e B) placa de Petri contendo a amostra.

#### 4.3) Caracterização dos compostos neutros das frações insaponificáveis de *pitch*

A caracterização dos compostos neutros presentes nas amostras ibérica e brasileira foi efetuada com recurso às técnicas de ESI-MS/MS, HPLC-MS, GC-MS, FTIR-ATR e RMN.



### 4.3.1) ESI-MS/MS e HPLC-MS

#### 4.3.1.1) Material, equipamento e reagentes

As características de todos os materiais e equipamentos utilizados nas análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS estão apresentadas na **Tabela 6**. As características dos reagentes utilizados estão exibidas na **Tabela 7**. Todos reagentes usados são de grau analítico com a exceção do ácido abiético, que tem uma pureza de 85%.

**Tabela 6:** Materiais e equipamentos utilizados nas análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS e respectivas marcas e incertezas.

<b>Material/Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Incerteza</b>
Balança analítica	Precisa 40SM-200A	0,00001 g
Espátulas	SELECTA	–
Pipetas de Pasteur de vidro de 230 mm de comprimento	NORMAX	–
Balões Erlenmeyer de 150 mL e 50 mL	Linex	–
Provetas de 100 mL	Linex	1 mL
Provetas de 50 mL	Linex	0,50 mL
Espetrômetro de massa	Thermo Finnigan LXQ	–
Cromatógrafo	Thermo Finnigan Surveyor	–
Sonicador	Struers Metason 60	–
Seringa de 500 µL	Hamilton Company	–
Vials de dimensões 45 × 14,75 mm	ALWSCI Technologies	–
Tubos Falcon de 50 mL	DELTALAB	–
Centrifugadora	HERMLE Z 300	–
Filtros de membrana de nylon com tamanho de poro de 0,45 µm	BRANCHIA	–
Bomba de vácuo	BUCHI	–
Estufa	memmert	–

**Tabela 7:** Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados nas análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS.

Nome	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	CAS
Ácido acético glacial	$C_2H_4O_2$	60,05	64-19-7
Metanol	$CH_4O$	32,04	67-56-1
Éter etílico	$C_4H_{10}O$	74,12	60-29-7
Água ultra-pura	$H_2O$	18,02	7732-18-5
Acetonitrilo	$C_2H_3N$	41,05	75-05-8
Ácido abiético	$C_{20}H_{30}O_2$	302,50	514-10-3
Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	282,50	112-80-1
Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	256,42	57-10-3
Acetato de linalilo	$C_{12}H_{20}O_2$	196,29	115-95-7
2-amino-1,3,4-octadecanotriol	$C_{18}H_{39}NO_3$	317,50	13552-11-9
Hidrato de quercetina	$C_{15}H_{10}O_7 \cdot xH_2O$	320,25	849061-97-8
Hidrato de (+)-catequina	$C_{15}H_{14}O_6 \cdot xH_2O$	308,28	88191-48-4

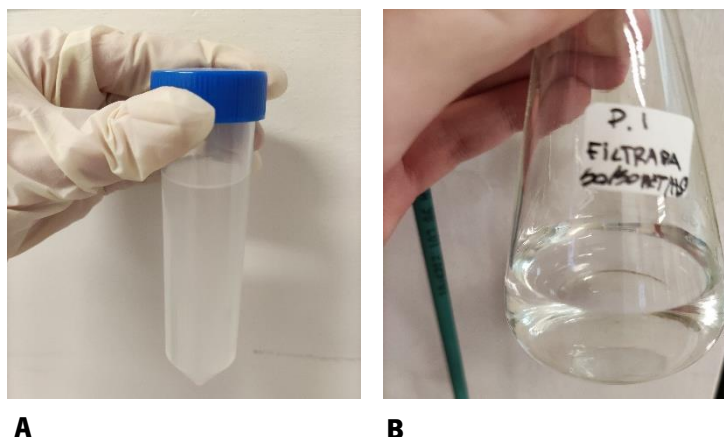
#### 4.3.1.2) Métodos experimentais

As soluções preparadas para as análises de HPLC-MS consistiram em soluções de 100 mg de amostra ibérica e de amostra brasileira dissolvidas em 100 mL dos solventes metanol e éter etílico de razão 80:20. A adição do éter etílico foi necessária para facilitar a dissolução da *pitch*. Recorreu-se ao uso de banho de ultrasons durante 55 min para ocorrer a dissolução completa das amostras. Também se tentou dissolver 100 mg das amostras em 100 mL dos solventes metanol e água de razão 50:50. No entanto, constatou-se que as soluções ficaram turvas. O facto da *pitch* demorar a dissolver no metanol e apresentar turbidez na presença de água demonstra que a composição deste material é maioritariamente apolar, o que pode dificultar a sua análise por ESI-MS. De modo a obter uma solução contendo os compostos polares presentes na *pitch* recorreu-se à sonicação, centrifugação e filtração a vácuo destas soluções. Estas três etapas realizaram-se da seguinte forma:

- 1) Introduzir o balão Erlenmeyer contendo a solução dentro do sonicador. Manter o recipiente no banho de ultrasons durante 1 h;

- 2) Transferir 40 mL de solução para um tubo Falcon. Inserir os tubos na centrífuga. Centrifugar as soluções durante 30 min a 7000 rpm. Após a centrifugação verifica-se a precipitação da solução no fundo do tubo. Estes precipitados sólidos são apolares;
- 3) Recorrer ao equipamento da bomba de vácuo e a filtros de membrana de nylon para realizar a filtração a vácuo da solução. Após a filtração a vácuo obtém-se uma solução límpida como se pode ver na **Figura 34.B**;
- 4) Em seguida, colocar os tubos Falcon na estufa a 40°C durante 2-3 h para os precipitados secarem. Deste modo, os precipitados sólidos apolares são recuperados. Posteriormente, estes serão analisados por FTIR-ATR.

As soluções filtradas e as soluções em metanol e éter etílico de amostra ibérica e amostra brasileira também foram analisadas por ESI-MS/MS.



**Figura 34:** Fotografia do A) tubo Falcon contendo a solução de amostra ibérica após a etapa de sonicação e B) balão Erlenmeyer contendo a solução após as etapas de centrifugação e filtração a vácuo.

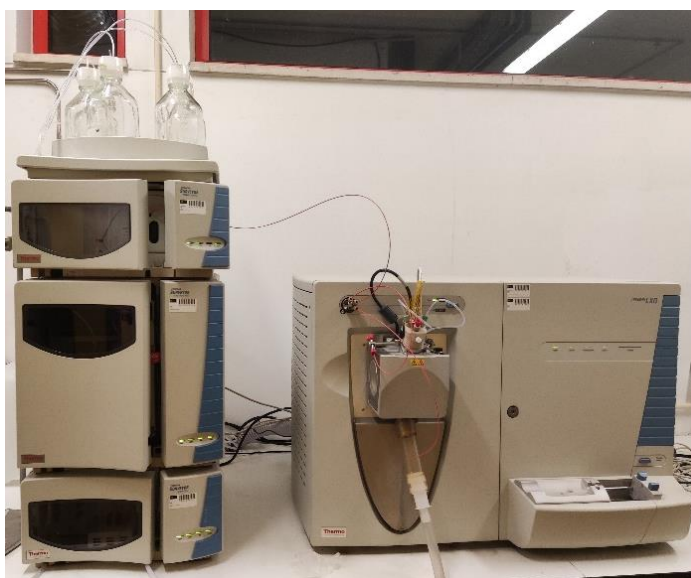
Adicionalmente prepararam-se soluções de sete padrões diferentes:

- Ácido abiético, Thermo Scientific
- Ácido oleico, Thermo Scientific
- Ácido palmítico, Thermo Scientific
- Acetato de linalilo, Acros Organics

- 2-amino-1,3,4-octadecanotriol, Sigma-Aldrich
- Hidrato de quercetina, Aldrich
- Hidrato de (+)-catequina, TCL

Para preparar estes padrões dissolveu-se 30 mg de cada um em 100 mL de metanol com a exceção do hidrato de (+)-catequina em que se dissolveu 30 mg do mesmo em 100 mL de metanol e água de razão 50:50. Estes padrões foram analisados por HPLC-MS.

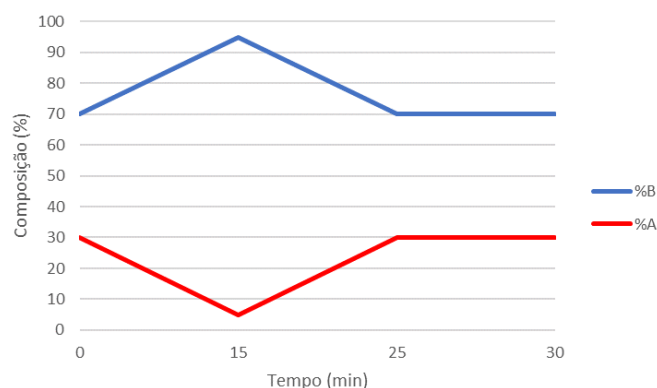
As análises de HPLC-MS foram realizadas no cromatógrafo Thermo Finnigan Surveyor composto por um detetor de matriz de fotodíodos (PDA) Plus, um Autosampler Plus e um LC Pump Plus, acoplado ao espectrómetro de massa Thermo Finnigan LXQ (**Figura 35**). Os compostos foram separados numa coluna de fase reversa C18 Phenomenex (Synergi 4  $\mu$ m Hydro-RP 80A, 150 mm x 4,60 mm, com um tamanho de partículas de 4  $\mu$ m).



**Figura 35:** Fotografia dos equipamentos utilizados nas análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS.

A fase móvel foi constituída por água com 0,2% de ácido acético glacial (eluente A) e acetonitrilo (eluente B). O fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL/min nas condições de gradiente que se podem observar na **Figura 36**: início da injeção 30% de A e 70% de B, dos 0 aos 15 min de 30% a 5% de A, dos 15 aos 25 min de 5% a 30% de A, dos 25 aos 30 min 30% de A. O volume injetado para cada amostra foi de 25  $\mu$ L. O tempo de análise de cada amostra foi de 30 min para cada modo de ESI (positivo e negativo). Entre análises de soluções diferentes a seringa do equipamento foi limpa com uma solução de lavagem (50:50 água/acetonitrilo). Dissociação induzida por colisão foi utilizada para fragmentar os iões. Usou-

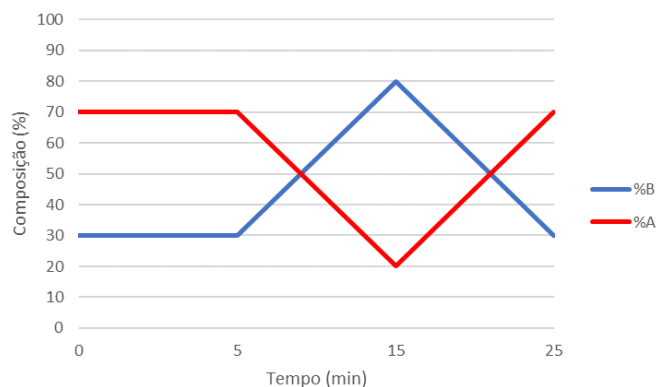
se como gás de nebulização o azoto. A energia de colisão normalizada foi de 35 V e o intervalo de massas foi de 50-2000 m/z. O *software* utilizado para analisar os cromatogramas foi o Xcalibur. Estas condições experimentais foram empregues para analisar as soluções dos padrões ácido abiético, ácido oleico, ácido palmítico, acetato de linalilo, 2-amino-1,3,4-octadecanotriol e hidrato de quercetina e as soluções de amostra ibérica e amostra brasileira em metanol e éter etílico.



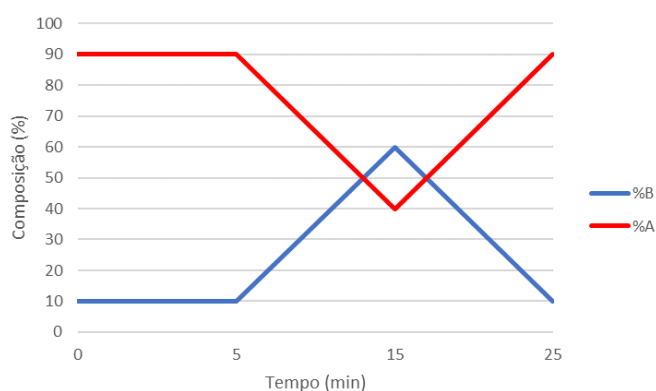
**Figura 36:** Gráfico da composição dos eluentes A e B em função do tempo de análise das soluções dos padrões ácido abiético, ácido oleico, ácido palmítico, acetato de linalilo, 2-amino-1,3,4-octadecanotriol e hidrato de quercetina e das soluções 80:20 de metanol e éter etílico de amostra ibérica e amostra brasileira.

No caso da solução de hidrato de (+)-catequina e das soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira as condições experimentais usadas são iguais às descritas acima com a exceção do tempo de análise, intervalo de massas e gradiente. O tempo de análise de cada amostra foi de 25 min para cada modo de ionização e o intervalo de massas foi de 50-2000 m/z e 50-1000 m/z para o modo de ionização positivo e negativo, respetivamente. Quanto ao gradiente procedeu-se do seguinte modo: início da injeção 70% de A e 30% de B, dos 0 aos 5 min 70% de A, dos 5 aos 15 min de 70% a 20% de A, dos 15 aos 25 min de 20% a 70% de A (**Figura 37**). Adicionalmente, obtiveram-se resultados nos comprimentos de onda do PDA de 200 a 700 nm enquanto os espetros de UV foram obtidos a 210 nm e 254 nm no canal A e B, respetivamente.

Também se fez uma segunda análise de HPLC-MS das soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira nos modos de ionização positivo e negativo. Esta segunda análise foi feita com um gradiente diferente relativamente à análise das soluções filtradas descrita previamente, tendo-se procedido da seguinte maneira: início da injeção 90% de A e 10% de B, dos 0 aos 5 min 90% de A, dos 5 aos 15 min de 90% a 40% de A, dos 15 aos 25 min de 40% a 90% de A (**Figura 38**).



**Figura 37:** Gráfico da composição dos eluentes A e B em função do tempo de análise da solução de hidrato de (+)-catequina e das soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira.



**Figura 38:** Gráfico da composição dos eluentes A e B em função do tempo de análise das soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira.

Para a obtenção dos espectros de massa dos picos dos cromatogramas recorreu-se à utilização do espectrómetro de massa. A fonte de ionização utilizada foi o ESI em modo positivo e negativo e o analisador de massa foi a armadilha iónica linear. O método experimental aplicado para todas as análises de HPLC-MS seguiu as seguintes condições: voltagem da fonte de ionização a 5 kV, voltagem do capilar a 35 V, temperatura do capilar a 275°C e voltagem da lente tubular a 110 V. Também se realizaram injeções diretas das amostras no espectrómetro de massa para se efetuar as análises de ESI-MS/MS. O fluxo de introdução foi de 10 µL/min, foram usadas energias de colisão que variaram entre 12 e 23 V e o intervalo de massas foi dos 50-2000 m/z.

A identificação dos compostos presentes nas amostras foi feita pela comparação dos padrões de fragmentação observados nos espectros de massa com os espectros das bibliotecas MassBank Europe, mzCloud e MassBank of North America. As probabilidades mencionadas na secção dos resultados são da compatibilidade dos espectros de massa das amostras com os espectros dos compostos da biblioteca mzCloud. A elucidação das possíveis estruturas dos fragmentos obtidos nos espectros de massa foi feita com recurso a pesquisa bibliográfica.

O procedimento de HPLC-MS realizou-se da seguinte forma:

- 1) Em primeiro lugar é preciso preparar os eluentes A e B. Para tal introduzir 500 mL de água ultra-pura e 500 mL de acetonitrilo em dois recipientes de vidro e colocá-los no sonicador. Esta etapa é necessária para desgaseificar os eluentes e impedir a formação de bolhas de ar. Manter o recipiente contendo água no banho de ultrassons durante 25 min, após este período, adicionar 1 mL de ácido acético glacial. Manter o recipiente contendo acetonitrilo no banho durante 20 min;
- 2) Após a preparação dos eluentes transferir, com o auxílio de pipetas de Pasteur, quantidade de solução de amostra suficiente para encher até metade o *vial*. Introduzir os *vials* no cromatógrafo;
- 3) Ligar o cromatógrafo e o respetivo *software*. Estabelecer os valores dos parâmetros necessários e iniciar a análise.

As injeções diretas das soluções de amostra ibérica e amostra brasileira no espectrómetro de massa para se efetuar as análises de ESI-MS/MS ocorreram do seguinte modo:

- 1) Ligar o espectrómetro de massa e o respetivo *software*. Selecionar o programa Default\_ESI existente no *software*. Deste modo, os valores dos parâmetros experimentais necessários já ficam estabelecidos;
- 2) Retirar 500 µL de solução com a seringa. Conectar a ponta da seringa ao capilar do espectrómetro. Ligar a bomba para iniciar a análise;
- 3) Após a obtenção do espectro total da amostra é possível obter o espectro de massa de certos iões de interesse e analisar os seus padrões de fragmentação. Para tal é necessário fazer um *tune* do ião de interesse (ião “parental”). Em maior parte dos casos a realização do *tune* otimiza as condições experimentais através da mudança dos valores dos parâmetros estabelecidos inicialmente;

- 4) Após o *tune* escolher a energia de colisão necessária de modo a fragmentar o ião “parental” até este ter uma intensidade aproximada de 10%. Repetir este passo para fragmentar os iões “filhos” e obter os seus espectros de massa;
- 5) Entre análises de soluções diferentes passar 500 µL de metanol pelo equipamento. Esta etapa é necessária para não ocorrerem interferências nas análises.

#### 4.3.2) GC-MS

Uma vez que a colofónia corresponde à fração não volátil da goma e, sendo a *pitch* o resíduo refinado da colofónia este material é não volátil, foi necessário realizar a metilação das amostras antes da análise no sistema de cromatografia de modo a tornar os compostos presentes nas amostras mais voláteis, permitindo a sua posterior separação e identificação. Adicionalmente, também se fez HS-SPME/GC-MS e DI-SPME/GC-MS.

É importante salientar que alguns meses após a realização do ensaio de cristalização observou-se a formação de cristais no tubo contendo a solução 70:30 de *pitch* brasileira e acetona (**Figura 39**). Estes cristais também foram analisados por HS-SPME/GC-MS, GC-MS precedido por uma etapa de metilação e por FTIR-ATR e RMN.



**Figura 39:** Fotografia dos cristais de *pitch* brasileira.



#### 4.3.2.1) Material, equipamento e reagentes

**Tabela 8:** Materiais e equipamentos utilizados nas análises de HS-SPME/GC-MS e DI-SPME/GC-MS e respectivas marcas e incertezas.

<b>Material/Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Incerteza</b>
Espátulas	SELECTA	–
Cromatógrafo	Varian 450-GC	–
Espetrómetro de massa	Varian 4000 performance	–
<i>Vials</i> de 10 mL	ALWSCI Technologies	–
Placa de aquecimento	SELECTA AGIMATIC-E	–
Agitador magnético	Thermo Fisher Scientific	–
Termómetro	Quickfit MF31/0/250	–
Suporte, garras e noz	SELECTA	–
Recipiente de vidro	SIMAX	–
<i>Holder</i>	SUPELCO	–
Fibras de PDMS de 7 µm e 100 µm com núcleos de sílica fundida/SS	SUPELCO	–

**Tabela 9:** Materiais e equipamentos utilizados nas análises de GC-MS precedida pela etapa de metilação e respectivas marcas e incertezas.

<b>Material/Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Incerteza</b>
Espátulas	SELECTA	–
Cromatógrafo	Agilent Technologies 7820A	–
Espetrómetro de massa	Agilent Technologies 5977b	–
<i>Vials</i> de 10 mL	Agilent	–
Balança analítica	Mettler Toledo	0,0001 g
Pipeta volumétrica de 5 mL	Linex	0,03
Pipetas de Pasteur	Labbox	–
Seringa de 1 mL	Agilent	–

Todos reagentes utilizados nas análises de GC-MS precedida pela etapa de metilação são de grau analítico.

**Tabela 10:** Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados nas análises de GC-MS precedida pela etapa de metilação.

Nome	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	CAS
Metanol	CH <sub>4</sub> O	32,04	67-56-1
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	64-17-5
Éter etílico	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74,12	60-29-7
Hidróxido de tetrametilamónio	C <sub>16</sub> H <sub>37</sub> NO	259,47	75-59-2
Fenolftaleína	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	318,30	77-09-8
Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92,14	108-88-3

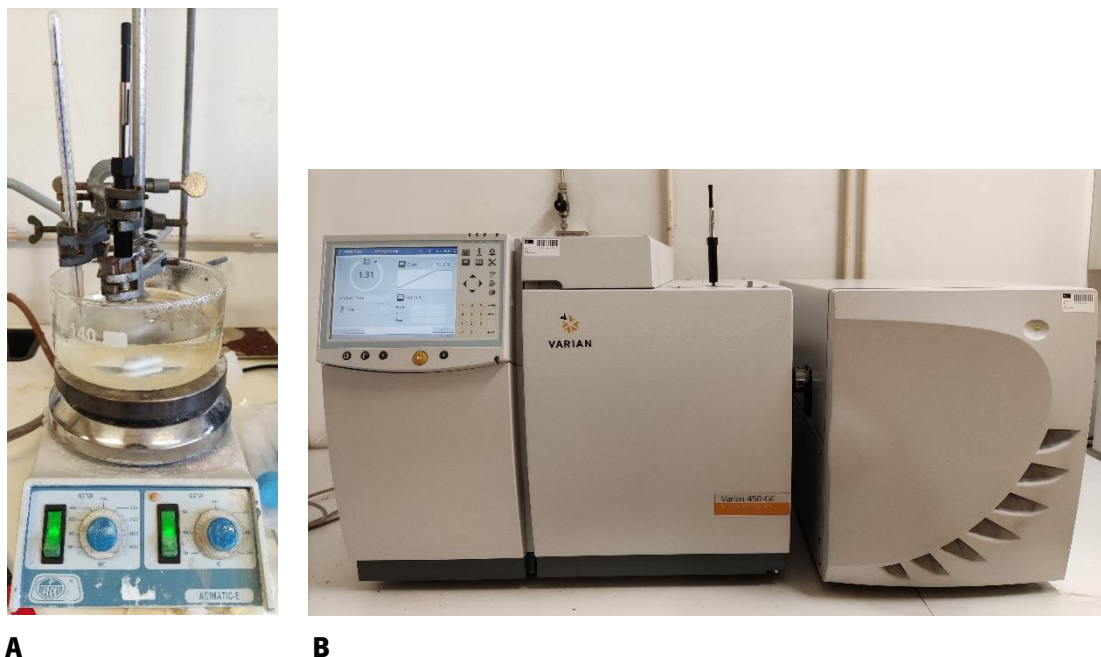
#### 4.3.2.2) Métodos experimentais

As análises de HS-SPME/GC-MS e DI-SPME/GC-MS foram realizadas num cromatógrafo gasoso Varian 450-GC acoplado a um espectrómetro de massa Varian 4000 performance. Os compostos foram separados numa coluna capilar Phenomenex (5% fenilo e 95% PDMS, 30 m x 250 µm x 0,25 µm). O método experimental aplicado seguiu as seguintes condições: temperatura do injetor a 250°C, temperatura inicial da coluna a 50°C, aumento da temperatura a uma taxa de 8°C/min até 250°C, mantendo-se a esta temperatura durante 6 min e 50 s, sendo o tempo total de análise 31 min e 50 s. O modo de ionização usado foi o EI, o detetor de massas operou a 10 µA e a faixa de aquisição em massa foi dos 25–1000 m/z. O gás de transporte utilizado foi o hélio com um fluxo de 1 mL/min. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com as bibliotecas espetraais Wiley e NIST acopladas ao *software*.

O procedimento de HS-SPME/GC-MS da amostra ibérica e amostra brasileira realizou-se da seguinte forma:

- 1) Encher um recipiente de vidro com água, introduzir um agitador magnético e colocar o recipiente na placa de aquecimento a 70°C e com agitação a 100 rpm. Introduzir um termómetro na água;
- 2) Quando a água estiver à temperatura definida introduzir quantidade suficiente de amostra para um *via*/de modo a cobrir o fundo deste. Inserir a fibra de PDMS através do septo da tampa do *via*/;
- 3) Com o auxílio do suporte, garras e noz introduzir o *via*/ na água de modo a ficar parcialmente submerso (**Figura 40.A**). Após 30 min de extração retirar o *via*/, recolher a fibra e retirar o *holder*;

- 4) Ligar o cromatógrafo e o respetivo *software*. Introduzir a fibra no cromatógrafo e iniciar a análise;
- 5) Ao fim de 15 min recolher a fibra e retirar o *holder* do equipamento. Deixar a análise continuar até ao final (31 min e 50 s).



**Figura 40:** Fotografia da A) montagem do equipamento para a etapa da HS-SPME e B) do equipamento utilizado na análise de GC-MS.

O procedimento adotado para a análise de HS-SPME/GC-MS dos cristais de *pitch* brasileira foi muito semelhante ao descrito acima com a diferença da etapa de HS-SPME ter sido a 80°C durante 40 min. Para as análises de DI-SPME/GC-MS utilizou-se soluções de 30 mg das amostras ibérica e brasileira dissolvidas em 100 mL de metanol. Este procedimento realizou-se da seguinte forma:

- 1) Encher um recipiente de vidro com água, introduzir um agitador magnético e colocar o recipiente na placa de aquecimento a 40°C e com agitação a 100 rpm. Introduzir um termómetro na água;
- 2) Quando a água estiver à temperatura definida introduzir quantidade suficiente da solução de 30 mg de amostra para um *vial* até metade. Inserir a fibra de PDMS de 7 µm através do septo da tampa do *vial*;
- 3) Com o auxílio do suporte, garras e noz introduzir o *vial* na água de modo a ficar parcialmente submerso. Após 15 min de extração retirar o *vial*, recolher a fibra e retirar o *holder*;

- 4) Ligar o cromatógrafo e o respetivo *software*. Introduzir a fibra no cromatógrafo e iniciar a análise;
- 5) Ao fim de 15 min recolher a fibra e retirar o *holder* do equipamento. Deixar a análise continuar até ao final.

As análises de GC-MS precedidas pela etapa de metilação foram realizadas num cromatógrafo gasoso Agilent Technologies 7820A acoplado a um espectrómetro de massa Agilent Technologies 5977B (**Figura 41**). Recorreu-se a uma coluna capilar Agilent 19001S-433 UI:HP-5ms Ultra Inert (5% fenil – 95% metilpolisiloxano, 30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e hélio como gás de transporte. O método experimental aplicado seguiu as seguintes condições: temperatura do injetor a 295°C, temperatura inicial da coluna a 250°C durante 3 min, aumento da temperatura a uma taxa de 5°C/min até 295°C, mantendo-se a esta temperatura durante 6 min, sendo o tempo total de análise 18 min, e temperatura da linha de transferência para o detetor a 280°C. O fluxo do hélio foi de 1,5 mL/min e o modo de ionização usado foi o EI. O detetor de massas operou a 1130 eV e a faixa de aquisição em massa dos foi dos 50-550 m/z. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com as bibliotecas espectrais NIST e MOLSTRUC acopladas ao *software*.



**Figura 41:** Fotografia do equipamento de GC-MS da empresa Eurochemicals.

O procedimento de GC-MS precedido por metilação das amostras ibérica e brasileira e cristais da *pitch* brasileira realizou-se do seguinte modo:

- 1) Pesar, aproximadamente, 0,05 g de amostra para um *vial*;
- 2) Adicionar 2 gotas da solução de fenolftaleína a 1% em etanol ao *vial* contendo a amostra;

- 3) Com uma pipeta volumétrica, adicionar 2 mL de uma solução de éter etílico/metanol (50:50) e agitar até a amostra se dissolver completamente. Caso seja necessário pode-se adicionar duas a três gotas de tolueno para ajudar na dissolução;
- 4) Titular com a solução de hidróxido de tetrametilamônio a 6% em etanol gota a gota, cuidadosamente, até se observar a primeira coloração rosa permanente *via*/. O hidróxido de tetrametilamônio é o agente de derivatização;
- 5) Lavar a seringa com a solução de amostra preparada, preferencialmente três vezes, antes da análise;
- 6) Com a seringa injetar 0,2 µL da solução de amostra no cromatógrafo e iniciar a análise.

### 4.3.3) FTIR-ATR

#### 4.3.3.1) Material e equipamento

**Tabela 11:** Materiais e equipamentos utilizados nas análises de FTIR-ATR e respectivas marcas.

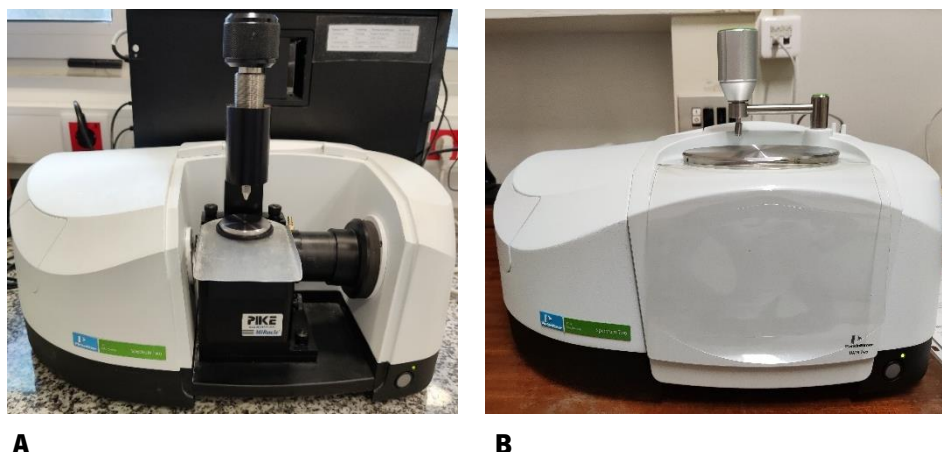
Material/Equipamento	Marca
Espátulas	SELECTA
Almofariz de 100 mL e pilão	Labbox
Espectrofotômetro de FTIR	PerkinElmer Spectrum Two

#### 4.3.3.2) Método experimental

As análises de FTIR-ATR das frações insaponificáveis de *pitch* foram realizadas num espectrômetro de FTIR PerkinElmer Spectrum Two com acessório ATR (**Figura 42.A**). Utilizou-se um cristal de seleneto de zinco e um detetor de tantalato de lítio. As análises foram realizadas na região espectral MIR de 4000–650 cm<sup>-1</sup> à temperatura ambiente com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e uma velocidade de varrimento de 0,2 cm/s. A intensidade das bandas de absorção foi expressa em transmitância.

Por sua vez, as análises de FTIR-ATR dos precipitados sólidos ibérico e brasileiro e dos cristais de *pitch* brasileira foram realizadas num espectrômetro de FTIR-ATR PerkinElmer Spectrum Two com

cristal de diamante (**Figura 42.B**). Fez-se as análises com um detetor de tantalato de lítio na região MIR de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  a uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Todas as análises foram feitas à temperatura ambiente, usando a média de 32 varrimentos e com a intensidade das bandas de absorção expressa em transmitância.



**Figura 42:** Fotografias dos espectrômetros de FTIR com acessório ATR da A) empresa Eurochemicals e B) universidade do Minho.

O método aplicado para as análises das amostras executou-se do seguinte modo:

- 1) Limpar a zona de análise do espectrômetro com um papel absorvente com etanol para remover todas as sujidades. Caso seja necessário utilizar também papel absorvente com acetona ou metanol;
- 2) Ligar o *software* e fazer o *background* de modo a eliminar as interferências do ambiente, ou seja, fazer um branco;
- 3) Moer a amostra com um almofariz e pilão para reduzir o tamanho das partículas de modo a facilitar o contacto da amostra com o cristal e eliminar as partículas de ar. Com uma espátula retirar uma porção de amostra moída suficiente para cobrir o cristal e colocá-la na zona de análise;
- 4) Rodar a prensa posicionada por cima do cristal, pressionando a amostra sob o cristal para garantir um maior contacto entre esta e o cristal;
- 5) Realizar o varrimento da amostra. Após a obtenção do espectro fazer um *tune-up* para obter uma melhor resolução do espectro;

6) Após o fim da análise limpar a zona de análise.

#### 4.3.4) RMN

Foram feitas análises de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra ibérica, amostra brasileira, dos cristais de *pitch* brasileira e dos padrões ácido abiético, acetato de linalilo, ácido oleico e 2-amino-1,3,4-octadecanotriol. Adicionalmente, fez-se uma análise de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra ibérica.

##### 4.3.4.1) Material, equipamento e reagentes

**Tabela 12:** Materiais e equipamentos utilizados nas análises de RMN e respectivas marcas e incertezas.

Material/Equipamento	Marca	Incerteza
Espátulas	SELECTA	–
Balança analítica	OHAUS Explorer Pro	0,0001 g
Vials de 10 mL	ALWSCI Technologies	–
Tubos de amostra de RMN de 5 mm de diâmetro	SIGMA-ALDRICH	–
Micropipeta de 100-1000 $\mu\text{L}$	TIPOR-V	0,6214 $\mu\text{L}$
Espetrómetro de RMN	Bruker Avance III 400	–

Todos reagentes usados são de grau analítico com a exceção do ácido abiético, que tem uma pureza de 85%.

**Tabela 13:** Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados nas análises de RMN.

Nome	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	CAS
Clorofórmio D1	$\text{CDCl}_3$	120,38	865-49-6
Dimetilsulfóxido D6	$\text{C}_2\text{D}_6\text{SO}$	84,18	2206-27-1
Ácido abiético	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$	302,50	514-10-3
Acetato de linalilo	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$	196,29	115-95-7
Ácido oleico	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	282,50	112-80-1
2-amino-1,3,4-octadecanotriol	$\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{NO}_3$	317,50	13552-11-9

#### 4.3.4.2) Método experimental

Os espectros de RMN foram registados à temperatura ambiente num espectrómetro Bruker Avance III 400 (**Figura 43**), operando a 400 Hz e com um número médio de 45 varrimentos. Clorofórmio deuterado e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO D6) foram utilizados como solventes e o padrão interno foi o TMS. Os desvios químicos surgem em ppm relativamente ao TMS (0 ppm).



**Figura 43:** Fotografia do espectrómetro de RMN.

O procedimento realizou-se do seguinte modo:

- 1) No caso de amostras sólidas pesar 5-10 mg de amostra num *vial* e, com o auxílio de uma micropipeta, adicionar ao *vial* 700  $\mu\text{L}$  do solvente clorofórmio deuterado ou DMSO D6. Agitar o *vial* para ocorrer a dissolução da amostra;
- 2) No caso de amostras líquidas mergulhar a ponta da micropipeta na amostra e depois mergulhar a mesma ponta num *vial* contendo 700  $\mu\text{L}$  do solvente e misturar;
- 3) Quando a amostra estiver dissolvida introduzir 700  $\mu\text{L}$  da solução para um tubo de amostra de RMN;
- 4) Analisar o tubo no espectrómetro de RMN.



#### 4.4) Avaliação da atividade antioxidante das frações insaponificáveis de *pitch*

De modo a determinar se as amostras ibérica e brasileira possuem atividade antioxidante recorreu-se ao ensaio colorimétrico DPPH.

##### 4.4.1) Material, equipamento e reagentes

**Tabela 14:** Materiais e equipamentos utilizados no ensaio DPPH e respetivas marcas e incertezas.

Material/Equipamento	Marca	Incerteza
Balança analítica	Mettler Toledo	0,1 mg
Espátulas	–	–
Pipetas de Pasteur	–	–
Balão volumétrico de 50 mL	–	–
Tubos Eppendorf	–	–
Tubos Falcon	–	–
Micropipetas de 10-100 µL e 100-1000 µL	–	–
Microplaca de 96 poços	–	–
Leitor de microplacas	Molecular Devices SpectraMax Plus	–

Os reagentes usados no ensaio DPPH são de grau analítico.

**Tabela 15:** Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados no ensaio DPPH.

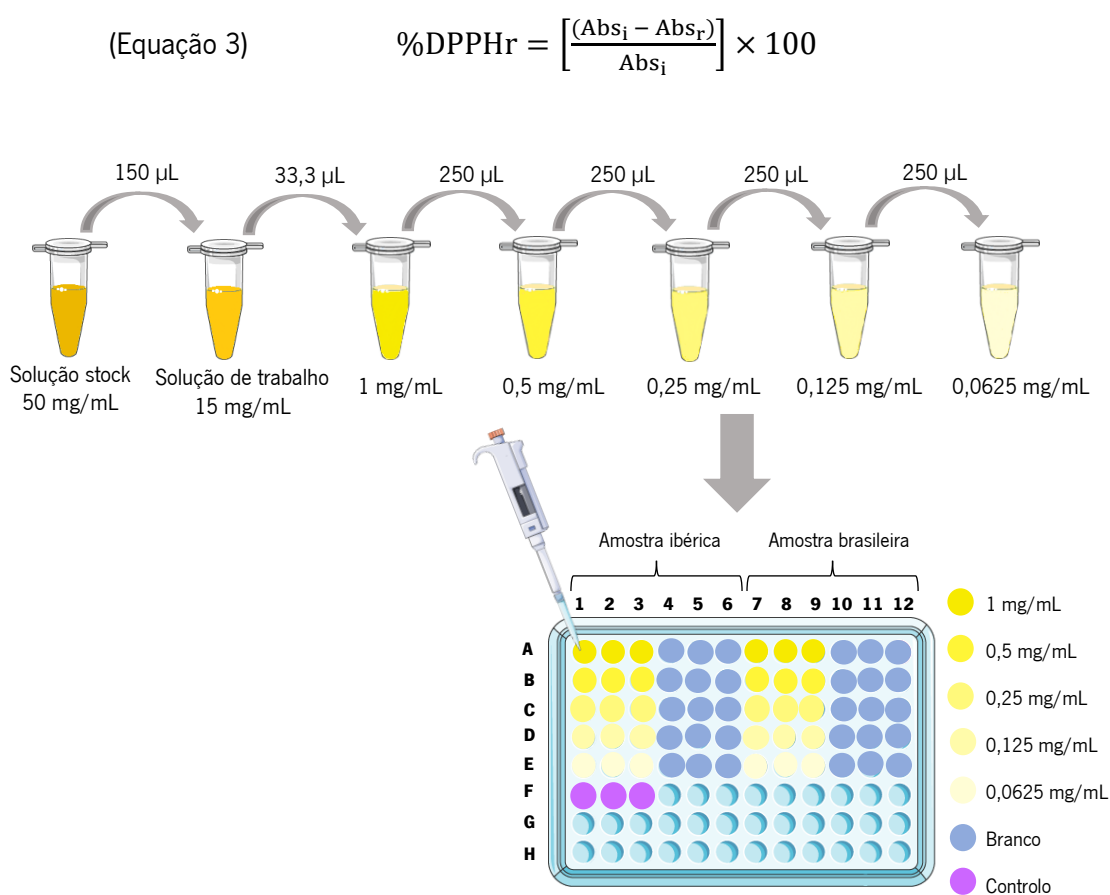
Nome	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	CAS
DPPH	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	394,32	1898-66-4
Etanol	$C_2H_6O$	46,07	64-17-5

##### 4.4.2) Método experimental

- 1) Preparar uma solução etanólica do radical DPPH a 0,4 mM. Para preparar esta solução pesa-se 19,7 mg do DPPH em pó num balão volumétrico de 50 mL e perfaz-se o volume com etanol a 100%. Manter esta solução no frigorífico envolta em papel alumínio quando não estiver em uso, de modo a reduzir a sua degradação induzida pela luz;

- 2) Transferir 200  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH para um poço de uma microplaca de 96 poços e medir a absorvância da solução no leitor de microplacas a um comprimento de onda de 517 nm. Esta solução vai dar uma absorvância de, aproximadamente, 3. Após a medição transferir a solução do balão para um tubo Falcon. Adicionar aos poucos etanol ao tubo e medir a absorvância até que esta seja de, aproximadamente, 1;
- 3) Preparar uma solução stock de amostra ibérica de 50 mg/mL através da pesagem de 25 mg de amostra para um tubo Eppendorf e adição de 500  $\mu\text{L}$  de etanol. A partir desta solução preparar uma solução de trabalho de 15 mg/mL. Para preparar esta solução retira-se 150  $\mu\text{L}$ , com o auxílio de uma micropipeta, da solução stock para outro tubo Eppendorf e adiciona-se 350  $\mu\text{L}$  de etanol. Repetir esta etapa para a amostra brasileira;
- 4) É necessário preparar 5 soluções de concentrações diferentes para cada amostra (1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL). A preparação da solução de concentração de 1 mg/mL é feita através da diluição da solução de 15 mg/mL para um tubo Eppendorf. Considerando um volume final em cada tubo Eppendorf de 500  $\mu\text{L}$  retirar 33,3  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho para o tubo e adicionar 466,7  $\mu\text{L}$  de etanol para dar uma concentração de 1 mg/mL. Para preparar as restantes concentrações faz-se diluições seriadas considerando sempre um volume final de 500  $\mu\text{L}$ ;
- 5) Na microplaca de 96 poços introduzir 10  $\mu\text{L}$  de etanol para um poço e adicionar 140  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH com absorvância aproximada de 1 para fazer um volume final de 150  $\mu\text{L}$ . Repetir este procedimento mais duas vezes. Estes 3 poços consistem no controlo;
- 6) Introduzir 10  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções etanólicas de amostra contidas nos tubos Eppendorf para um poço e adicionar 140  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH com absorvância aproximada de 1 a cada um deles. Fazer 3 réplicas para cada concentração diferente de amostra;
- 7) Preparar 3 réplicas de brancos para cada concentração de amostra adicionando 10  $\mu\text{L}$  de solução etanólica de amostra e 140  $\mu\text{L}$  de etanol em poços da microplaca;
- 8) Incubar a microplaca à temperatura ambiente, sem agitação e protegida da luz, durante 1 h;

- 9) Após a incubação observar os poços da microplaca que contém amostras de *pitch* para verificar se ocorreram alterações colorimétricas, comparando a cor destes com a cor do controlo. Se não se observarem alterações deixar a microplaca incubar mais 15 min e fazer uma nova observação;
- 10) Caso se observe uma mudança de cor visível medir a absorvância dos poços no leitor de microplacas a 517 nm. Fazer nova medição 60 min depois da incubação. Após este período as amostras atingem a sua capacidade máxima de eliminação do radical DPPH, ou seja, estão num estado de equilíbrio (*steady state*). Usar os valores da absorvância inicial ( $Abs_i$ ) e da absorvância registada no estado de equilíbrio ( $Abs_e$ ) para calcular a percentagem do DPPHr de acordo com a equação 3.



**Figura 44:** Representação esquemática das etapas 3-7 do procedimento experimental do ensaio DPPH.

#### 4.5) Avaliação da atividade antibacteriana das frações insaponificáveis de *pitch*

Para determinar se as amostras ibérica e brasileira possuem atividade antibacteriana recorreu-se ao método da microdiluição. O objetivo deste ensaio consistiu em avaliar se a *pitch* atrasava o crescimento das bactérias. A monitorização da absorvância foi feita num leitor de microplacas.

#### 4.5.1) Material, equipamento e reagentes

**Tabela 16:** Materiais e equipamentos utilizados no ensaio da microdiluição e respectivas marcas e incertezas.

<b>Material/Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Incerteza</b>
Balança analítica	Mettler Toledo	0,1 mg
Espátulas	–	–
Placas de Petri	–	–
Leitor de microplacas	Molecular Devices SpectraMax Plus	–
Espectrofotômetro de luz visível	–	–
Cuvetes	–	–
Micropipetas de 10-100 µL e 100-1000 µL	–	–
Microplaca de 96 poços	–	–
Incubadora	INFORS HT	0,1°C
Tubos Falcon de 15 mL e 50 mL	–	–

O etanol usado neste ensaio foi de grau analítico.

**Tabela 17:** Nome, fórmula química, massa molar e número CAS dos reagentes utilizados no ensaio da microdiluição.

<b>Nome</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Massa molar (g/mol)</b>	<b>CAS</b>
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	64-17-5
Tween 80	C <sub>32</sub> H <sub>60</sub> O <sub>10</sub>	604,80	9005-65-6
Meio Luria Bertani (LB)	–	–	–

#### 4.5.2) Método experimental

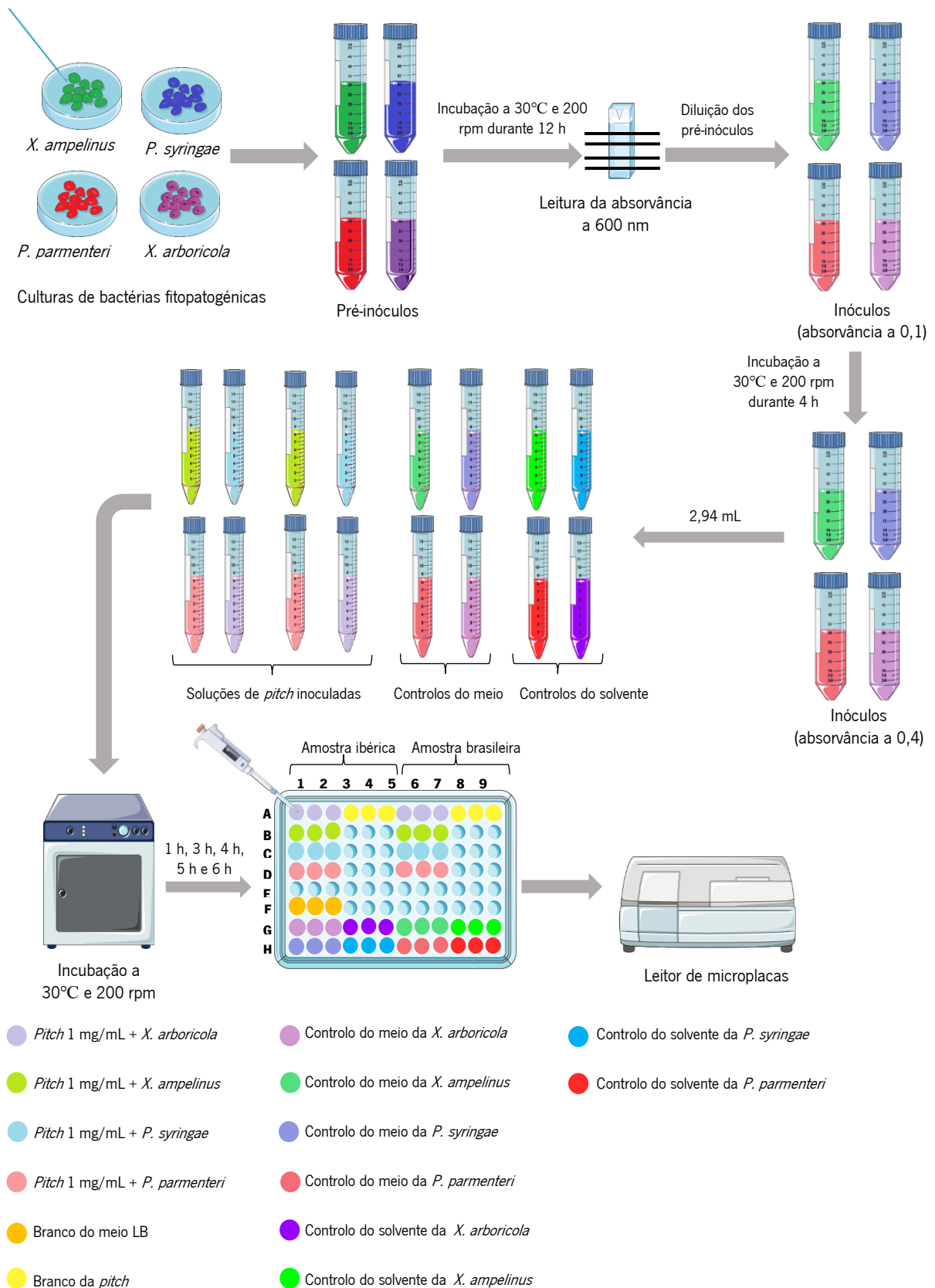
- 1) Fazer um pré-inóculo de cada uma das 4 bactérias fitopatogênicas (*Xanthomonas arboricola*, *Xylophilus ampelinus*, *Pseudomonas syringae* e *Pectobacterium parmenteri*). Para tal inocular as estirpes em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido separadamente. Posteriormente, retirar uma colônia de cada uma das placas para tubos Falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio LB líquido e incubar os 4 tubos durante a noite a 30°C e 200 rpm;

- 2) Aproximadamente 12 h depois, medir a absorvância dos pré-inóculos no espectrofotômetro de luz visível a um comprimento de onda de 600 nm. Em primeiro lugar definir o branco transferindo 1 mL de meio LB para uma cuvete e medindo a absorvância, posteriormente, transferir 1 ml de cada suspensão celular para novas cuvetes e medir as absorvâncias;
- 3) Após a medição proceder à diluição das 4 suspensões celulares de modo a darem uma absorvância de 0,1 ( $Abs_{inóculo}$ ). Com o valor da absorvância obtida na etapa 2 ( $Abs_{pré-inóculo}$ ) e considerando um volume final de 5 mL ( $V_f$ ), recorrer à equação 4 para obter o volume a retirar de pré-inóculo ( $V_i$ ). Transferir este volume para novos tubos Falcon de 50 mL estéreis e perfazer até ao volume final com meio LB. Estes 4 tubos consistem nos inóculos;

(Equação 4)  $Abs_{pré-inóculo} \times V_i = Abs_{inóculo} \times V_f$

- 4) Incubar os 4 tubos Falcon durante, aproximadamente, 4 h a 30°C e 200 rpm até que atinjam uma absorvância de 0,4. Este valor indica que as bactérias estão na fase exponencial do seu crescimento;
- 5) Preparar uma solução stock de amostra ibérica de 80 mg/mL através da pesagem de 80 mg de amostra para um tubo Eppendorf. Adicionar 1 mL de etanol a 100% ao tubo. A partir desta solução preparar uma solução stock de 50 mg/mL através da transferência de 625  $\mu$ L da solução de 80 mg/mL para um tubo Eppendorf, com o auxílio de uma micropipeta, e a adição de 375  $\mu$ L de Tween 80. A adição do emulsificante Tween 80 é necessária para garantir que a solução etanólica de *pitch* não precipite quando for adicionada ao meio LB aquoso das suspensões celulares. Repetir esta etapa para a amostra brasileira;
- 6) A partir das soluções stock de 50 mg/mL de amostra ibérica e amostra brasileira preparadas previamente preparar duas soluções de concentração 1 mg/mL. A preparação desta solução é feita através da diluição da solução de 50 mg/mL para um tubo Eppendorf. Considerando um volume final em cada tubo Eppendorf de 3 mL retirar 60  $\mu$ L da solução stock para o tubo e adicionar 2,94 mL de etanol para dar uma concentração final de 1 mg/mL;

- 7) Inocular cada uma das bactérias com as duas soluções de *pitch* a 1 mg/mL. Para tal transferir 2,94 mL de cada uma das 4 suspensões celulares com absorvância aproximada de 0,4 para tubos Falcon de 15 mL e adicionar 60 µL das soluções de *pitch* a 1 mg/mL para dar um volume final de 3 mL em cada tubo;
- 8) Transferir 30 µL de etanol e 30 µL de Tween 80 para um tubo Falcon de 15 mL. Adicionar 2,94 mL das suspensões celulares com absorvância aproximada de 0,4 ao tubo. Estes 4 tubos consistem nos controlos do solvente;
- 9) Transferir 2,94 mL das suspensões celulares para tubos Falcon de 15 mL e acrescentar 60 µL de meio LB. Estes 4 tubos consistem nos controlos do meio;
- 10) Incubar os 16 tubos Falcon de 15 mL previamente preparados a 30°C e 200 rpm durante 1 h;
- 11) Ao fim do tempo de incubação retirar 150 µL de cada tubo para poços de uma microplaca de 96 poços. Fazer 3 réplicas para cada condição;
- 12) Adicionar 150 µL de meio LB num poço. Este poço consiste no branco do meio. Preparar brancos das duas soluções de *pitch*. Considerando um volume final em cada poço de 150 µL e para dar uma concentração final de *pitch* de 1 mg/mL transferir 3 µL da solução stock de amostra ibérica de 50 mg/mL para um poço e adicionar 147 µL de meio LB. Repetir este passo para a amostra brasileira. Fazer 3 réplicas para cada branco;
- 13) Após a preparação da microplaca introduzir os 16 tubos de volta à incubadora. Proceder à leitura da absorvância a 600 nm de cada um dos poços com o leitor de microplacas e registar os valores;
- 14) Repetir as etapas 11, 13 e 14 ao fim de 3, 4, 5 e 6 h de incubação dos tubos Falcon;
- 15) Utilizar os valores da absorvância dos poços contendo amostra inoculada com bactérias e os poços dos controlos para elaborar curvas do crescimento bacteriano ao longo do tempo de incubação.



**Figura 45:** Representação esquemática do procedimento experimental do ensaio da microdiluição.

## Capítulo 5. Apresentação e discussão de resultados

---



Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos ao longo do trabalho laboratorial e encontra-se dividido em quatro subcapítulos principais. O primeiro subcapítulo engloba os resultados das análises da qualidade das amostras de *pitch*, o segundo é dedicado aos resultados da caracterização dos compostos neutros presentes nas frações insaponificáveis de *pitch* por ESI-MS/MS, HPLC-MS, GC-MS, FTIR-ATR e RMN e nos cristais de *pitch* brasileira por GC-MS, FTIR-ATR e RMN, o terceiro aborda os resultados da avaliação da atividade antioxidante das frações insaponificáveis de *pitch* e o quarto é dedicado aos resultados da atividade antibacteriana das frações insaponificáveis de *pitch*.

### 5.1) Análises da qualidade de amostras de *pitch*

Na **Tabela 18** estão representados os resultados das análises da qualidade obtidos para as amostras de *pitch* ibérica e *pitch* brasileira.

**Tabela 18:** Valores dos parâmetros de controlo da qualidade obtidos para as amostras de *pitch* ibérica e *pitch* brasileira.

<b>Parâmetros de controlo de qualidade</b>	<b><i>Pitch</i> ibérica</b>	<b><i>Pitch</i> brasileira</b>
Índice de acidez	130,9 mg KOH/g	147,7 mg KOH/g
Cor da escala de Gardner	13/14	11/12
Viscosidade (140°C)	7330 cP	1065 cP
Cristalização	Não cristalizou	Não cristalizou
Ponto de amolecimento	112,1°C	99,0°C
Ponto de turvação	199,1°C	190,3°C

Verificou-se que a amostra de *pitch* ibérica apresenta um índice de acidez inferior ao da *pitch* brasileira. Isto indica que a amostra de *pitch* ibérica possui uma menor quantidade de ácidos resínicos na sua composição, ou seja, apresenta uma maior quantidade de compostos neutros relativamente à amostra de *pitch* brasileira. Segundo a escala de Gardner ambas as amostras apresentam cores escuras, sendo que a *pitch* brasileira apresenta uma cor ligeiramente mais clara em comparação com a *pitch* ibérica. A cor escura da *pitch* poderá dever-se à presença de lignina – a principal fonte renovável de compostos fenólicos – e outros compostos que são fontes de compostos fenólicos. Isto poderá indicar presença de compostos fenólicos nas duas amostras de *pitch*.

Verificou-se também que a *pitch* brasileira possui menores valores de viscosidade, ponto de amolecimento e ponto de turvação em comparação com a *pitch* ibérica. Isto demonstra que esta amostra é menos viscosa do que a amostra de *pitch* ibérica, apresentando menor resistência ao fluxo, e que começa a demonstrar amolecimento e turvação a temperaturas mais baixas. A *pitch* brasileira apresentar um menor ponto de amolecimento em relação à *pitch* ibérica era esperado uma vez que o ponto de amolecimento está diretamente relacionado com a viscosidade. Não existe uma relação direta do ponto de turvação relativamente ao ponto de amolecimento e à viscosidade, este parâmetro está relacionado com a compatibilidade entre a *pitch* e o *test oil*. Um maior ponto de turvação poderá indicar uma maior presença de compostos que possuam oxigénios suscetíveis de oxidação (peróxidos) na amostra, deste modo, a *pitch* ibérica poderá conter uma maior quantidade de peróxidos em comparação com a *pitch* brasileira. Além disso, constatou-se que nenhuma das amostras cristalizou durante os períodos de tempo estipulados no protocolo experimental dos ensaios de cristalização de razão 50:50 e 70:30.

As diferenças dos valores dos parâmetros de controlo da qualidade observadas entre as duas amostras podem ser devidas a vários fatores tais como, as diferentes localizações geográficas e espécies dos pinheiros, condições de crescimento dos mesmos, diferenças nos métodos de extração, purificação e destilação utilizados, entre outros.

## **5.2) Caracterização dos compostos neutros das frações insaponificáveis de *pitch***

### **5.2.1) ESI-MS/MS e HPLC-MS**

Em análises iniciais de ESI-MS/MS de soluções de amostra ibérica e amostra brasileira verificou-se a presença de picos com elevada intensidade no modo positivo e no modo negativo. Analisando o padrão de fragmentação dos espectros de massa destes picos com os espectros de compostos existentes nas bibliotecas foi considerada a possibilidade de a *pitch* ter na sua composição ácido oleico, ácido palmítico, acetato de linalilo e 2-amino-1,3,4-octadecanotriol. Ácido oleico é um ácido gordo ómega-9 cuja presença foi previamente relatada em sementes e madeira de *Pinus* spp.<sup>101-104</sup>, o ácido palmítico é um ácido gordo de cadeia longa que já foi encontrado em sementes de *Pinus* spp.<sup>103,105</sup>, acetato de linalilo é um éster cuja presença foi relatada no óleo essencial de agulhas de *Pinus nigra*<sup>106</sup> e 2-amino-1,3,4-octadecanotriol é um esfingóide, servindo de bloco de construção fundamental de esfingolípídeos mais complexos, sendo este tipo de compostos encontrado em plantas. Para confirmar a presença destes compostos na *pitch* adquiriu-se estes padrões para serem analisados por HPLC-MS, juntamente com as

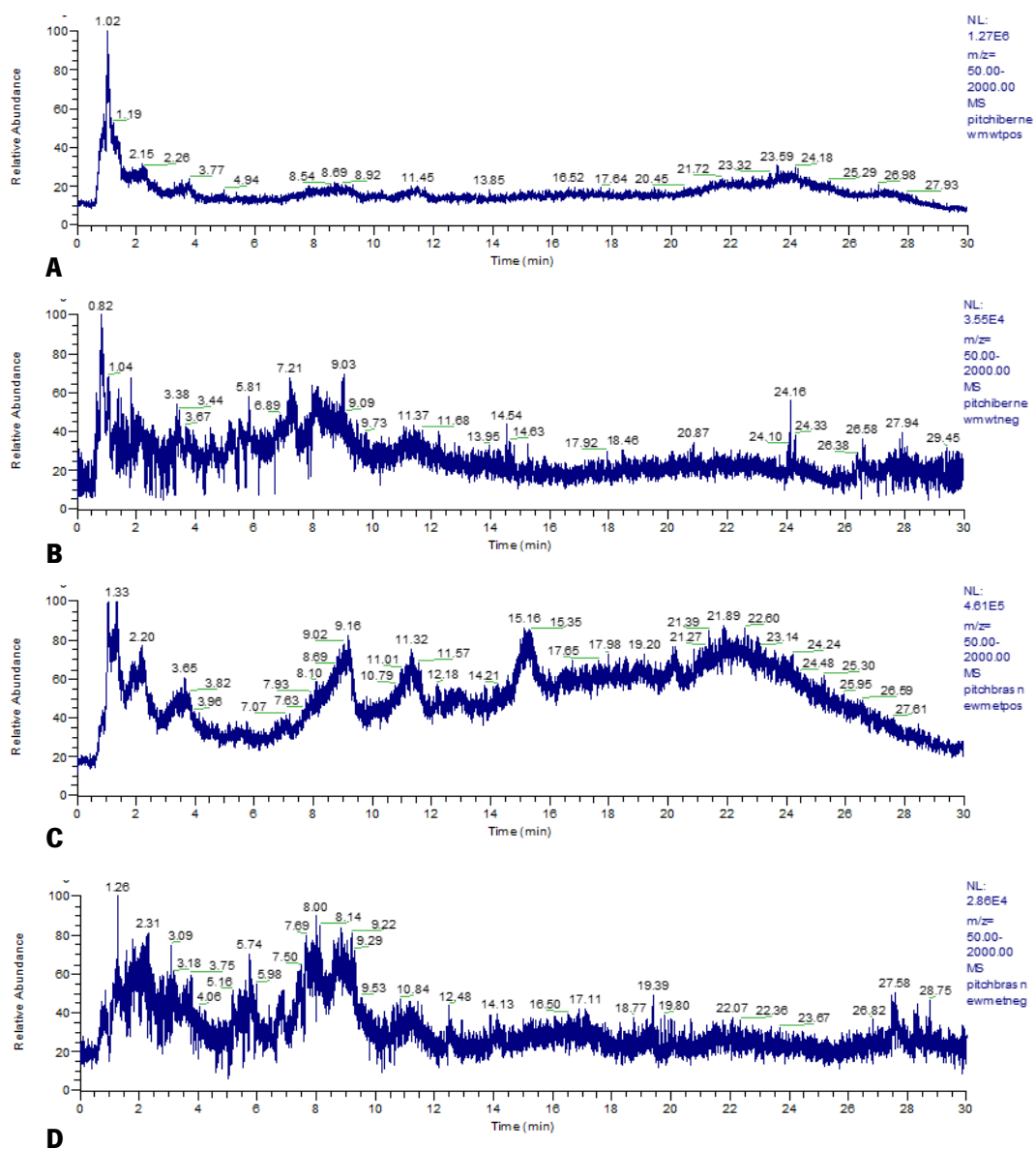
soluções 80:20 de metanol e éter etílico da amostra ibérica e amostra brasileira.

Também se observou-se a presença do pico do ião com  $m/z$  igual a 301 que podia corresponder ao pico M-1 de ácido abiético (sendo M a massa exata do composto), uma vez que este é um dos ácidos resínicos mais comuns encontrados na colofónia. Este pico também podia corresponder ao composto quercetina pois este composto já foi encontrado em vários extratos vegetais de *Pinus* spp..<sup>107-110</sup> Por estas razões adquiriu-se os padrões de ácido abiético e hidrato de quercetina para comparar os tempos de retenção dos picos observados nos respetivos cromatogramas com os das soluções 80:20 de metanol e éter etílico das amostras e concluir qual destes dois compostos é que está presente na *pitch*.

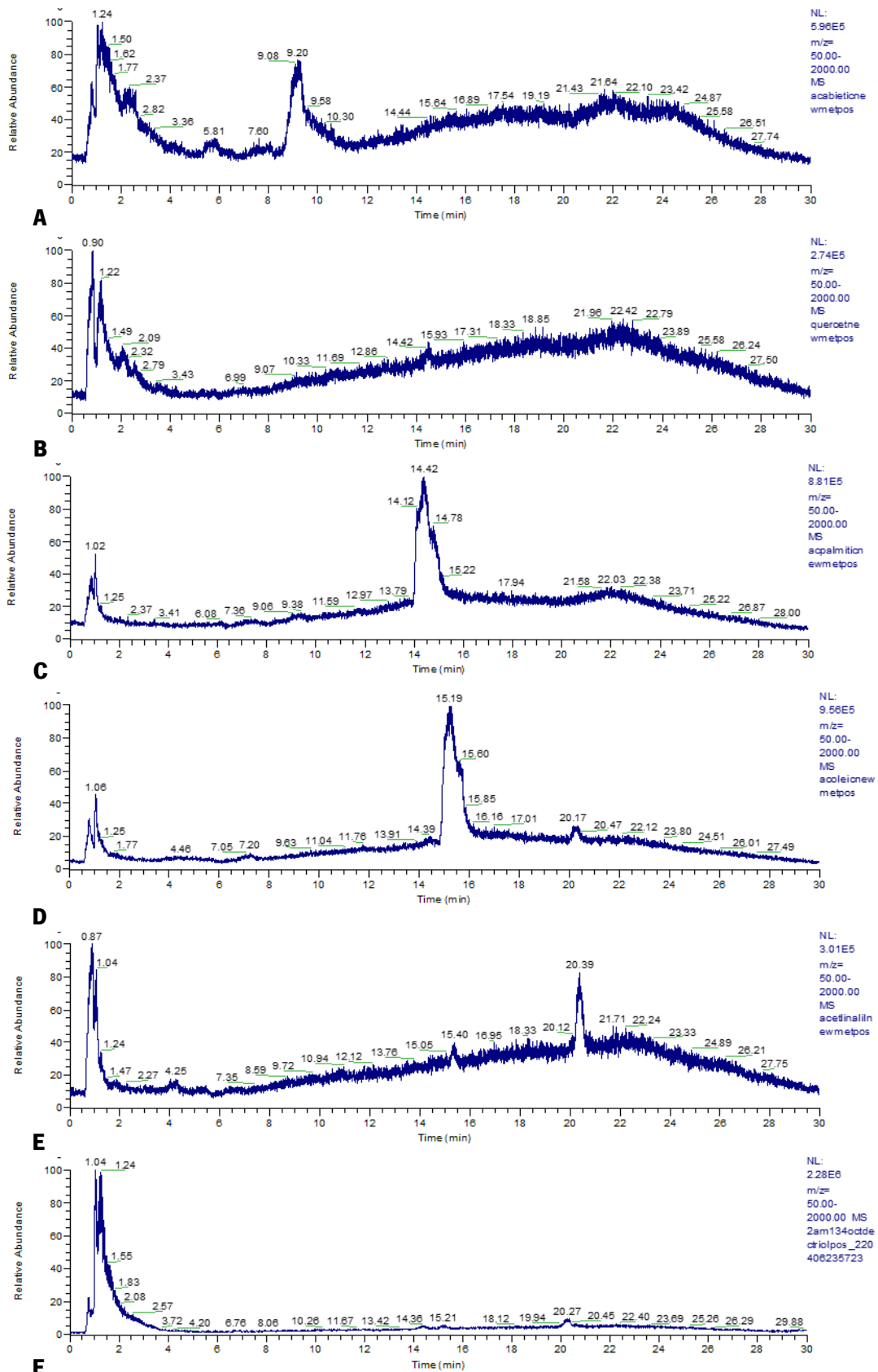
Os cromatogramas das soluções 80:20 de metanol e éter etílico da amostra ibérica e amostra brasileira no modo de ESI positivo e negativo estão representados na **Figura 46** e os cromatogramas dos seis padrões no modo de ionização positivo e negativo estão representados na **Figura 47** e **Figura 48**, respetivamente.

De modo a verificar se é o ácido abiético ou a quercetina que está presente na amostra ibérica e na amostra brasileira observou-se o tempo de retenção do pico do ião com  $m/z$  de 301 nos cromatogramas destes dois padrões e das amostras. Como se pode ver na **Figura 49** o tempo de retenção do pico do ião com  $m/z = 301$  do ácido abiético é de, aproximadamente, 9,3 min enquanto o pico do ião com  $m/z = 301$  da quercetina surge a, aproximadamente, 1,2 min. O tempo de retenção do pico do ácido abiético surge no intervalo do tempo de retenção dos picos do ião com  $m/z = 301$  das duas amostras de *pitch* (7-10 min) concluindo-se, assim, que o ácido abiético está presente em ambas as amostras.

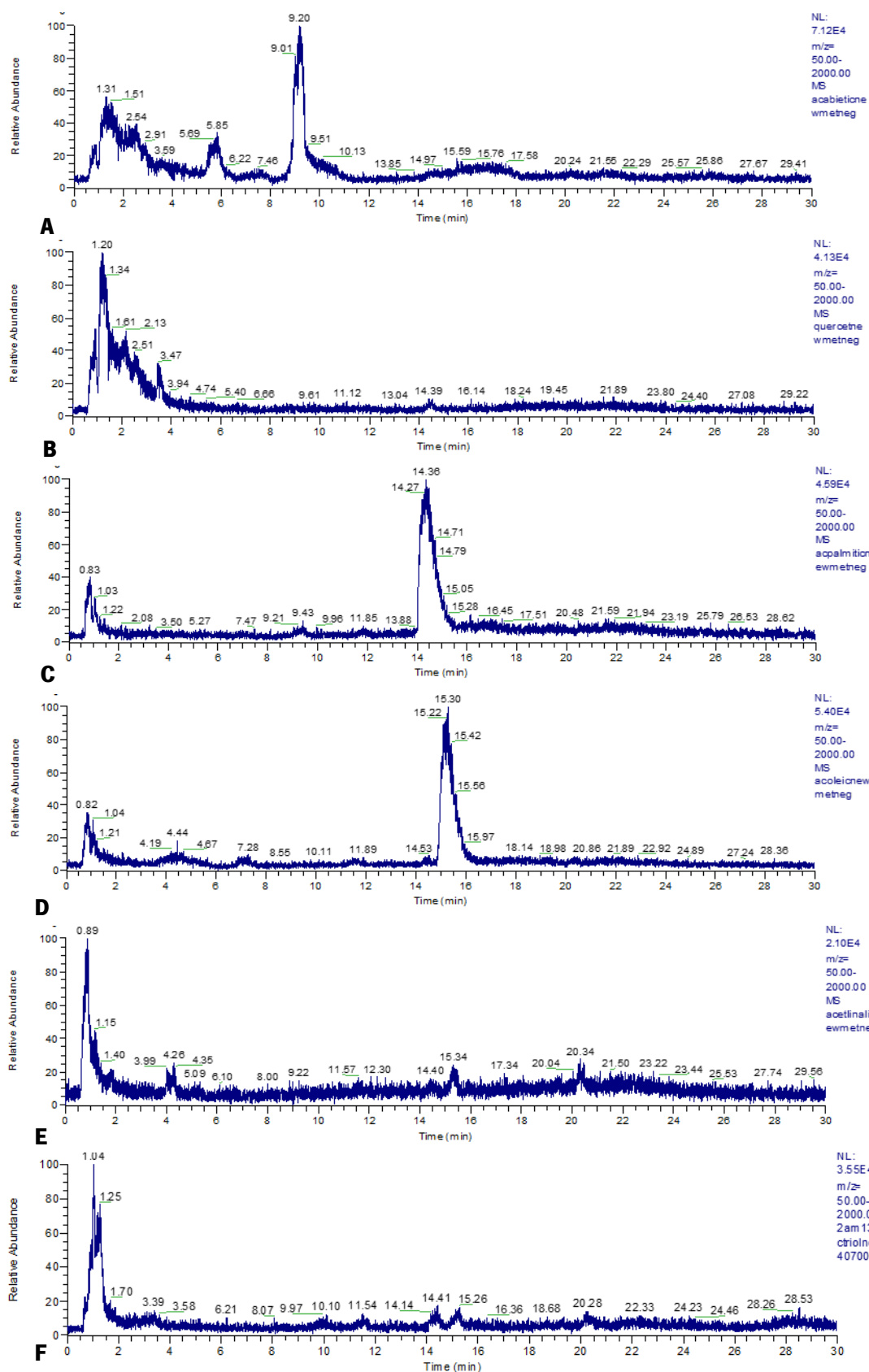
Também se constatou que o padrão de fragmentação do ião 301 do ácido abiético é mais semelhante ao padrão de fragmentação do ião 301 das amostras do que o padrão da quercetina quando se injetou diretamente estas amostras no espectrómetro de massa para realizar as análises de ESI-MS/MS nas mesmas condições experimentais. Inclusive observam-se alguns picos com elevada intensidade do espetro de massa do ácido abiético no espetro de massa do ião 301 da solução filtrada de amostra ibérica (**Figura 50.A**), nomeadamente, os picos dos iões com  $m/z$  igual a 283, 273 e 257. Os fragmentos do ácido abiético que podem ter dado origem a estes picos e a outros observados nos espetros de massa da **Figura 50** estão representados na **Figura 51**.



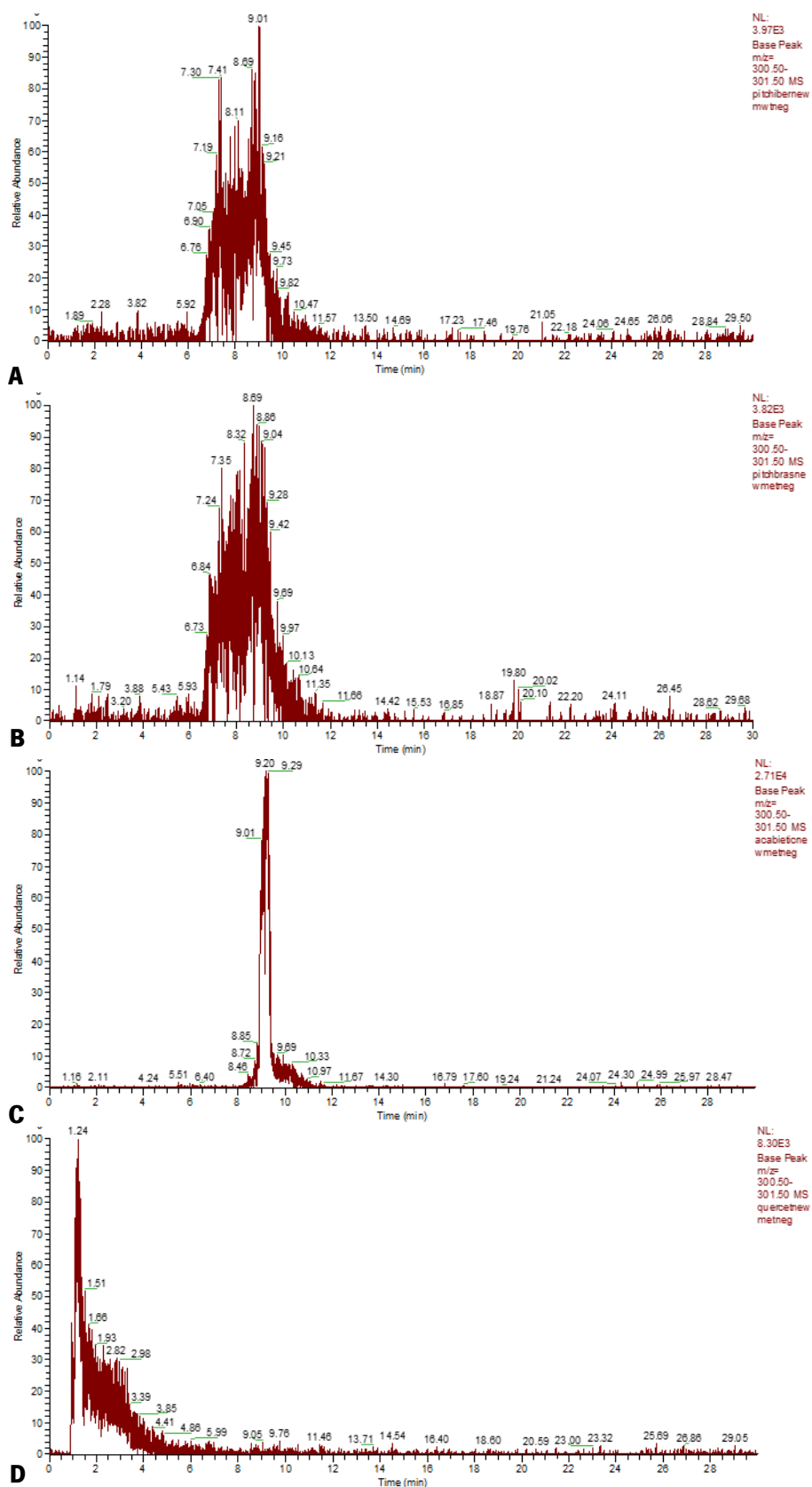
**Figura 46:** Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS das soluções 80:20 de metanol e éter etílico da amostra ibérica no A) modo positivo e B) modo negativo e da amostra brasileira no C) modo positivo e D) modo negativo.



**Figura 47:** Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo positivo das soluções dos padrões A) ácido abiético, B) hidrato de quercetina, C) ácido palmítico, D) ácido oleico, E) acetato de linalilo e F) 2-amino-1,3,4-octadecanotriol.

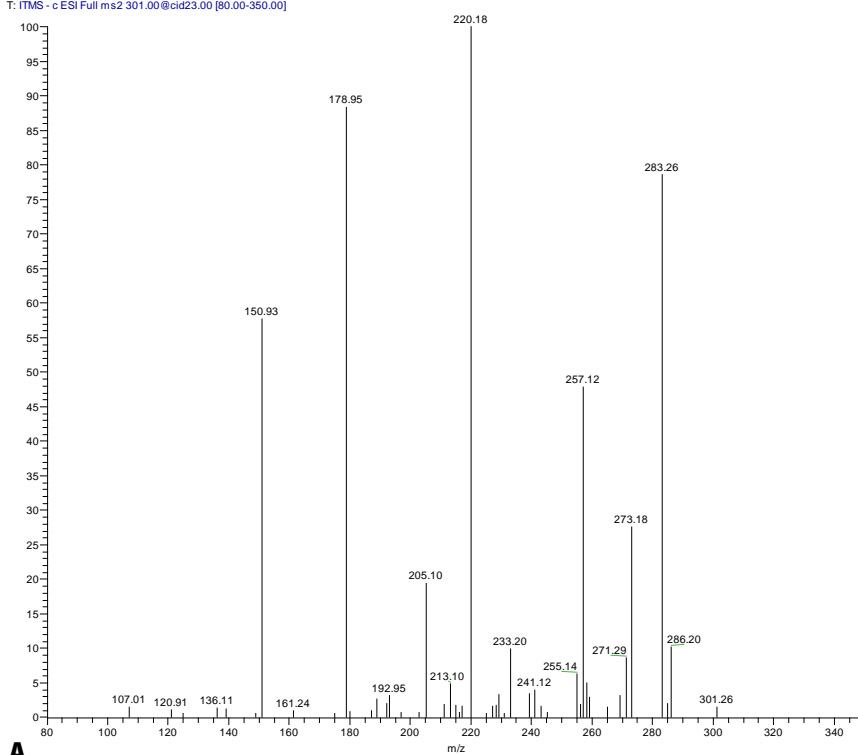


**Figura 48:** Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo negativo das soluções dos padrões A) ácido abiético, B) hidrato de quercetina, C) ácido palmítico, D) ácido oleico, E) acetato de linalilo e F) 2-amino-1,3,4-octadecanotriol.



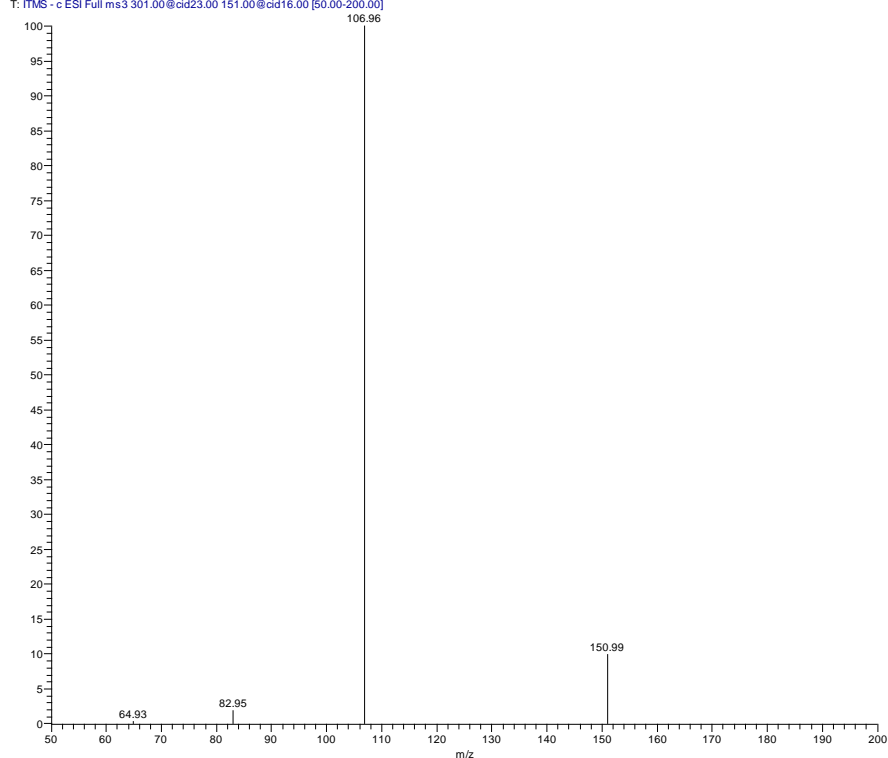
**Figura 49:** Cromatogramas extraídos para um m/z de 301 no modo negativo das soluções 80:20 de metanol e éter etílico da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira e das soluções dos padrões C) ácido abiético e D) hidrato de quercetina.

PITCHIBERFILT neg 301\_220502154534 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.77E2  
T: ITMS - c ESI Full ms2 301.00@cid23.00 [80.00-350.00]



A

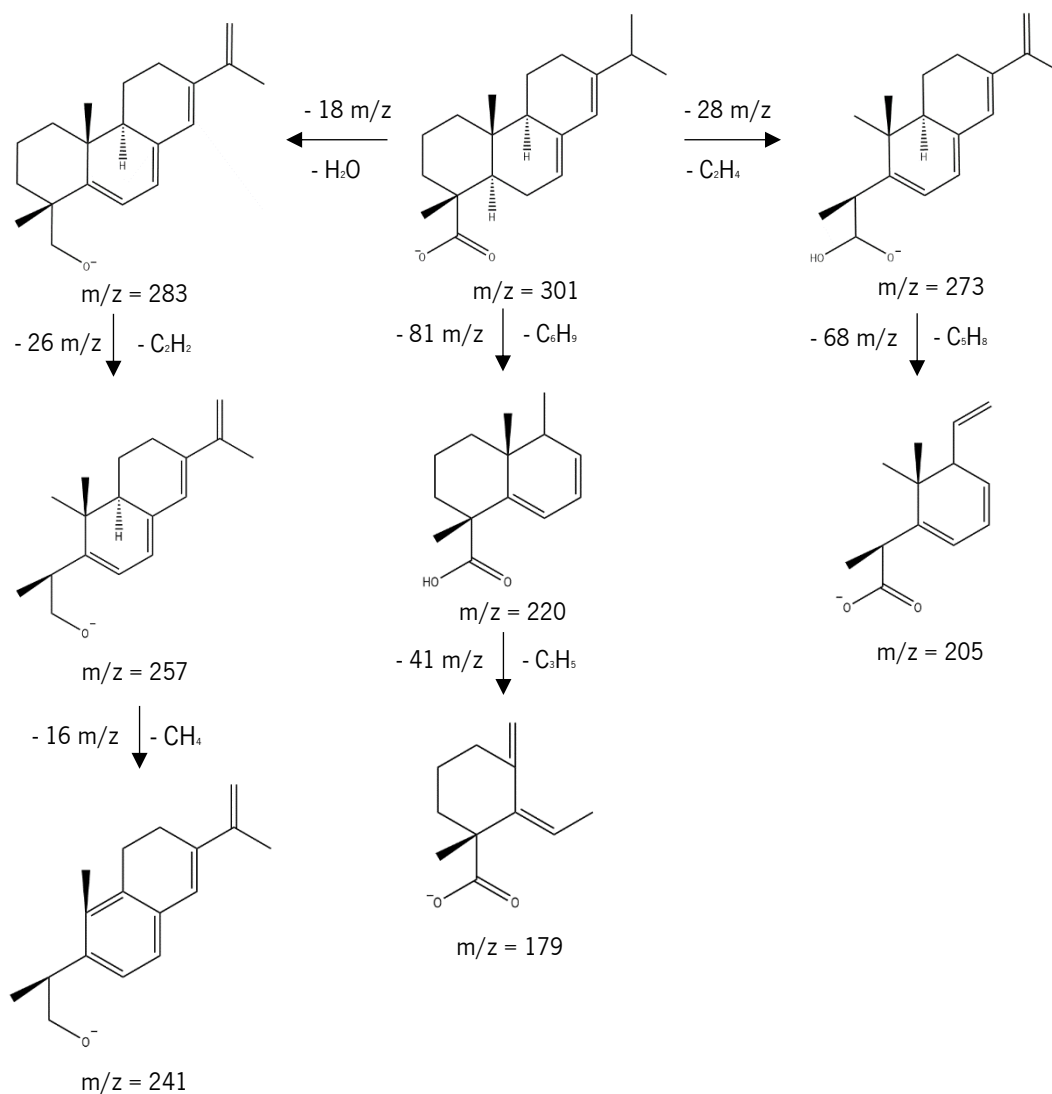
PITCHIBERFILT neg 301 ms151\_220502160156 #4-141 RT: 0.02-0.76 AV: 138 NL: 3.64F1  
T: ITMS - c ESI Full ms3 301.00@cid23.00 151.00@cid16.00 [50.00-200.00]



B

**Figura 50:** Espectros de massa no modo negativo do A) ião 301 e do seu B) ião “filho” 151 da solução filtrada de amostra ibérica.





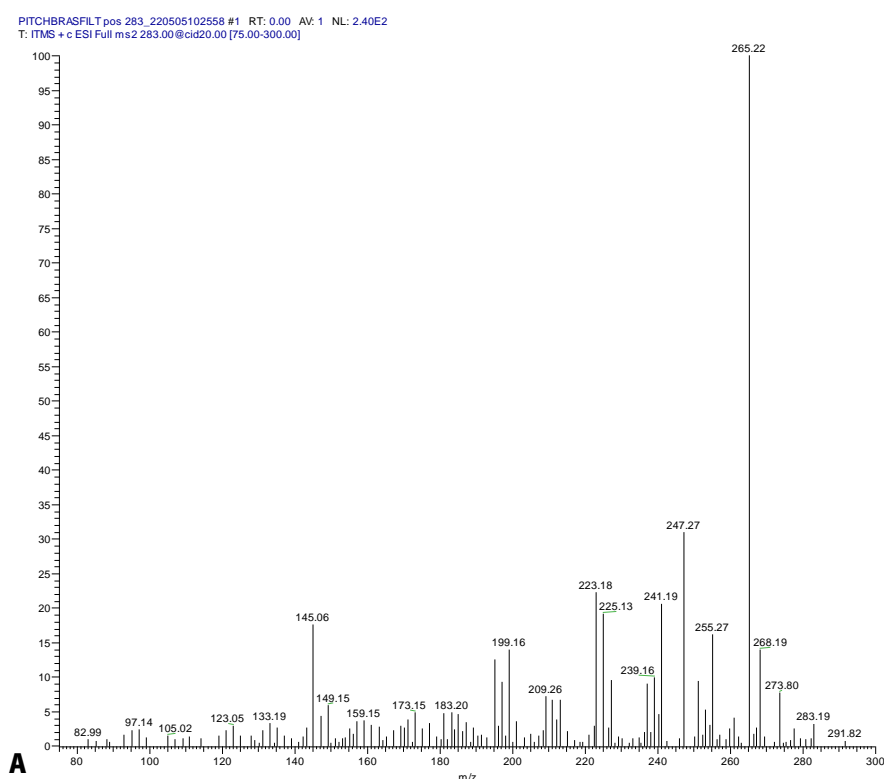
**Figura 51:** Esquema da proposta de fragmentação do ácido abiético.

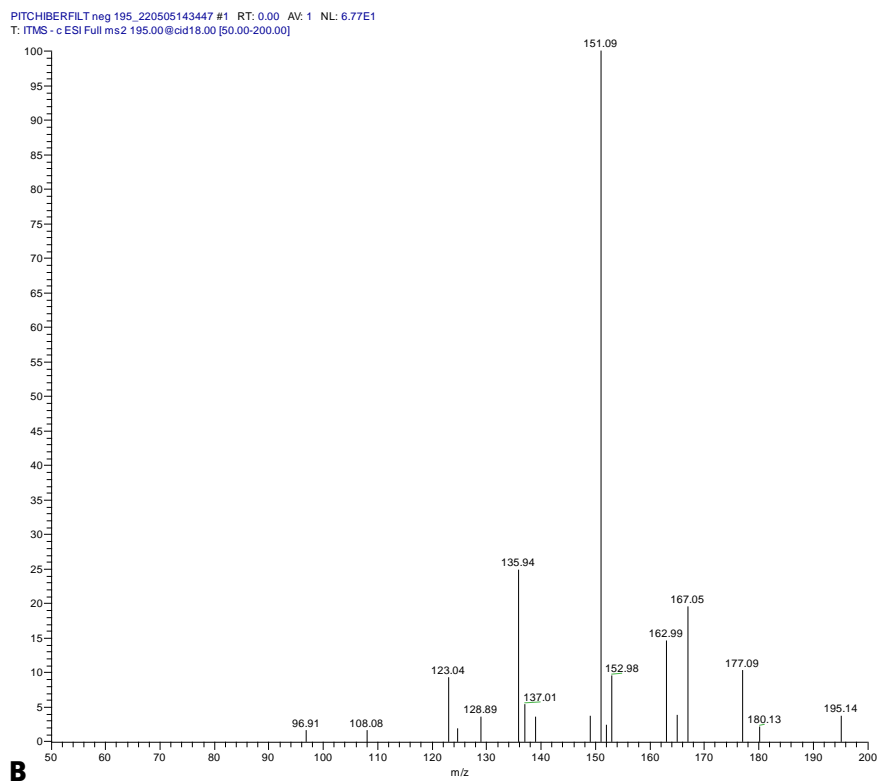
Constatou-se que não há presença de ácido palmítico na *pitch*. Analisando o cromatograma do ácido palmítico observa-se um pico bem definido no modo negativo a 14,4 min correspondente a um pico do ião com  $m/z = 255$ , o pico M-1 deste composto. No entanto, o pico do ião com  $m/z = 255$  não aparece nos cromatogramas da amostra ibérica e da amostra brasileira. Além disso, não se observou um pico do ião com  $m/z = 257$  no modo positivo nos cromatogramas deste padrão e das amostras.

O cromatograma do ácido oleico apresenta um pico do ião com  $m/z = 281$  bem definido no modo negativo, o pico M-1 do ácido oleico, a 15,3 min. Este pico não aparece na amostra ibérica nem na amostra brasileira, mas no modo positivo a 15,2 min no cromatograma da amostra brasileira e do ácido oleico observa-se alguns iões em comum nos espectros de massa desses picos tais como, 686, 728, 962, 1391 e 1432 (**Figuras 103.A e 103.B do Anexo C.2**). Estes iões podem dever-se a reações de adição e polimerização do ácido oleico que ocorreram graças à voltagem elevada da fonte de ionização

do espectrômetro de massa. O espectro de massa do íon 283 da solução filtrada de amostra brasileira mostra dois íons “filhos” característicos do ácido oleico, o 265 e 241 (**Figura 52**) e alguns dos íons existentes no espectro podem ser explicados por determinadas fragmentações do ácido oleico (**Figura 53**). Além disso, com recurso ao *software* da mzCloud, determinou-se que o ácido oleico tem uma probabilidade de 88% de ter dado origem ao espectro do íon 283. Tendo em consideração estes resultados o ácido oleico aparenta estar presente apenas na amostra brasileira.

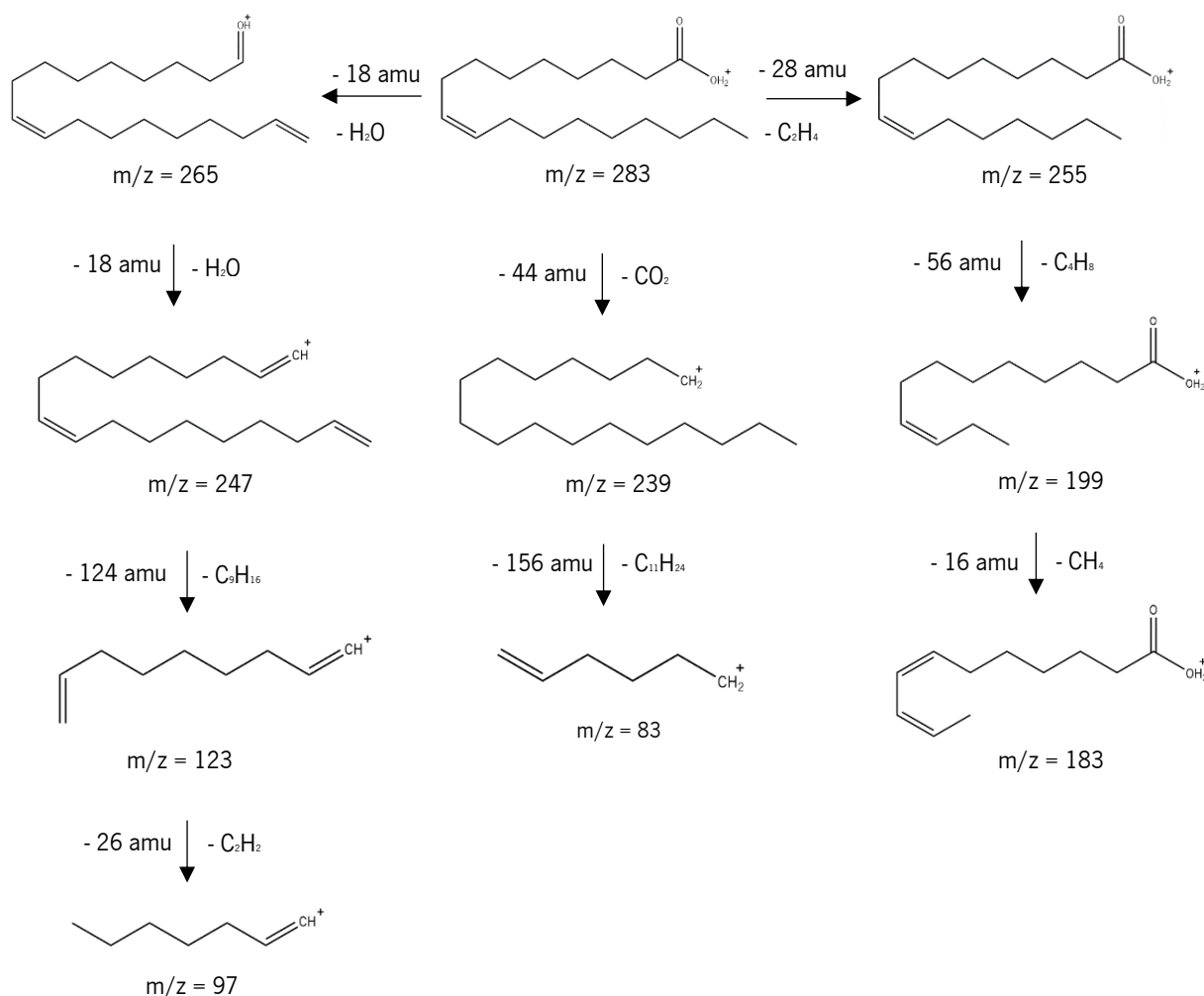
Por sua vez, o cromatograma do acetato de linalilo não apresenta os picos M-1 e M+1 mas, no modo negativo a, aproximadamente, 0,8 min no cromatograma da amostra ibérica e do acetato de linalilo observa-se alguns íons em comum nos espectros de massa desses picos tais como, 223, 387, 633, 715 e 961 (**Figuras 103.C e 103.D**). Tal como no caso do ácido oleico estes íons podem dever-se a reações de adição e polimerização do acetato de linalilo. Além disso, constatou-se que, ao fazer injeções diretas deste padrão no espectrômetro de massa, o padrão de fragmentação do íon 195 (M-1) deste padrão é muito semelhante ao padrão de fragmentação do íon 195 da solução filtrada de amostra ibérica (**Figura 52.B**). O espectro de massa da amostra mostra íons “filhos” característicos do acetato de linalilo, nomeadamente, 177, 167, 153, 151 e 137. As possíveis estruturas químicas do acetato de linalilo que podem ter originado alguns destes íons estão presentes na **Figura 54**. Considerando estes resultados acetato de linalilo aparenta estar presente apenas na amostra ibérica.





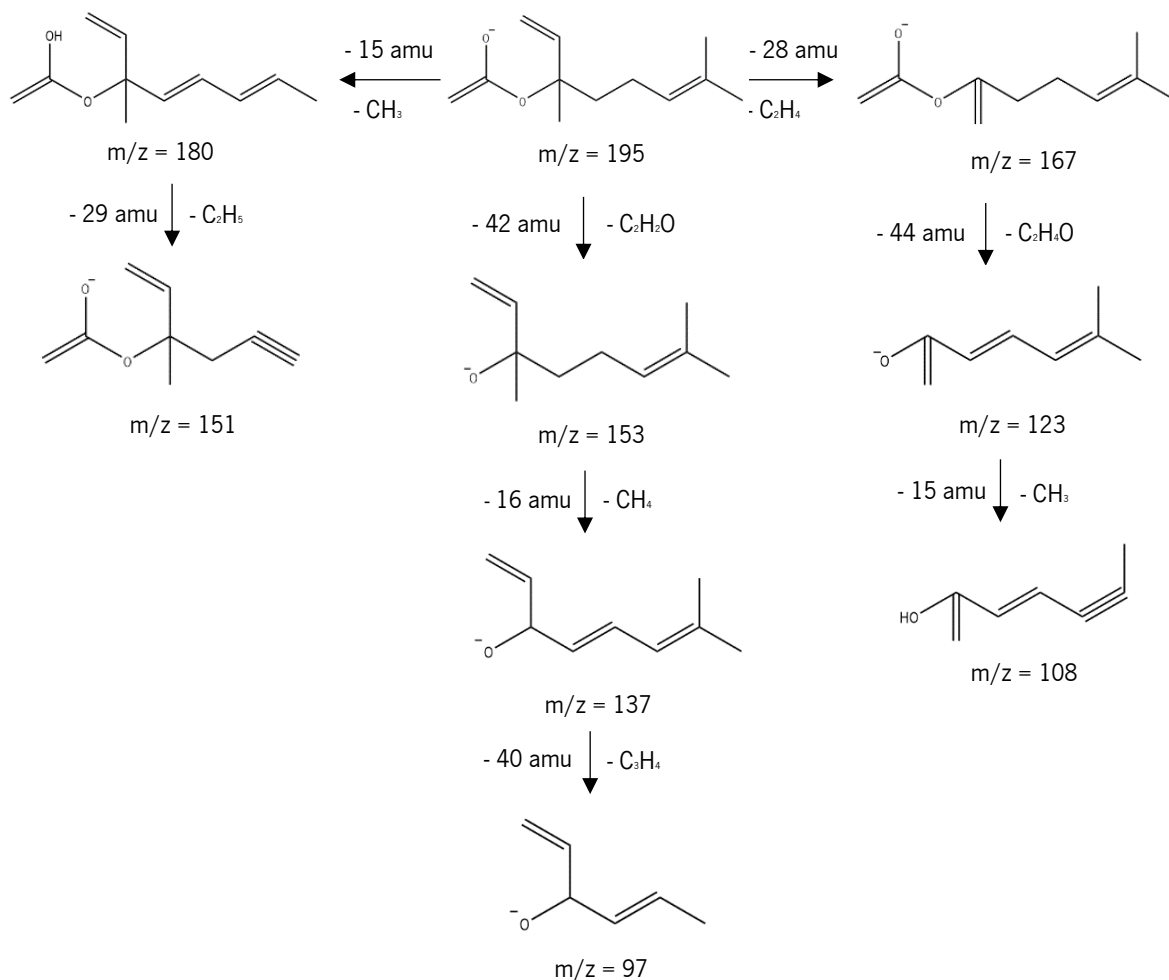
**Figura 52:** Espectros de massa no A) modo positivo do ião 283 da solução filtrada de amostra brasileira e no B) modo negativo do ião 195 da solução filtrada de amostra ibérica.

Como se pode ver na **Figura 55.C** os dois picos do ião com  $m/z = 318$  ( $M+1$ ) do 2-amino-1,3,4-octadecanotriol surgem no intervalo de tempo 0,5-2 min. Os tempos de retenção dos picos do ião 318 nos cromatogramas das duas amostras de *pitch* surgem neste intervalo de tempo de retenção a 1,1 e 0,7 min para a amostra ibérica e brasileira, respetivamente (**Figura 55.A e 55.B**). Conclui-se, assim, que o composto 2-amino-1,3,4-octadecanotriol está presente em ambas as amostras. Com recurso ao *software* da mzCloud, determinou-se que este composto tem uma probabilidade de 54% de ter dado origem ao espectro do ião 318. O espectro de massa do ião 318 no modo positivo da solução filtrada de amostra ibérica e o esquema da proposta de fragmentação do 2-amino-1,3,4-octadecanotriol estão apresentados na **Figura 56 e Figura 57**, respetivamente.

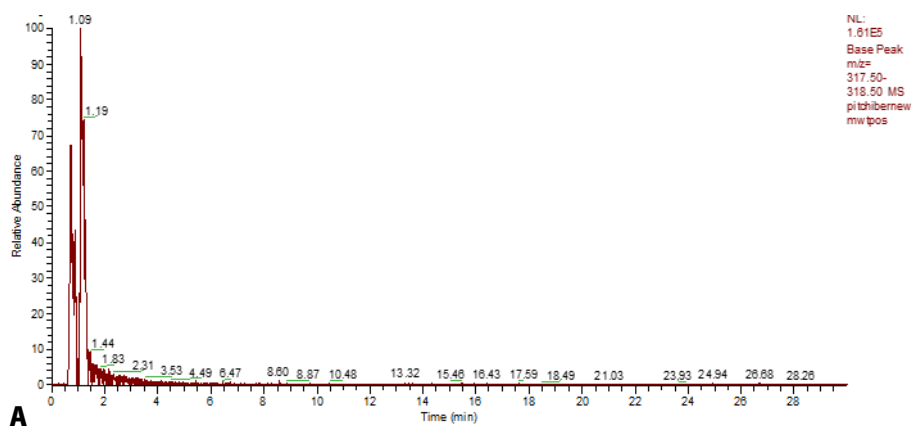


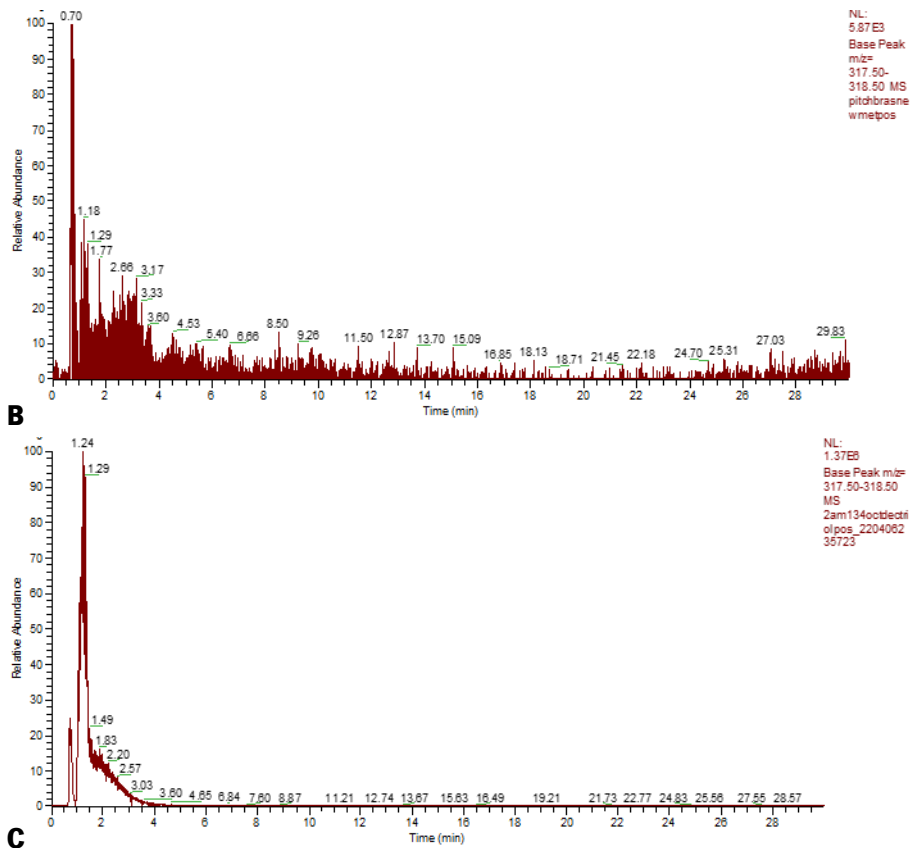
**Figura 53:** Esquema da proposta de fragmentação do ácido oleico.

Além das análises de HPLC-MS das soluções 80:20 de metanol e éter etílico da amostra ibérica e amostra brasileira também se fez análises de ESI-MS/MS destas soluções. Um dos iões analisados foi o 287 cujo espectro de massa está presente na **Figura 58**. O padrão de fragmentação deste ião foi comparado com os de compostos presentes nas bibliotecas de modo a descobrir o composto mais provável de ter dado origem a este espectro específico. Pensa-se que a cianidina dá o espectro de massa do ião 287 devido à probabilidade deste composto ter dado origem ao espectro do ião 287 ser de 67%. A proposta de fragmentação deste componente está esquematizada na **Figura 59**. Cianidina é um composto natural encontrado em plantas que possui atividade antioxidante e a sua presença foi previamente reportada em agulhas de *Pinus* spp..<sup>111</sup> Este composto aparenta estar presente nas duas amostras de *pitch*.

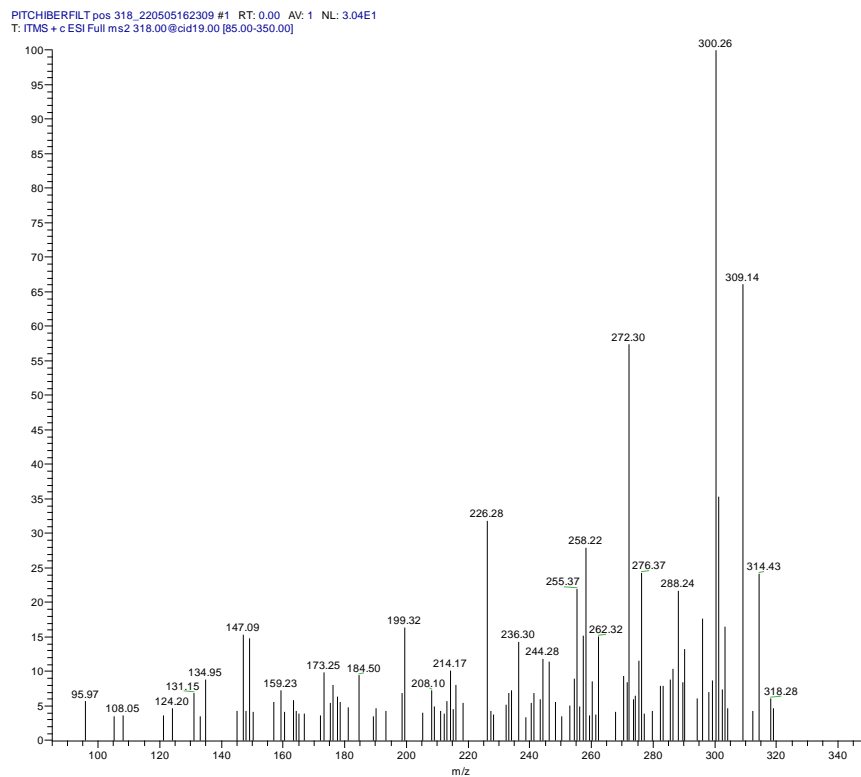


**Figura 54:** Esquema da proposta de fragmentação do acetato de linalilo.

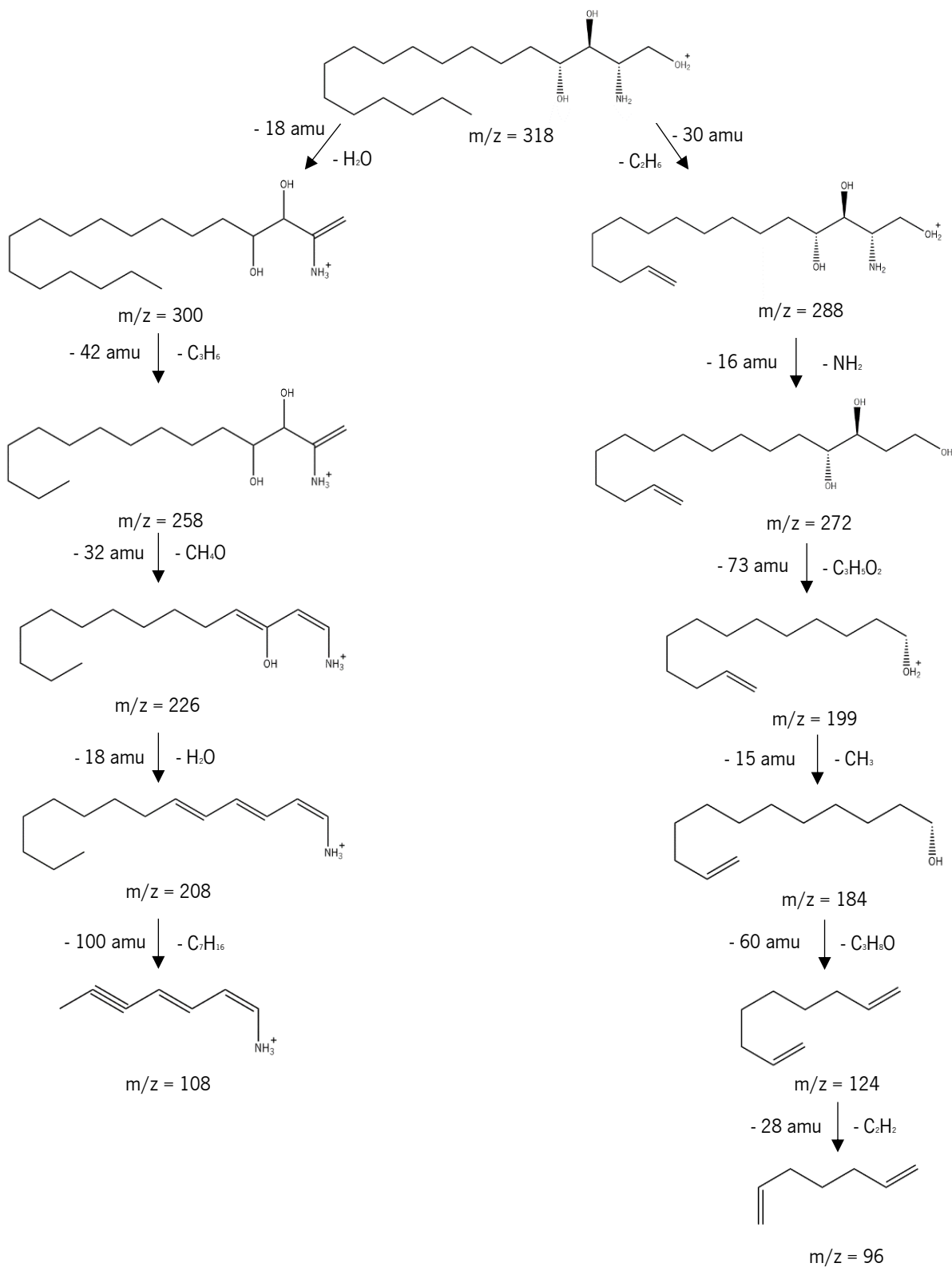




**Figura 55:** Cromatogramas extraídos para um m/z de 318 no modo positivo das soluções 80:20 de metanol e éter etílico da A) amostra ibérica, B) amostra brasileira e C) solução do padrão 2-amino-1,3,4-octadecanotriol.

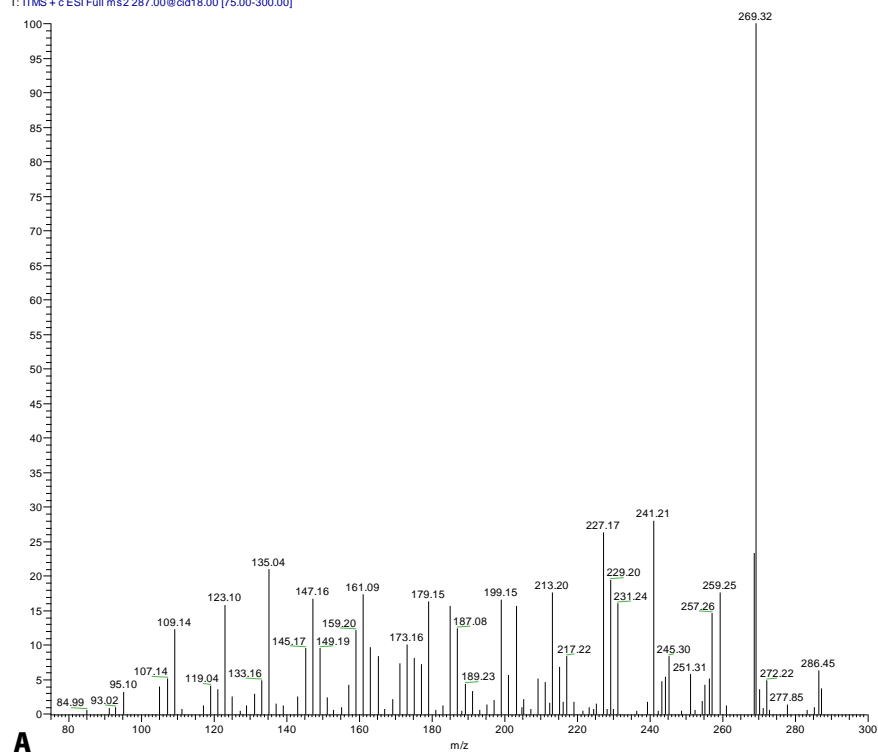


**Figura 56:** Espetros de massa no modo positivo do íon 318 da solução filtrada de amostra ibérica.

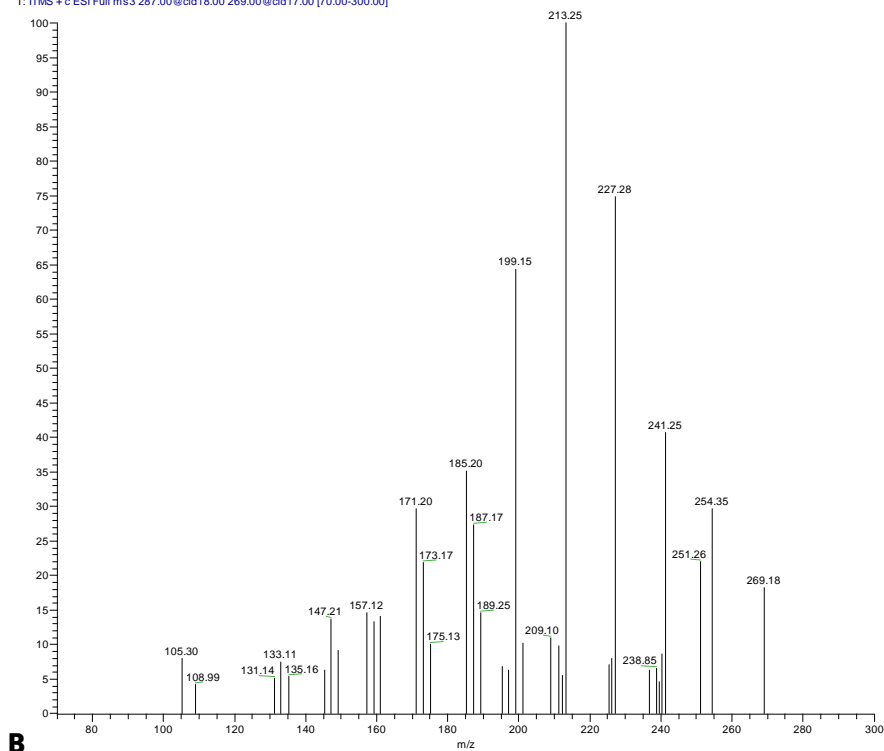


**Figura 57:** Esquema da proposta de fragmentação do 2-amino-1,3,4-octadecanotriol.

PITCHIBER 100mg pos 287\_220510141942 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.81E2  
T: ITMS + c ESI Full ms2 287.00@cid18.00 [75.00-300.00]

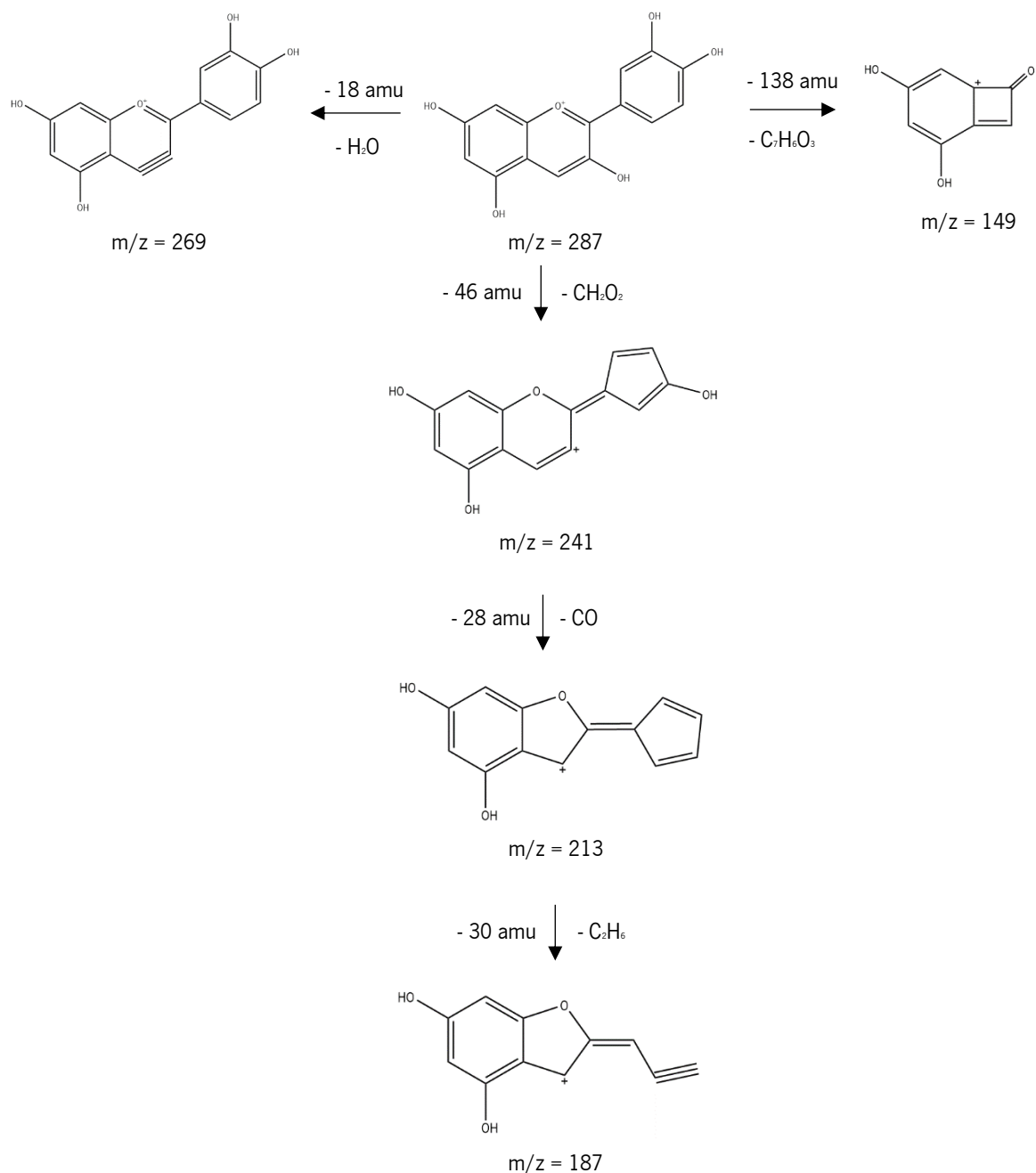


PITCHIBER 100mg pos 287 ms269\_220510161723 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.37E1  
T: ITMS + c ESI Full ms3 287.00@cid18.00 269.00@cid17.00 [70.00-300.00]



**Figura 58:** Espetros de massa no modo positivo do A) ião 287 e do seu B) ião “filho” 269 da solução 80:20 de metanol e éter etílico da amostra ibérica.

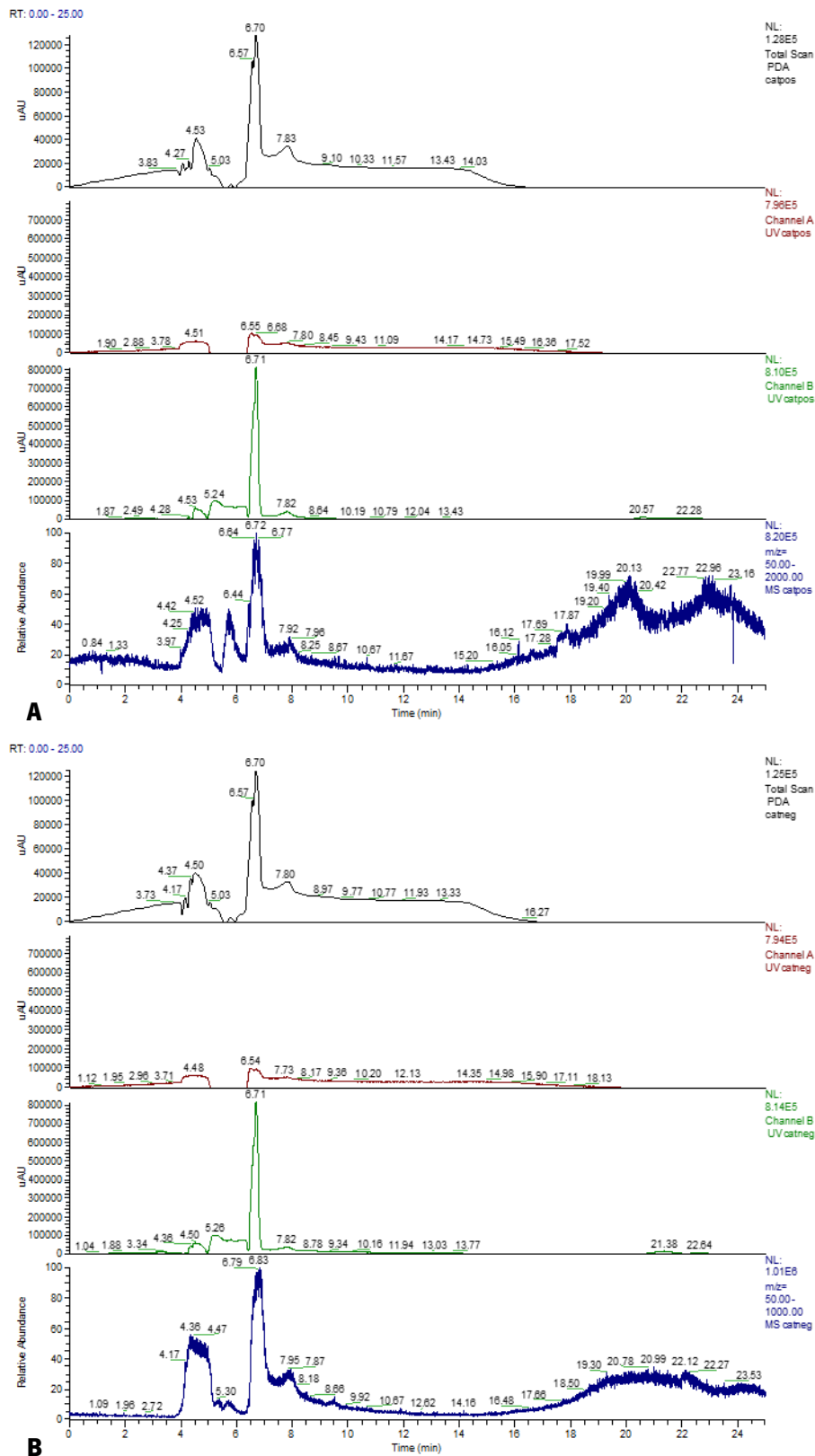




**Figura 59:** Esquema da proposta de fragmentação da cianidina.

A (+)-catequina é um dos monómeros de procianidinas poliméricas, sendo as procianidinas compostos fenólicos que estão amplamente distribuídas nas folhas, frutas e madeira de uma vasta variedade de plantas<sup>112</sup>, e observou-se perdas de massa de 288 e 152 nos espectros de massa de determinados iões precursores nas soluções de *pitch* que poderiam ser pertencentes a procianidinas poliméricas, sendo estas perdas características da perda de uma molécula de (+)-catequina e da clivagem retro-Diels-Alder do sistema do anel heterocíclico da (+)-catequina, respetivamente. Além disso, a (+)-catequina já foi encontrada em extratos vegetais de *Pinus* spp.<sup>108-110,113</sup> Por estes motivos também se

adquiriu o padrão de hidrato de (+)-catequina para ser analisado por HPLC-MS juntamente com as soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira (**Figuras 60, 104 e 105**).

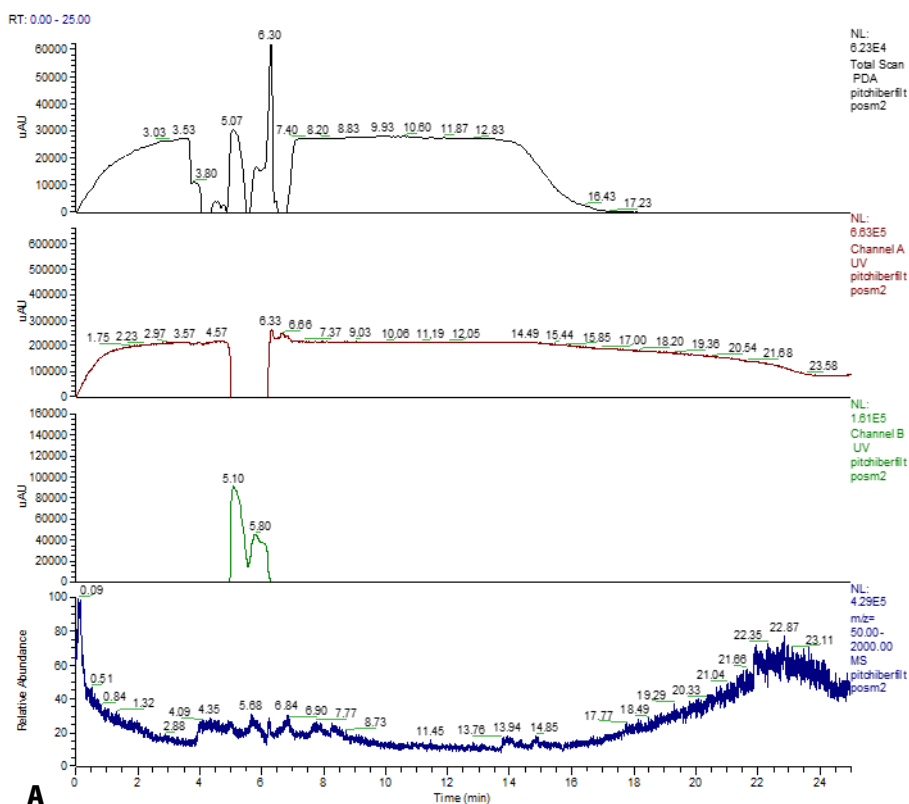


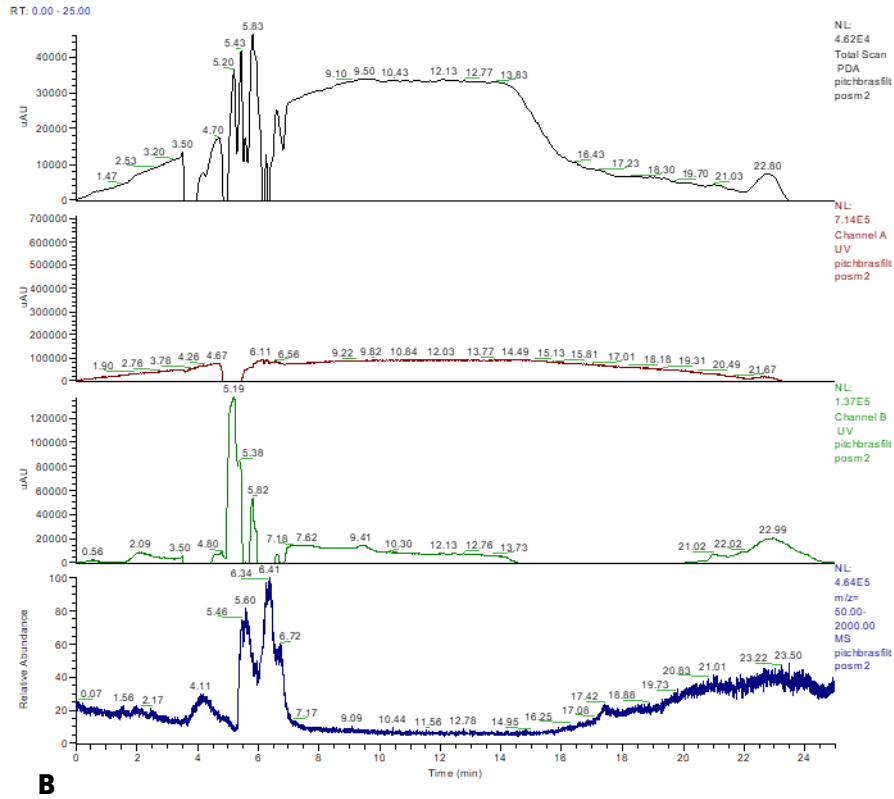
**Figura 60:** Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS da solução do padrão hidrato de (+)-catequina no A) modo positivo e B) modo negativo.

Constatou-se que não há presença de (+)-catequina na *pitch*. Analisando o cromatograma do hidrato de (+)-catequina observa-se dois picos do ião com  $m/z = 289$  bem definidos no modo negativo a 4,4 e 6,8 min, o pico M-1 de (+)-catequina. No entanto, os picos do ião com  $m/z = 289$  aparecem nos cromatogramas da amostra ibérica e da amostra brasileira a tempos de retenção diferentes, aos 20 e 24 min.

Apesar de não haver (+)-catequina na composição da *pitch* poderá haver outros compostos fenólicos presentes neste material uma vez que, nos espectros de UV do canal B (254 nm) das soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira das **Figuras 104 e 105** vê-se uma banda larga e intensa de 5,3 a 6,3 min em ambos os modos de ionização e os compostos aromáticos absorvem radiação UV a 254 nm devido às transições  $\pi-\pi^*$  do anel aromático.<sup>114</sup>

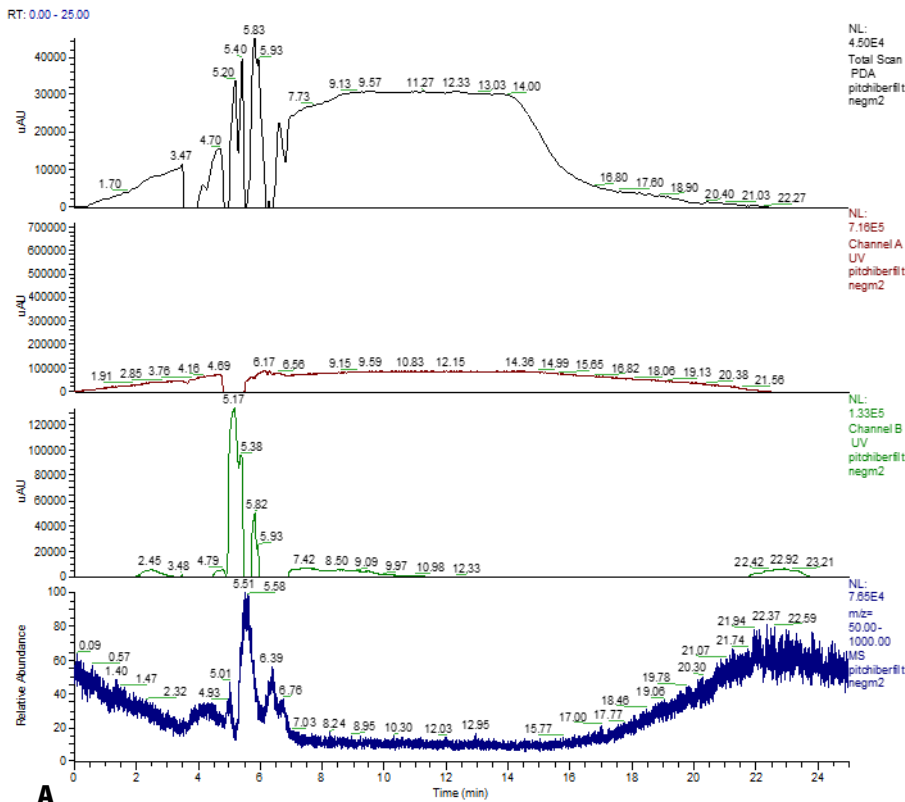
Além das análises de HPLC-MS do hidrato de (+)-catequina e das soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira em conjunto, também se fez análises de HPLC-MS apenas das soluções filtradas utilizando condições experimentais diferentes. Os cromatogramas das soluções filtradas obtidos destas análises nos modos de ionização positivo e negativo estão representados nas **Figuras 61 e 62**, respectivamente.



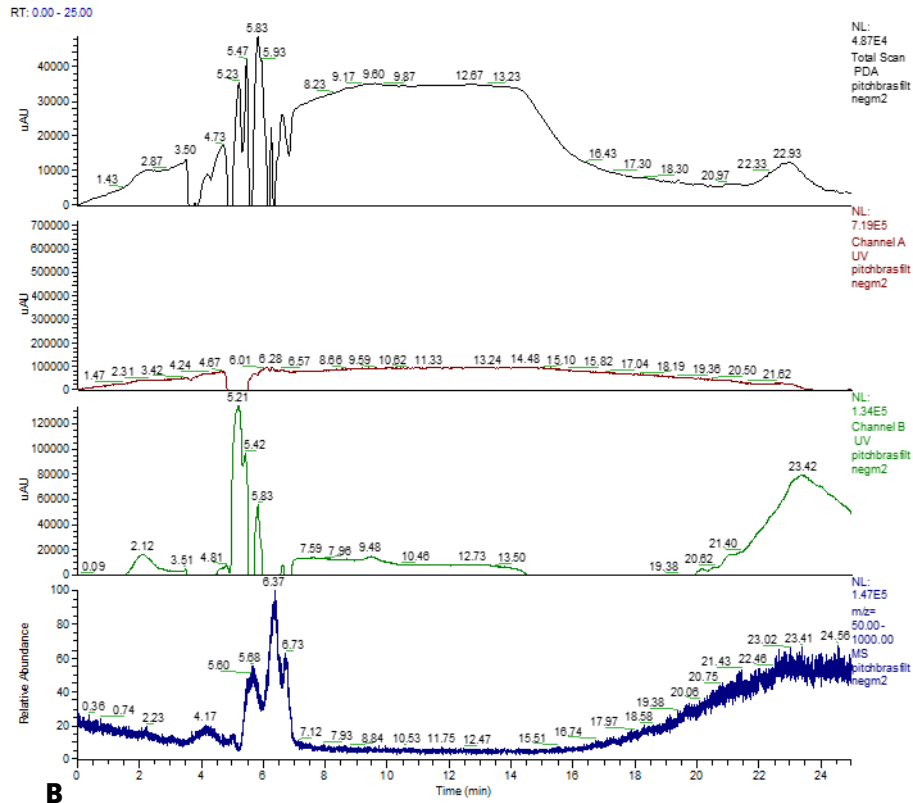


**B**

**Figura 61:** Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo positivo das soluções filtradas da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira.



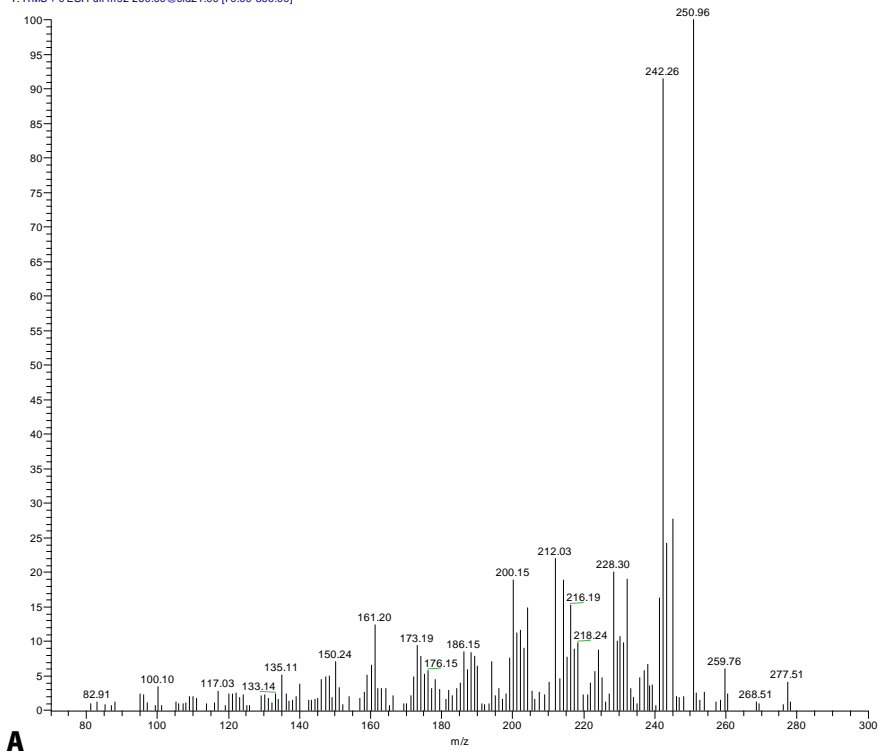
**A**



**Figura 62:** Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo negativo das soluções filtradas da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira.

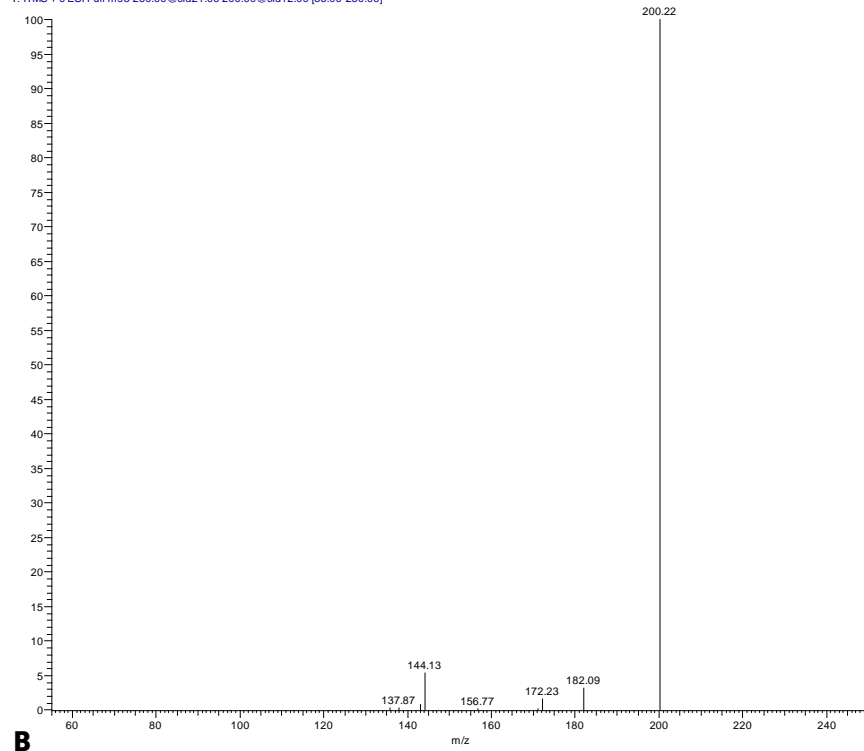
Os espectros de UV do canal B das soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira das **Figuras 61 e 62** mostram dois picos intensos a 5,1/5,2 min e 5,8 min em ambos os modos de ionização. Os espectros de massa dos picos observados nos cromatogramas da **Figura 61** estão apresentados nas **Figuras 106 e 107**. Alguns dos iões observados nesses espectros foram analisados por ESI-MS/MS, nomeadamente, os iões 269, 187 e 171 (**Figura 63**). Estes iões também estão presentes nos espectros de massa dos picos dos cromatogramas da **Figura 104**. Nesses espectros estão presentes com elevada intensidade os iões 260 e 181, tendo-se analisado estes iões também por ESI-MS/MS. Os padrões de fragmentação destes iões foram comparados com os de compostos presentes nas bibliotecas de modo a descobrir os compostos mais prováveis de terem dado origem a estes espectros específicos.

PITCHBRASFILT pos 260\_220509111820 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.47E2  
T: ITMS + c ESI Full ms2 260.00@cid21.00 [70.00-300.00]



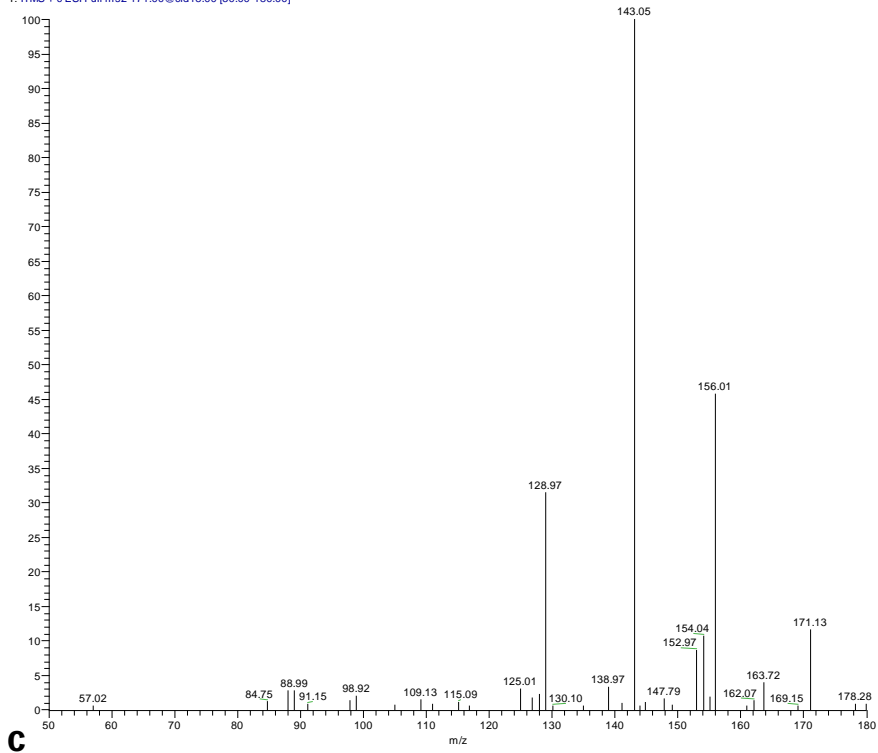
**A**

PITCHBRASFILT pos 260 ms200\_220509113209 #2-46 RT: 0.01-0.25 AV: 45 NL: 1.74E1  
T: ITMS + c ESI Full ms3 260.00@cid21.00 200.00@cid12.00 [55.00-250.00]



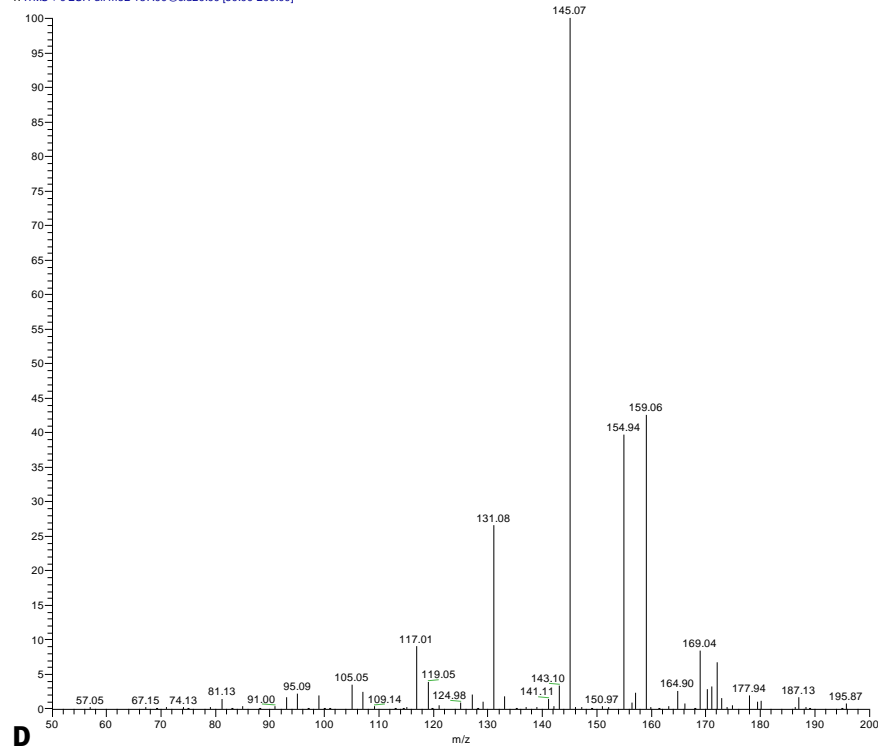
**B**

PITCHBRASILFILT\_pos 171\_220713154236 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.97E2  
T: ITMS + c ESI Full ms2 171.00@cid18.00 [50.00-180.00]



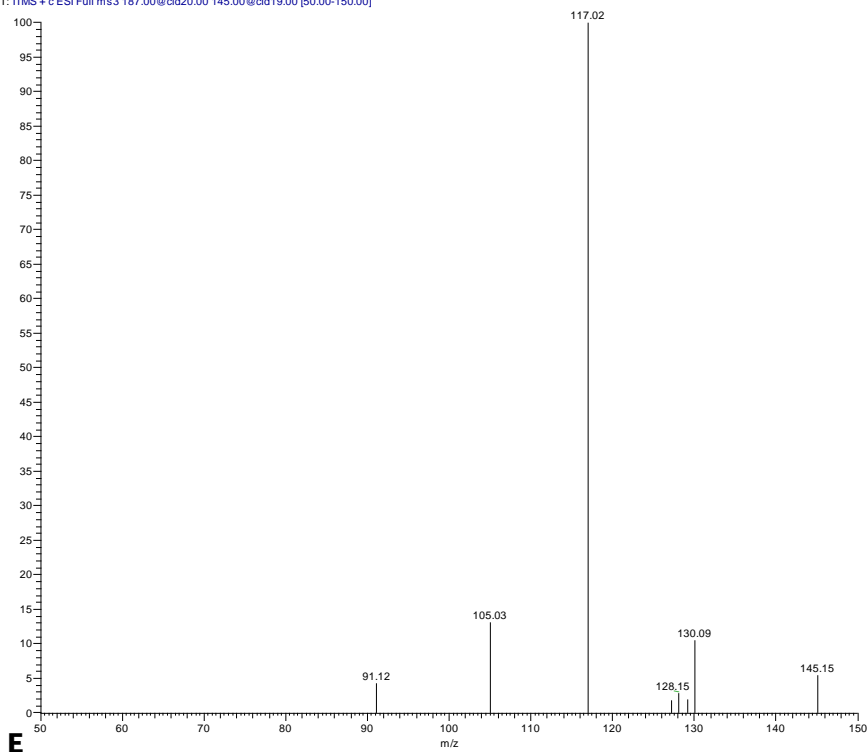
C

PITCHBRASILFILT\_pos 187\_220509142609 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.28E3  
T: ITMS + c ESI Full ms2 187.00@cid20.00 [50.00-200.00]



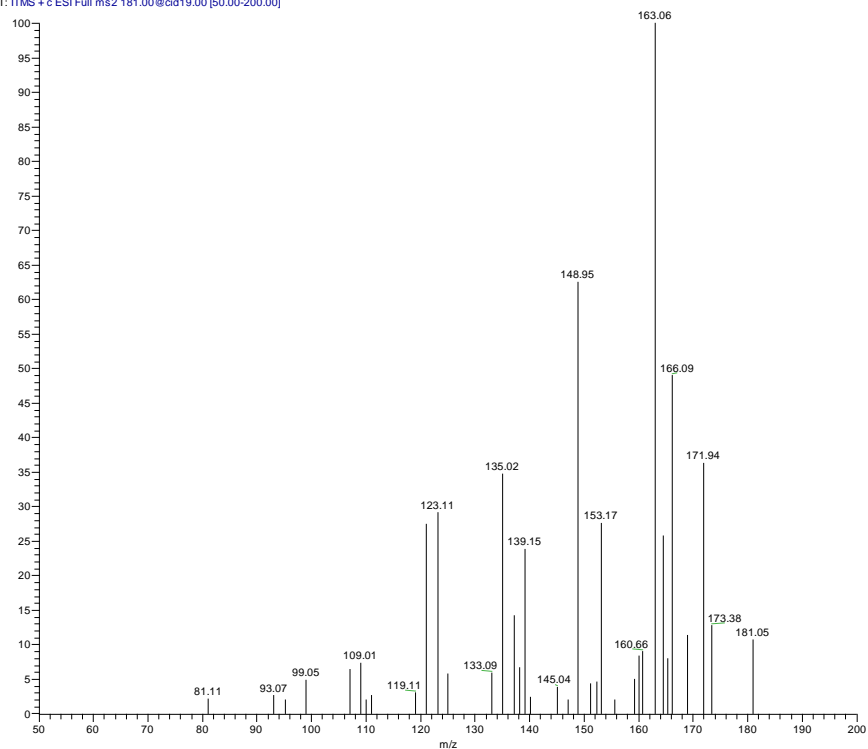
D

PITCHBRASFLT pos 187 ms145\_220509142609 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.12E2  
T: ITMS +c ESI Full ms3 187.00@cid20.00 145.00@cid19.00 [50.00-150.00]



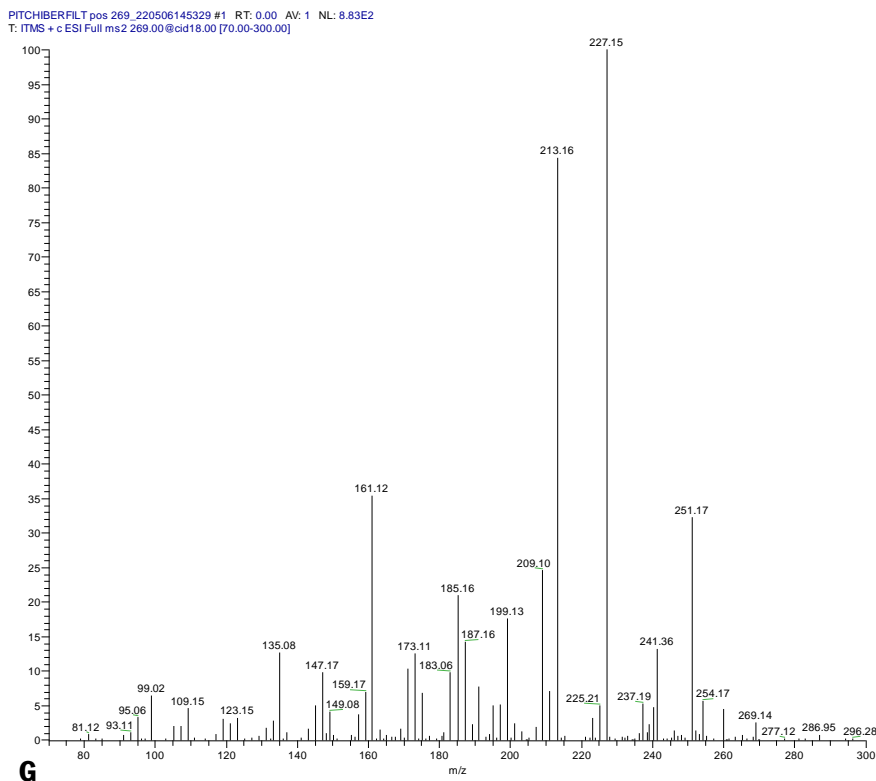
**E**

PITCHIBERFLT pos 181\_220506145329 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.50E1  
T: ITMS +c ESI Full ms2 181.00@cid19.00 [50.00-200.00]



**F**

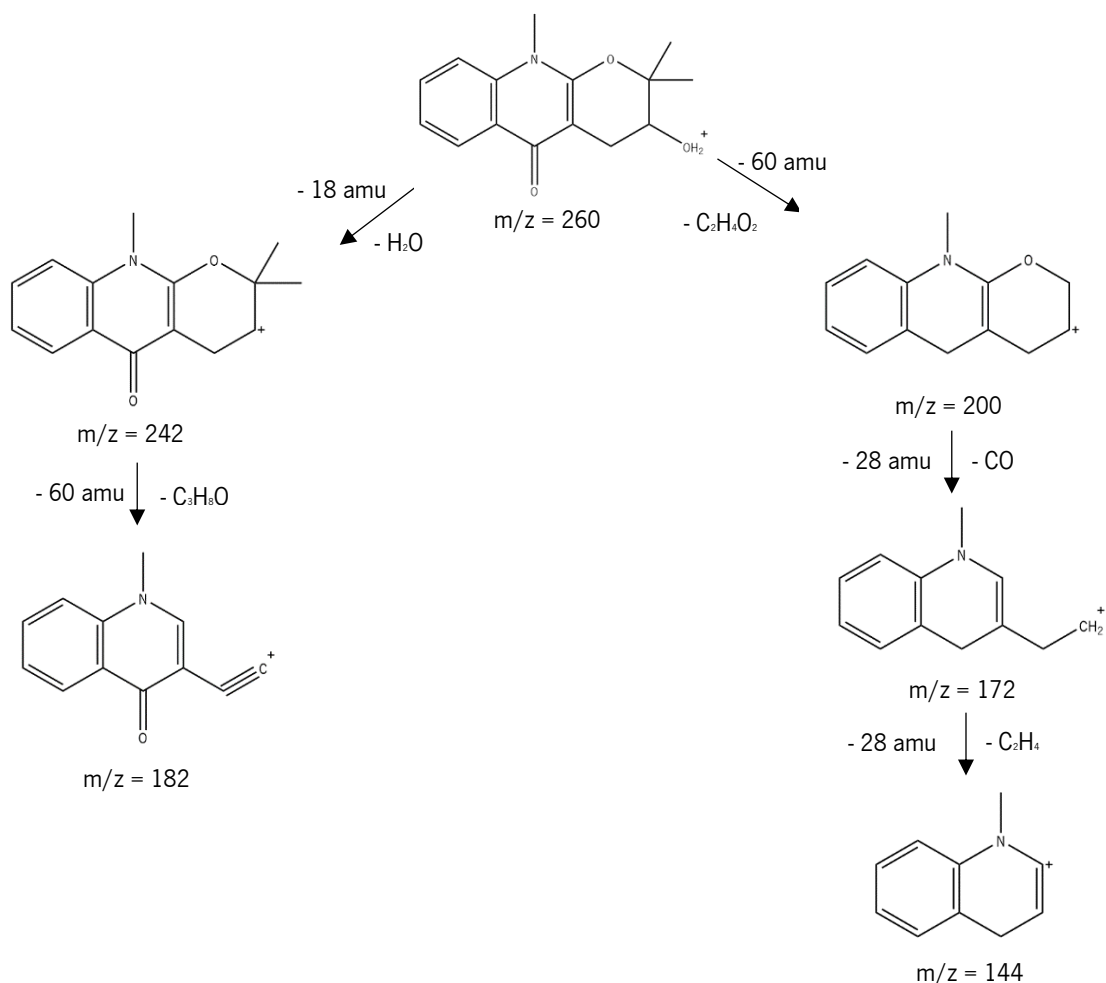




**Figura 63:** Espetros de massa no modo positivo do A) ião 260, do seu B) ião “filho” 200, C) ião 171, D) ião 187 e do seu E) ião “filho” 145 da solução filtrada de amostra brasileira e do F) ião 181 e G) ião 269 da solução filtrada de amostra ibérica.

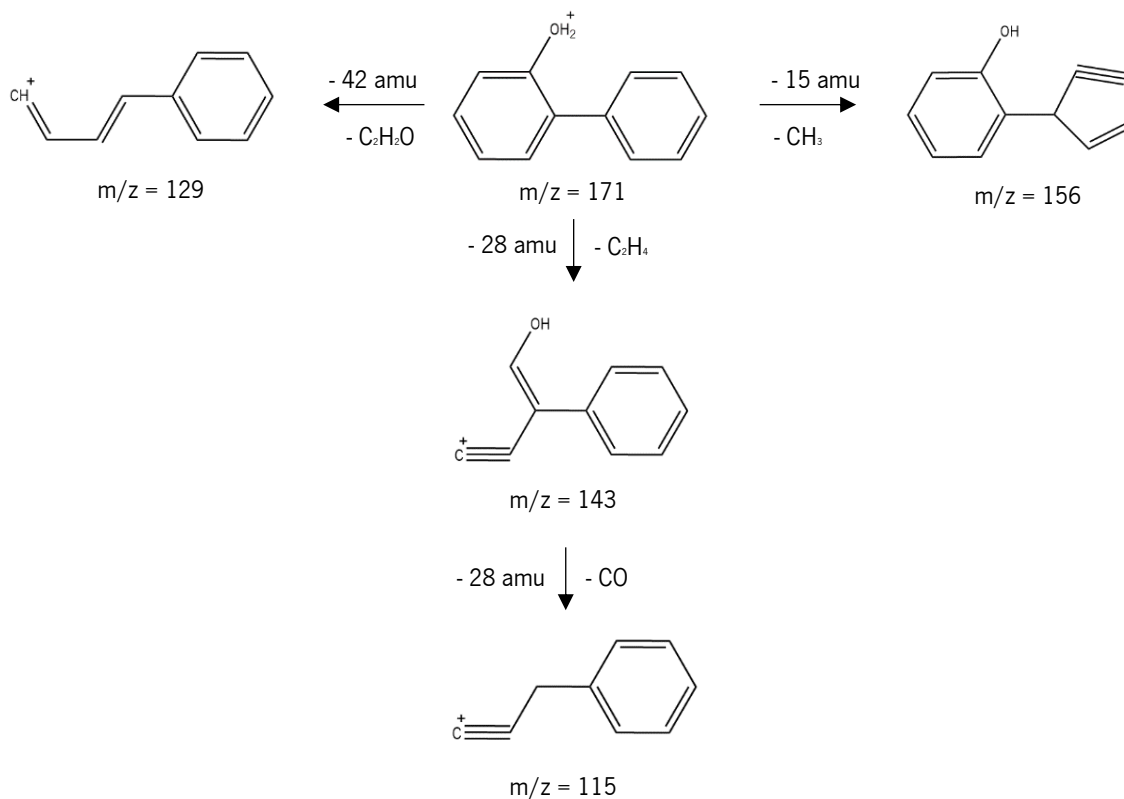
Através da comparação dos padrões de fragmentação do ião 260 com os de compostos das bibliotecas pensa-se que o composto que dá este espectro de massa seja a ribalinina. A ribalinina é um composto natural encontrado em plantas e determinados fragmentos da sua estrutura podem dar origem aos iões existentes nos espectros das **Figuras 63.A** e **63.B**. Este composto aparenta estar presente em ambas as amostras de *pitch*.

Por sua vez, pensa-se que os compostos que dão os espectros de massa do ião 171 e do ião 187 sejam o 2-fenilfenol e a ficusina, respetivamente. A proposta de fragmentação destes componentes está esquematizada na **Figura 65** e **Figura 66**. 2-fenilfenol e ficusina são metabolitos de plantas, sendo que foi reportado que o 2-fenilfenol possui atividade antifúngica. Ambos os compostos aparentam estar presentes nas duas amostras de *pitch*.

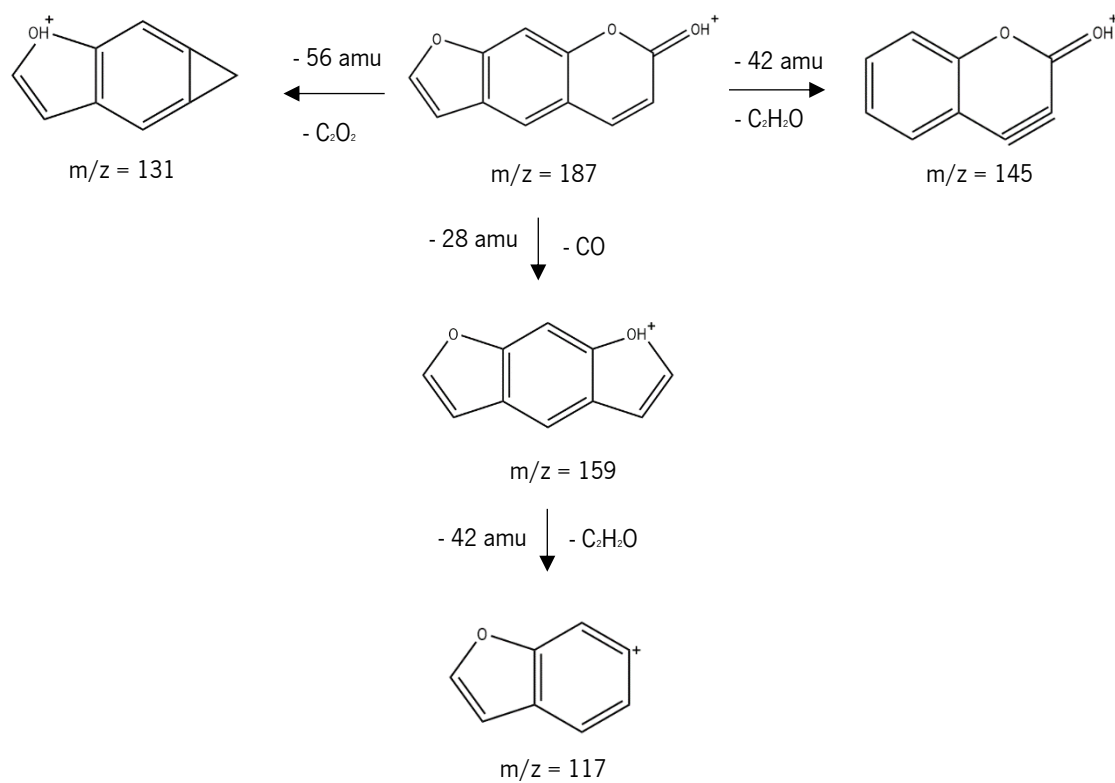


**Figura 64:** Esquema da proposta de fragmentação da ribalinina.

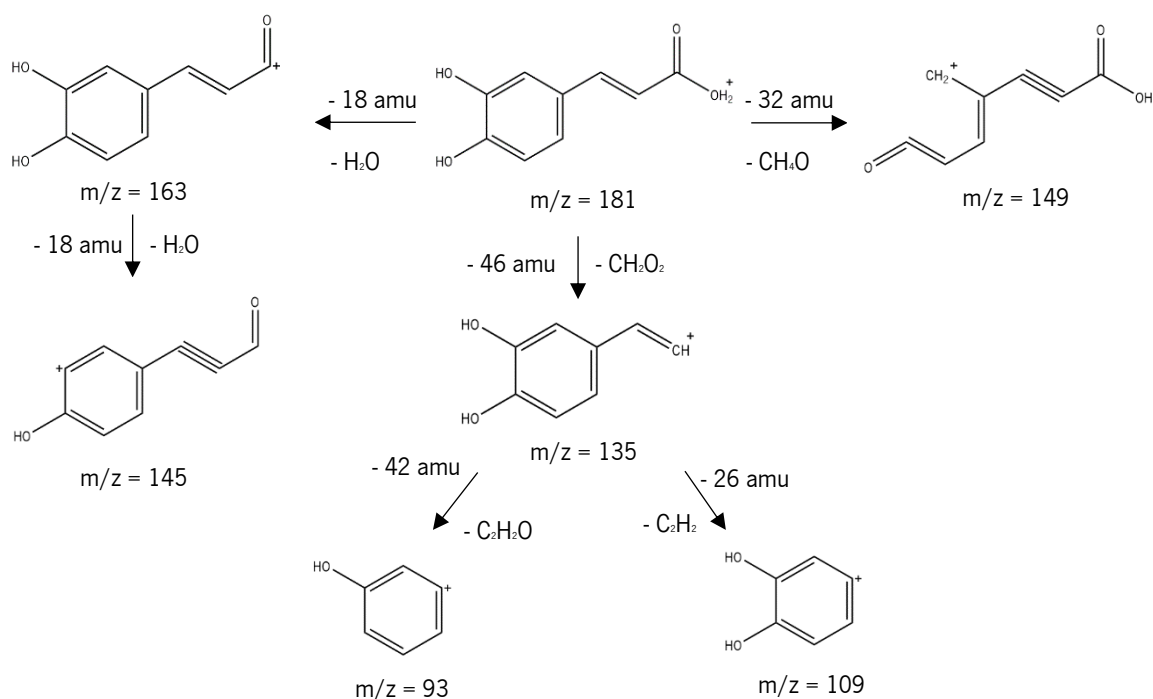
Ácido cafeico e formononetina aparentam estar presentes nas duas amostras de *pitch*. Ácido cafeico pode originar o espectro de massa da **Figura 63.F**. A proposta de fragmentação deste componente está esquematizada na **Figura 67**. Alguns fragmentos da estrutura da formononetina podem dar origem aos íons existentes no espectro da **Figura 63.G**. Ácido cafeico e formononetina são metabolitos de plantas. O ácido cafeico apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante e a sua presença foi previamente reportada em extratos vegetais de *Pinus* spp.,<sup>108,109</sup>



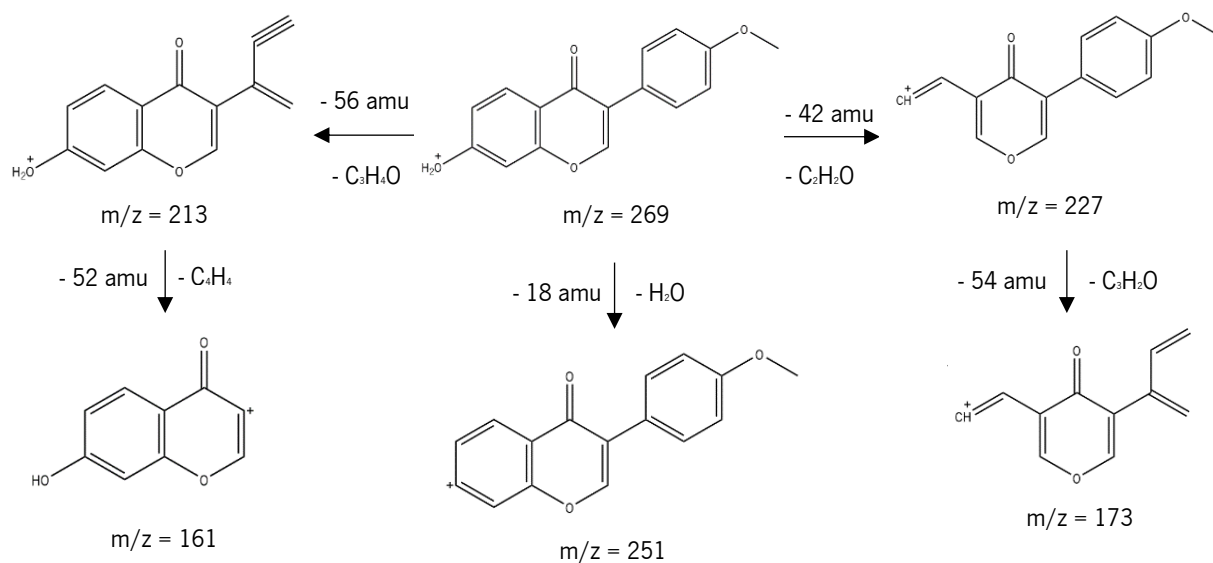
**Figura 65:** Esquema da proposta de fragmentação do 2-fenilfenol.



**Figura 66:** Esquema da proposta de fragmentação da ficusina.



**Figura 67:** Esquema da proposta de fragmentação do ácido cafeico.



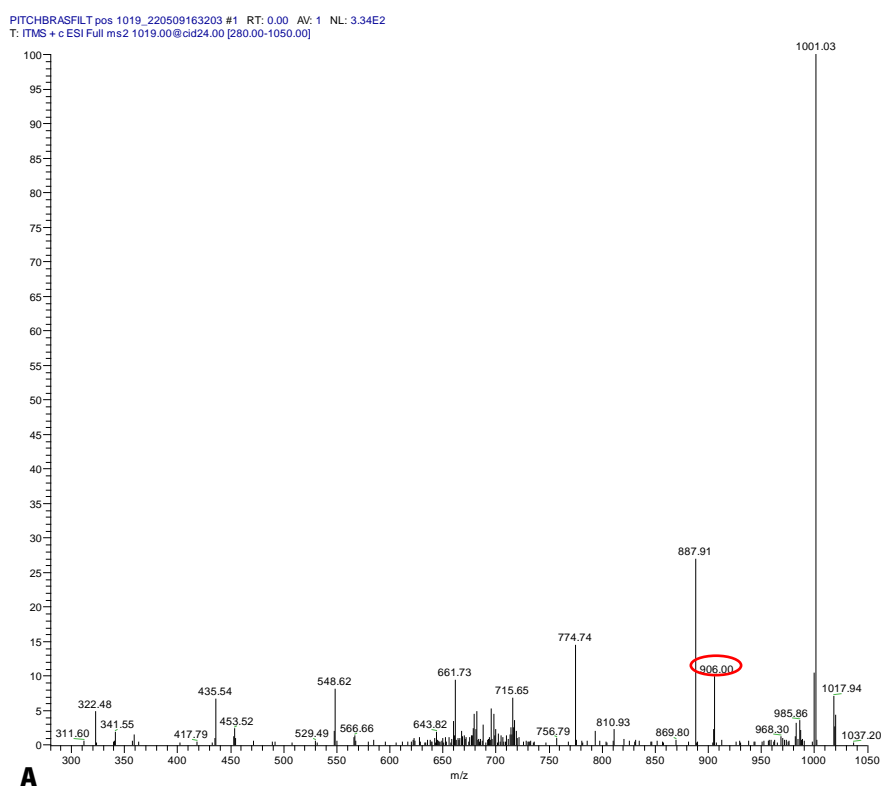
**Figura 68:** Esquema da proposta de fragmentação da formononetina.

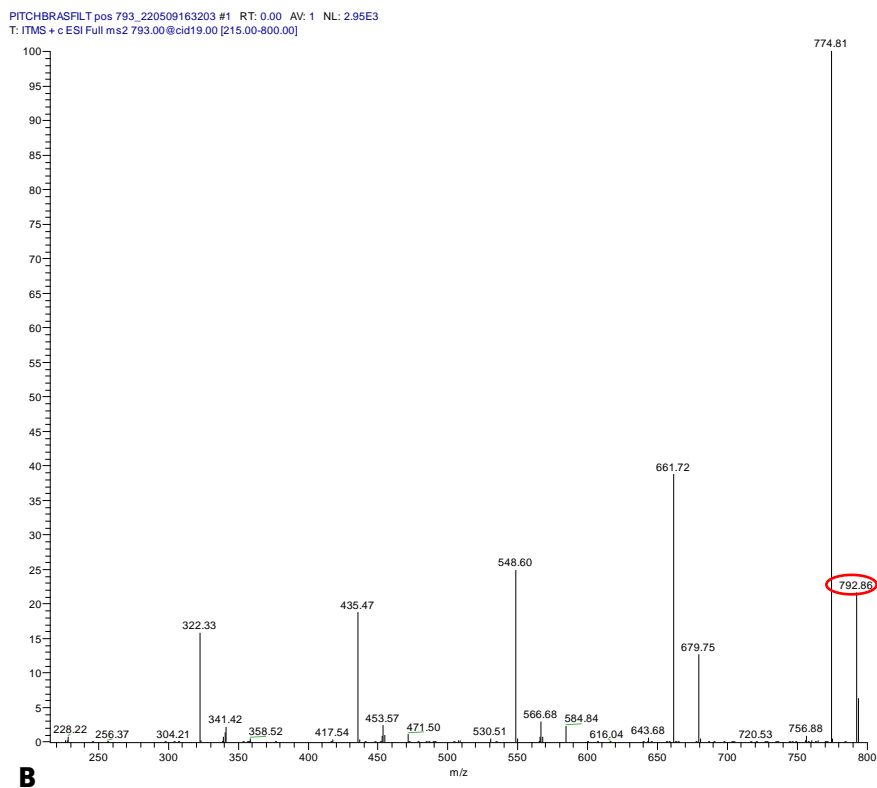
É importante notar que os picos dos cromatogramas das soluções filtradas da **Figura 104** cujos espectros de massa mostravam o íon 181 estão incluídos no intervalo de 5,3-6,3 min em que se observa a banda larga e intensa dos espectros de UV do canal B mencionada previamente. O pico do cromatograma da solução filtrada de amostra brasileira a 5,43 min cujo espectro de massa mostra o íon

269 (**Figura 107.B**) está incluído no pico do espectro UV do canal B a 5,2 min desta solução (**Figura 61.B**). Como o ácido cafeico e a formononetina são compostos fenólicos e absorvem radiação UV a 254 nm, isto é uma indicação da possível presença destes compostos na *pitch* e dos mesmos estarem presentes em grandes quantidades.

É também importante notar que no espectro de massa do pico a 6,37 min do cromatograma da solução filtrada de amostra brasileira da **Figura 107.C** observa-se o íon 197, que pode ser proveniente do acetato de linalilo.

Através da observação do espectro de massa da **Figura 107.C** verifica-se a presença de íões cuja diferença de massa entre eles aparenta ser de 113, nomeadamente, os íões 906 e 793. Analisando estes íões por ESI-MS/MS verificou-se que, de facto, ocorrem perdas de massa consecutivas de 113, tendo-se notado o seguinte padrão de fragmentação: 1019, 906 e 793. Os espectros de massa dos íões 1019 e 793 estão representados na **Figura 69**. Perdas de 113 podem dever-se à perda simultânea de duas moléculas de água (18+18 amu) e de uma estrutura cíclica com seis carbonos (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 77 amu). Isto indica que poderá haver um composto de massa molar de 1018 na *pitch* que possua, pelo menos, duas unidades polifenólicas repetidas com massa equivalente a 113.



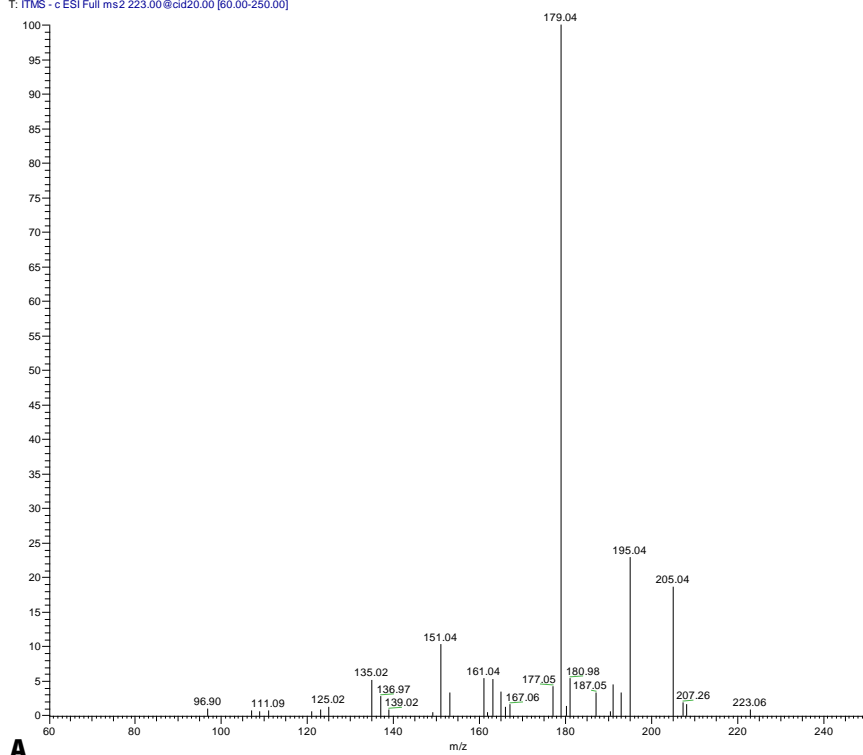


**Figura 69:** Espectros de massa no modo positivo do A) ião 1019 e B) ião 793 da solução filtrada de amostra brasileira.

Nas **Figuras 108 e 109** vê-se os espectros de massa no modo negativo dos picos observados nos cromatogramas da **Figura 62**. Alguns dos iões observados nesses espectros foram analisados por ESI-MS/MS, nomeadamente, os iões 387, 375, 337, 305, 223 e 141 (**Figura 70**). Muitos destes iões estavam presentes com elevada intensidade nos espectros de massa dos picos dos cromatogramas da **Figura 105**. Iões de maior  $m/z$  tais como, o 709, 469 e 425 não puderam ser analisados por ESI-MS/MS devido ao sinal destes iões ser muito baixo.

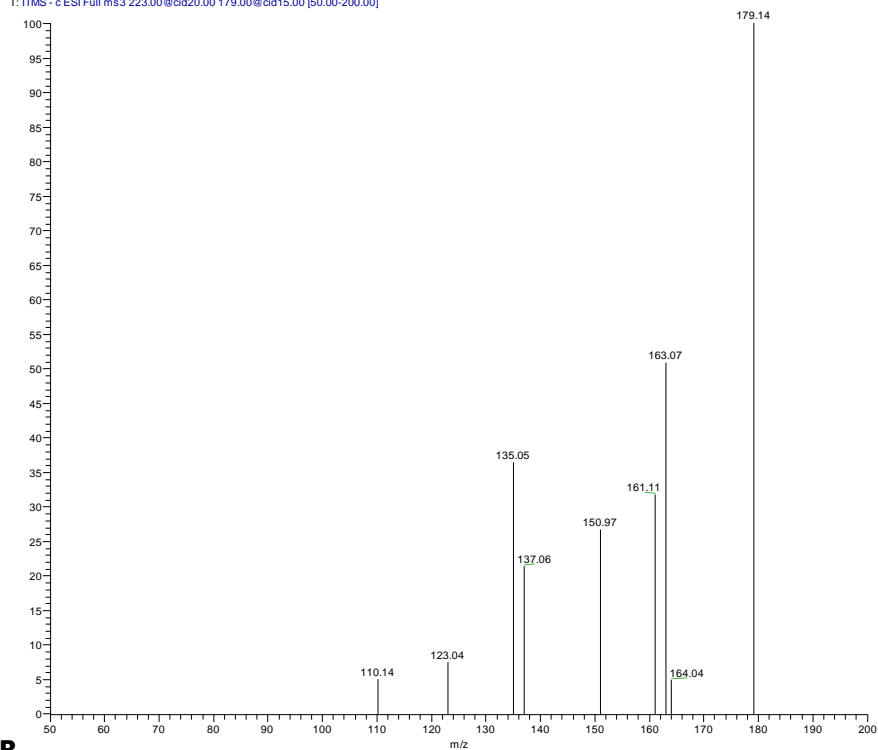
Ácido 13-oxo-9,11-tridecadienóico e ácido mussaenosídico aparentam estar presentes na *pitch*. Ácido 13-oxo-9,11-tridecadienóico pode originar os espectros de massa das **Figuras 70.A e 70.B**. A proposta de fragmentação deste componente está esquematizada na **Figura 71**. Vários fragmentos da estrutura do ácido mussaenosídico podem dar origem aos iões existentes nos espectros da **Figura 70.C**. Ácido 13-oxo-9,11-tridecadienóico é um ácido gordo de cadeia longa e o ácido mussaenosídico é um composto encontrado em plantas.

PITCHBRASFILT neg 223\_220509103218 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.49E2  
T: ITMS - c ESI Full ms2 223.00@cid20.00 [60.00-250.00]



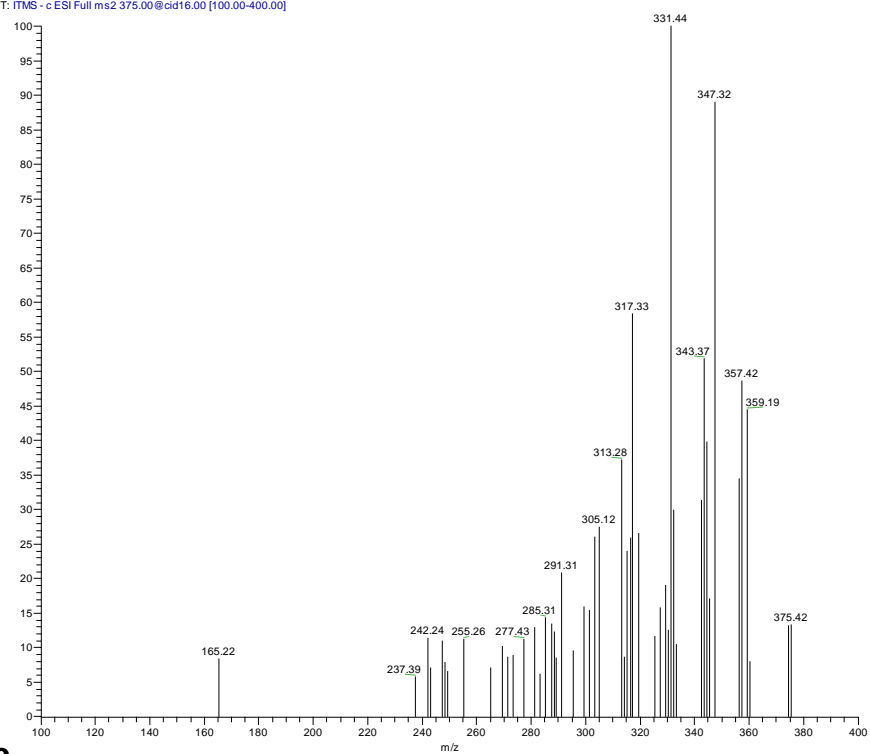
**A**

PITCHBRASFILT neg 223 ms179\_220509103218 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.28E1  
T: ITMS - c ESI Full ms3 223.00@cid20.00 179.00@cid15.00 [50.00-200.00]



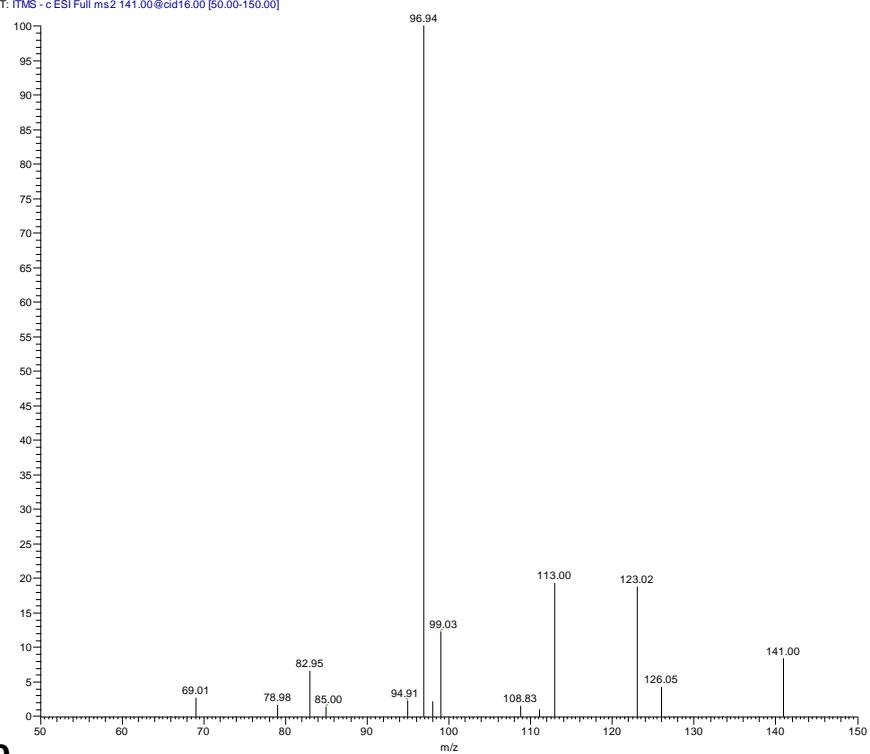
**B**

PITCHBRASILFILT neg 375\_220713141944 #139 RT: 0.63 AV: 1 NL: 1.79E1  
T: ITMS - c ESI Full ms2 375.00@cid16.00 [100.00-400.00]



C

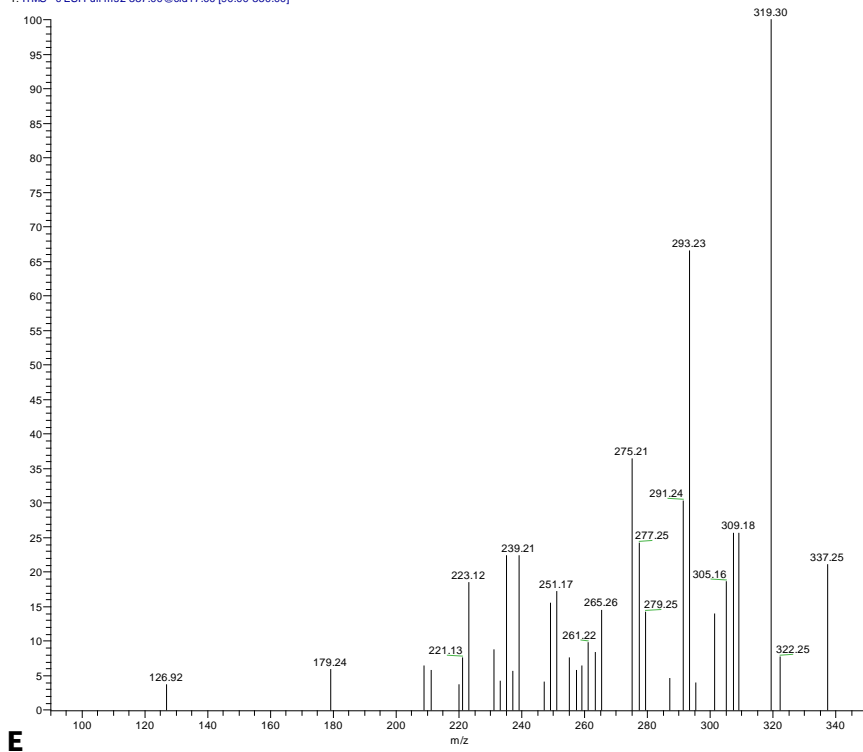
PITCHBRASILFILT neg 141\_220509103218 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.62E2  
T: ITMS - c ESI Full ms2 141.00@cid16.00 [50.00-150.00]



D

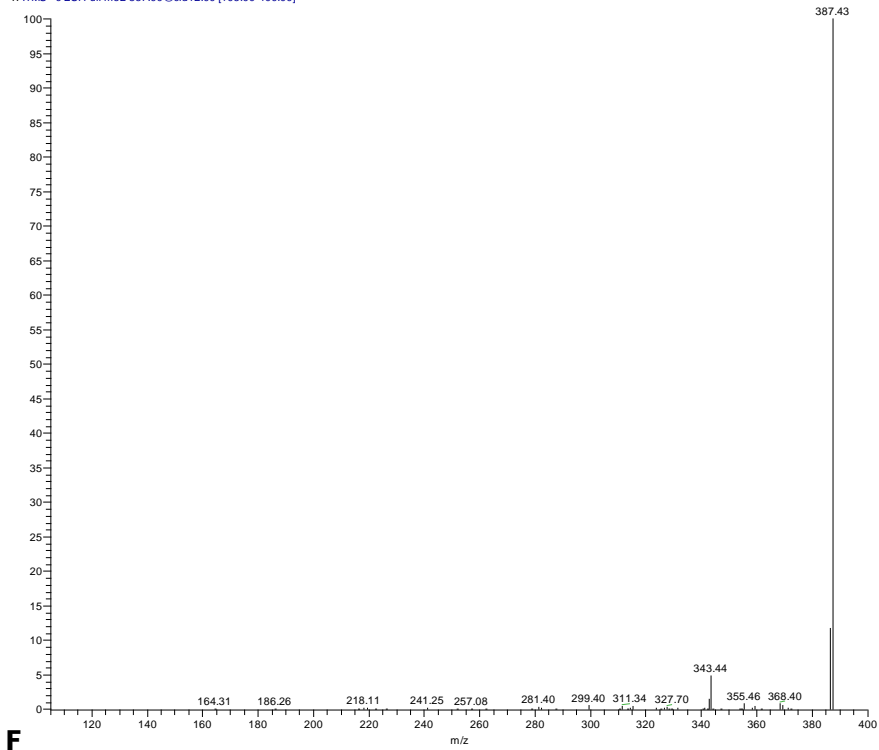


PITCHBRASFILT neg 337\_220509103218 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.74E1  
T: ITMS - c ESI Full ms2 337.00@cld17.00 [90.00-350.00]

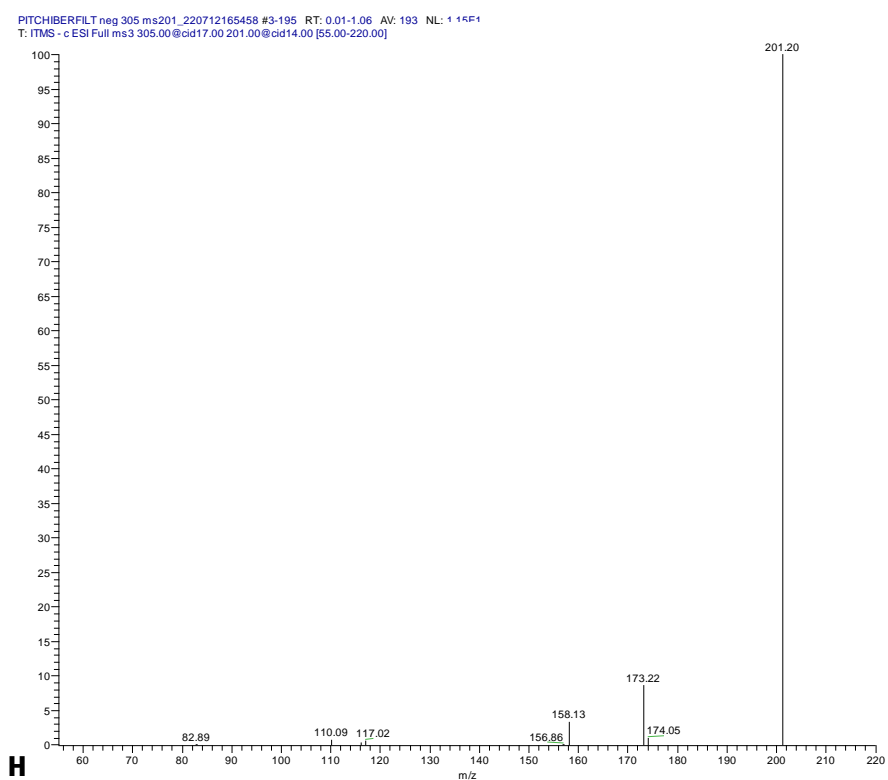
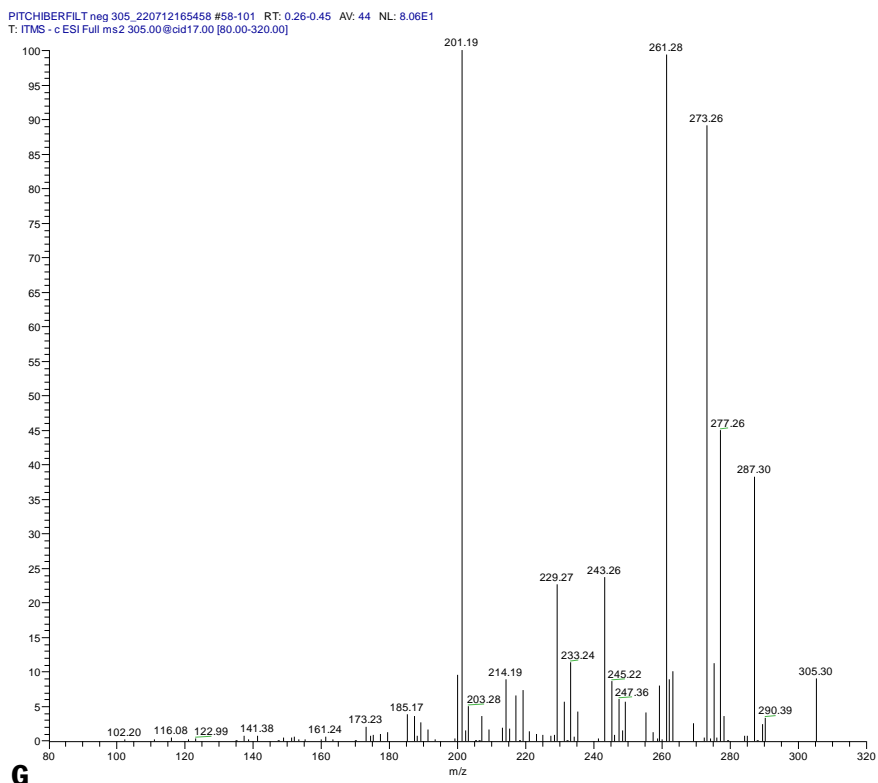


**E**

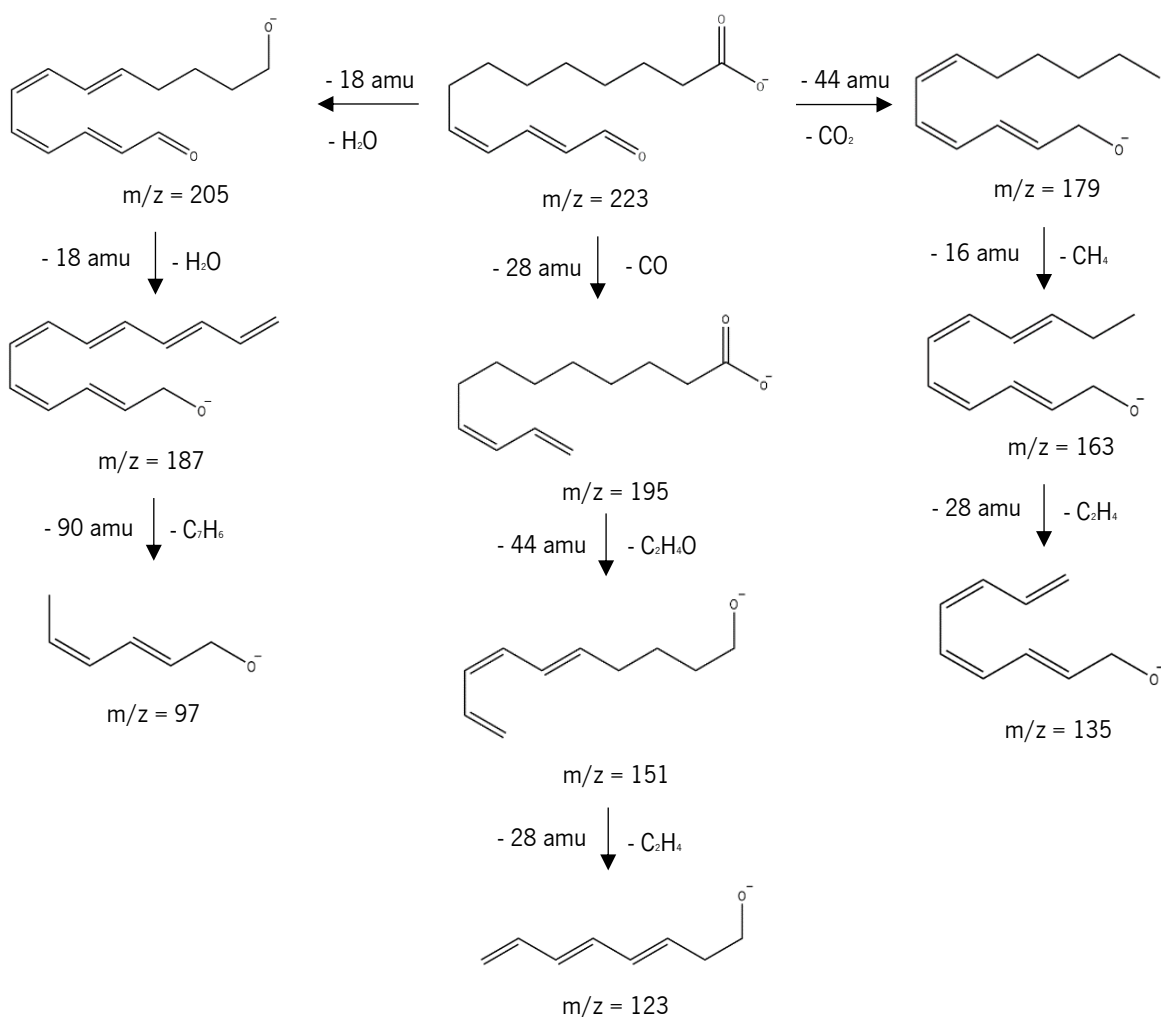
PITCHIBERFILT neg 387\_220712165458 #4-224 RT: 0.01-1.01 AV: 221 NL: 2.06E1  
T: ITMS - c ESI Full ms2 387.00@cld12.00 [105.00-400.00]



**F**

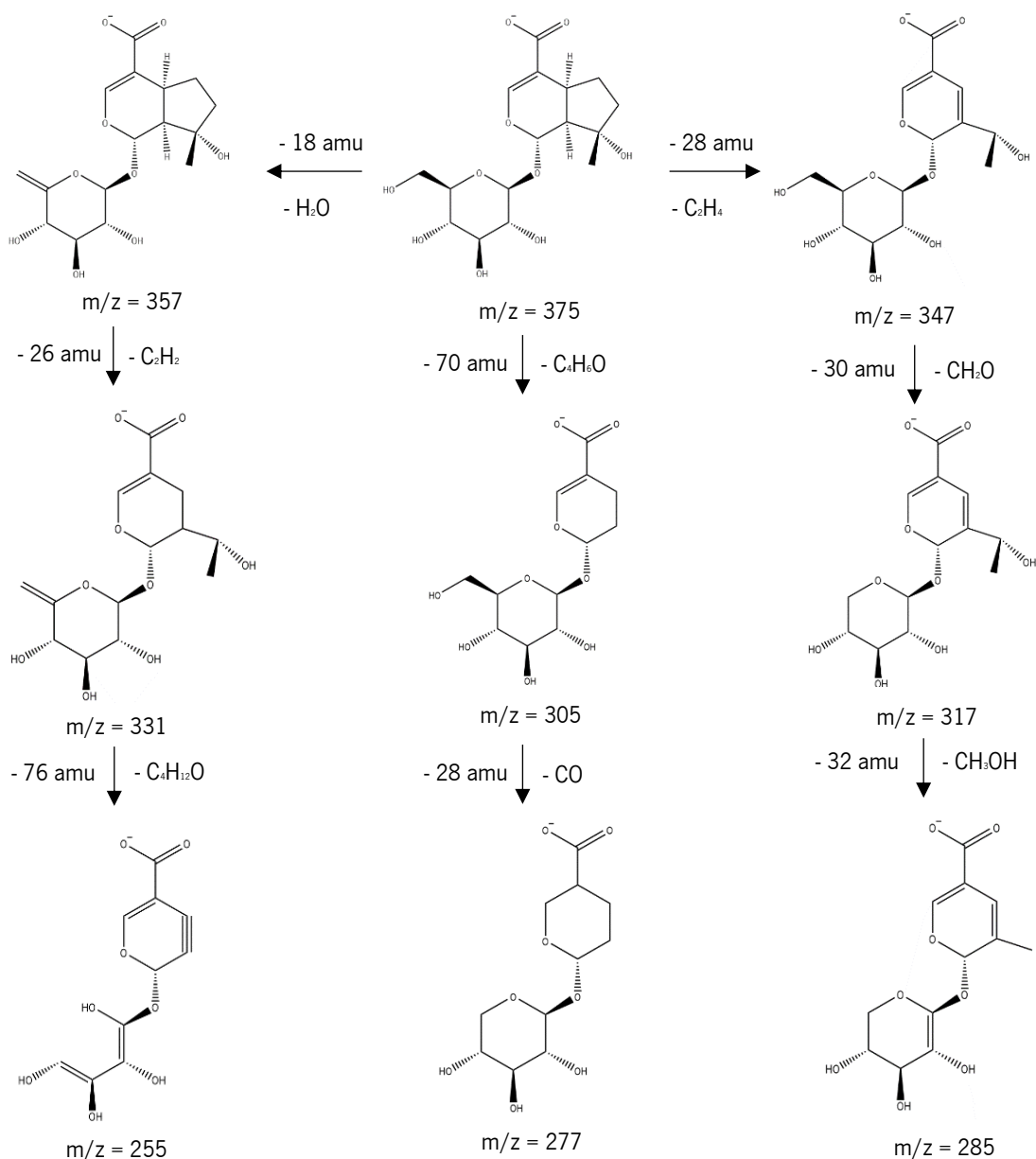


**Figura 70:** Espectros de massa no modo negativo do A) ião 223, do seu B) ião “filho” 179, C) ião 375, D) ião 141 e E) ião 337 da solução filtrada de amostra brasileira e do F) ião 387, G) ião 305 e do seu H) ião “filho” 201 da solução filtrada de amostra ibérica.



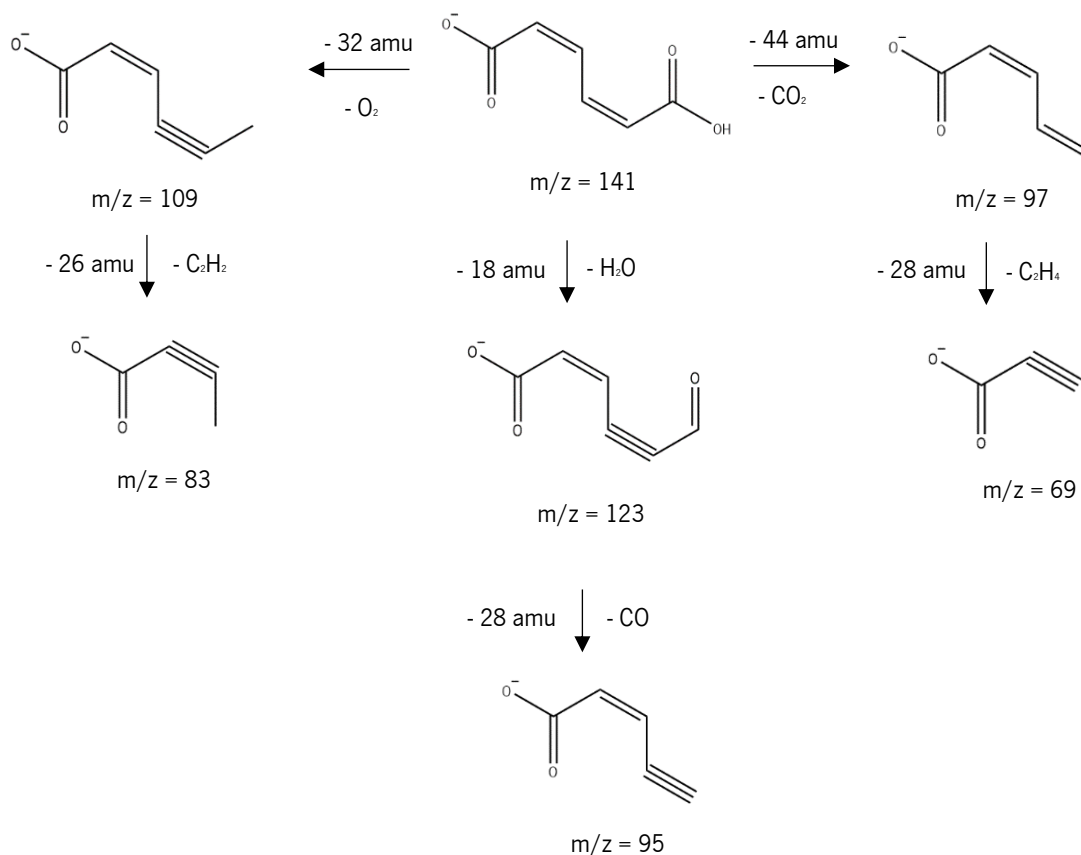
**Figura 71:** Esquema da proposta de fragmentação do ácido 13-oxo-9,11-tridecadienóico.

Pensa-se que o composto que dá o espectro de massa do ião 141 seja o ácido *cis,cis*-mucónico devido à probabilidade deste composto ter dado origem ao espectro do ião 141 ser de 93%. Muitos dos iões existentes no espectro da **Figura 70.D** podem dever-se a fragmentos da estrutura deste composto que estão representados na **Figura 73**. O ácido *cis,cis*-mucónico, é um metabolito de bactérias e a sua presença na *pitch* pode dever-se à goma proveniente dos pinheiros ser produzida como um mecanismo de defesa contra patógenos e ter ocorrido contaminação da mesma por bactérias.



**Figura 72:** Esquema da proposta de fragmentação do ácido muscaenônico.

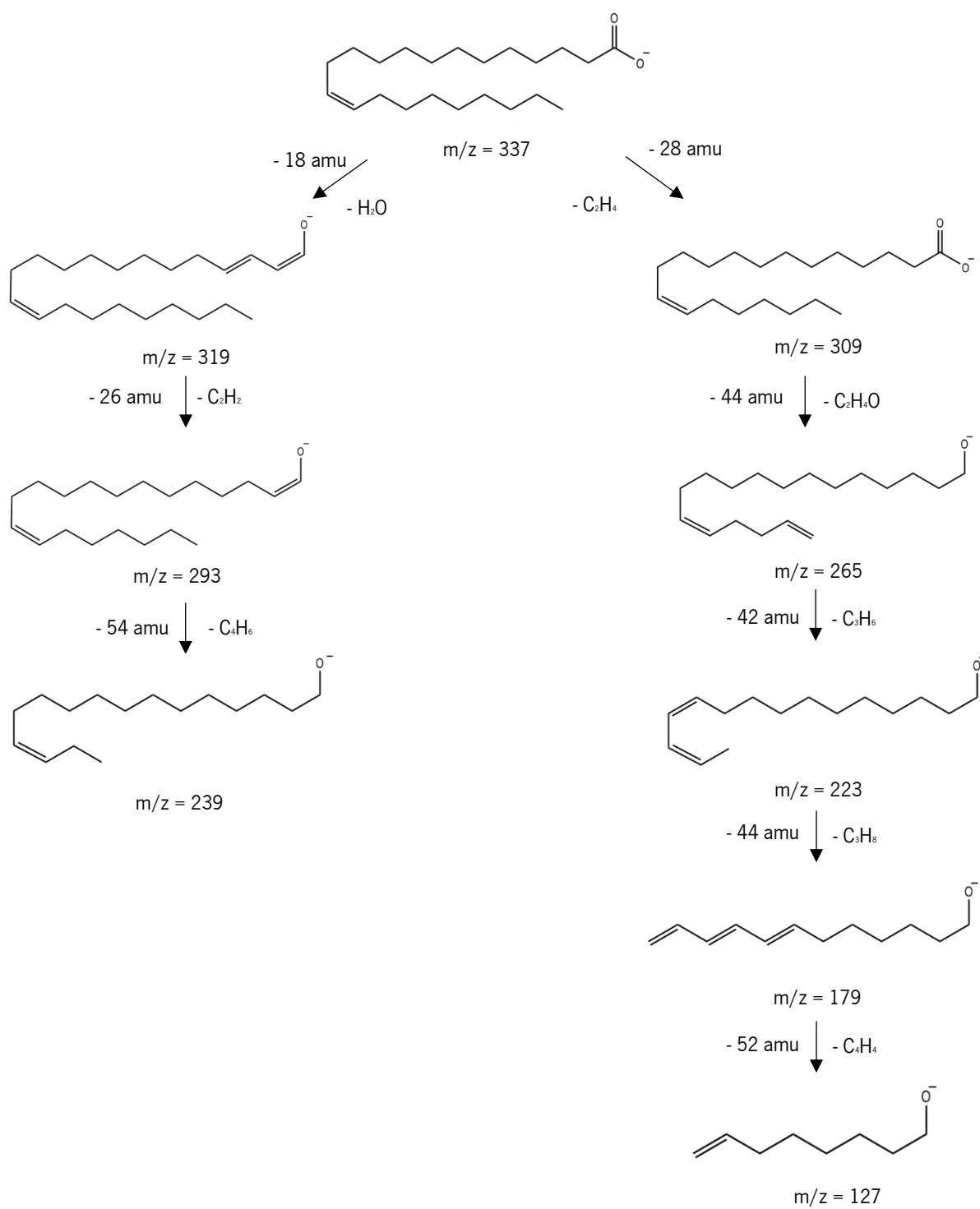
Ácido erúico pode originar espectro de massa da **Figura 70.E**. Este composto é um ácido gordo ómega-9 que pode ser encontrado em plantas e cuja proposta de fragmentação está esquematizada na **Figura 74**. Através da comparação dos padrões de fragmentação do íon 387 com os compostos das bibliotecas pensa-se que o composto que dá este espectro de massa seja o ácido isocalongólico. Este ácido é um composto natural encontrado em plantas e vários fragmentos da sua estrutura podem dar origem aos íões existentes nos espectros da **Figura 70.F**. A proposta de fragmentação deste componente está esquematizada na **Figura 75**.



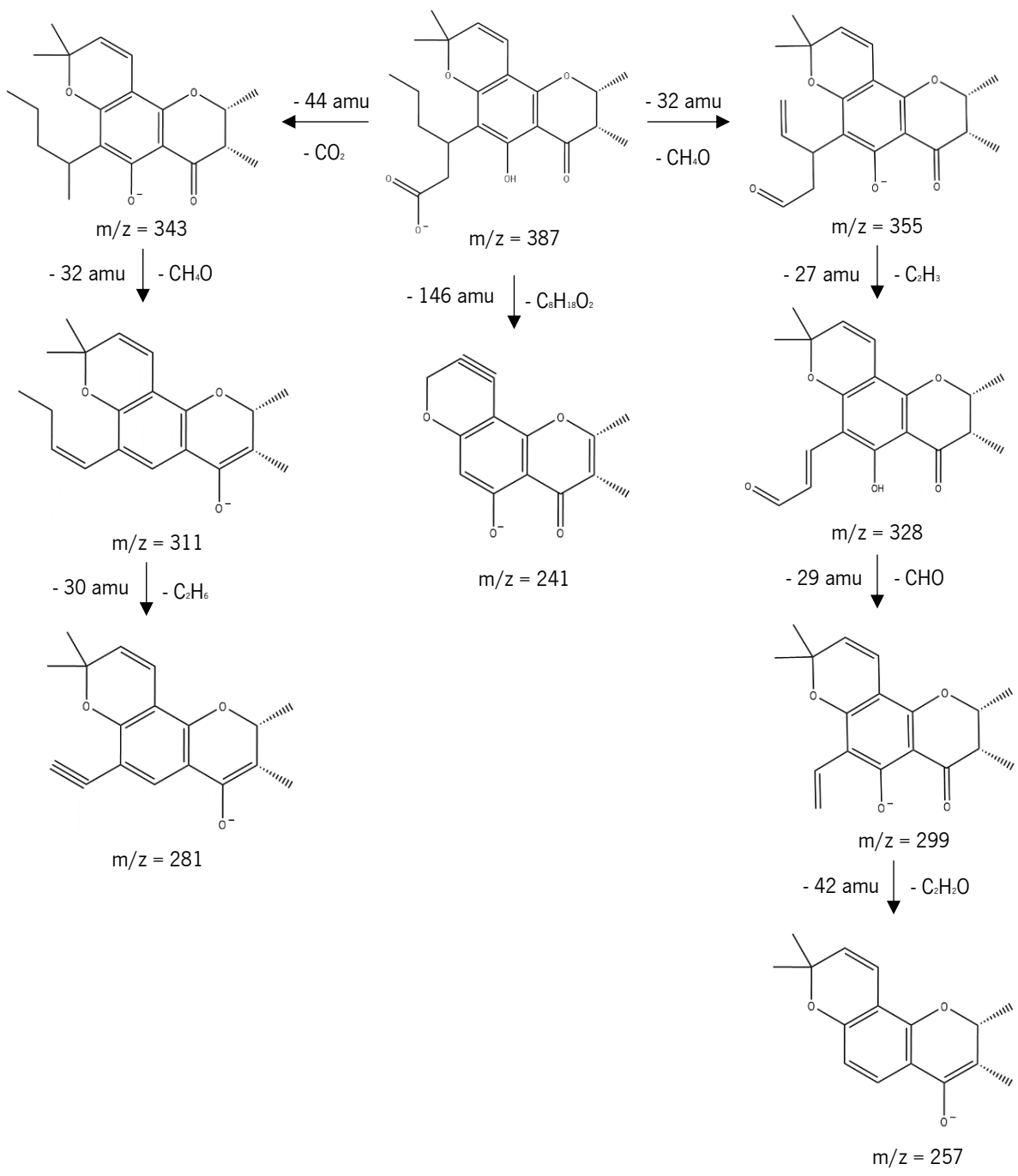
**Figura 73:** Esquema da proposta de fragmentação do ácido *cis,cis*-mucônico.

Pensa-se que o composto que dá o espectro de massa do íon 305 seja a (+)-gallo catequina. Alguns íons existentes nos espectros das **Figuras 70.G** e **70.H** podem dever-se a fragmentos da estrutura deste composto que estão representados na **Figura 76**. (+)-Galocatequina é um metabolito de plantas e a sua presença foi previamente relatada na madeira de *Pinus pinaster*.<sup>109</sup>

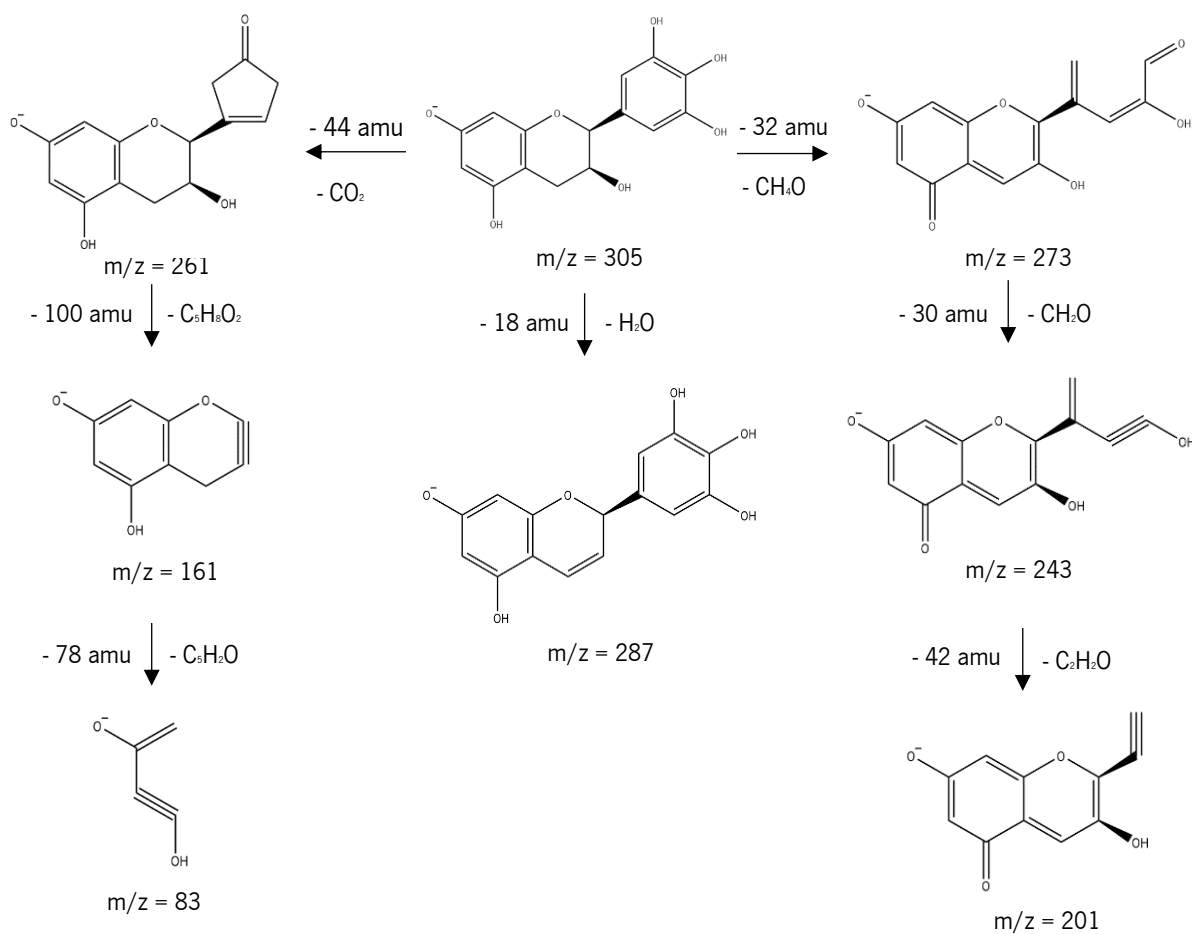
Todos os seis compostos abordados anteriormente aparentam estar presentes em ambas as amostras de *pitch*. Além de se ter obtido os cromatogramas de HPLC-MS das soluções filtradas e os espectros de massa de alguns íons específicos observados nos picos dos cromatogramas também se obteve espectros de massa “completos” nos modos de ionização positivo e negativo das duas soluções filtradas que estão apresentados nas **Figuras 110** e **111**, respetivamente. Alguns dos íons de maior intensidade observados nesses espectros foram analisados por ESI-MS/MS, nomeadamente, o íon 529 no modo positivo (**Figura 77**) e os íons 349 e 333 no modo negativo (**Figura 79**).



**Figura 74:** Esquema da proposta de fragmentação do ácido erúxico.



**Figura 75:** Esquema da proposta de fragmentação do ácido isocalolongico.

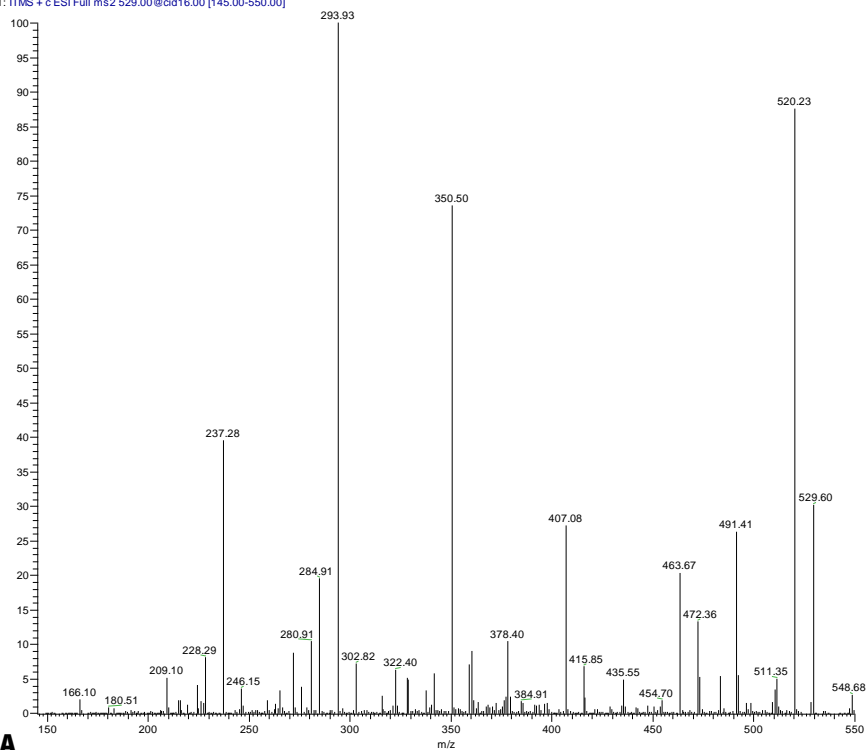


**Figura 76:** Esquema da proposta de fragmentação da (+)-gallocatequina.

Através da observação dos espectros de massa no modo de ionização positivo verifica-se a presença de alguns iões que não pertencem à *pitch*, nomeadamente, os iões 1041, 928, 815 e 702. Estes iões devem-se à existência de impurezas nas amostras, que resultaram dos filtros de membrana de nylon usados durante o processo de filtração à vácuo. Inclusive, alguns dos picos observados nos cromatogramas das **Figuras 104 e 105** devem-se à presença destas impurezas nas soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira.

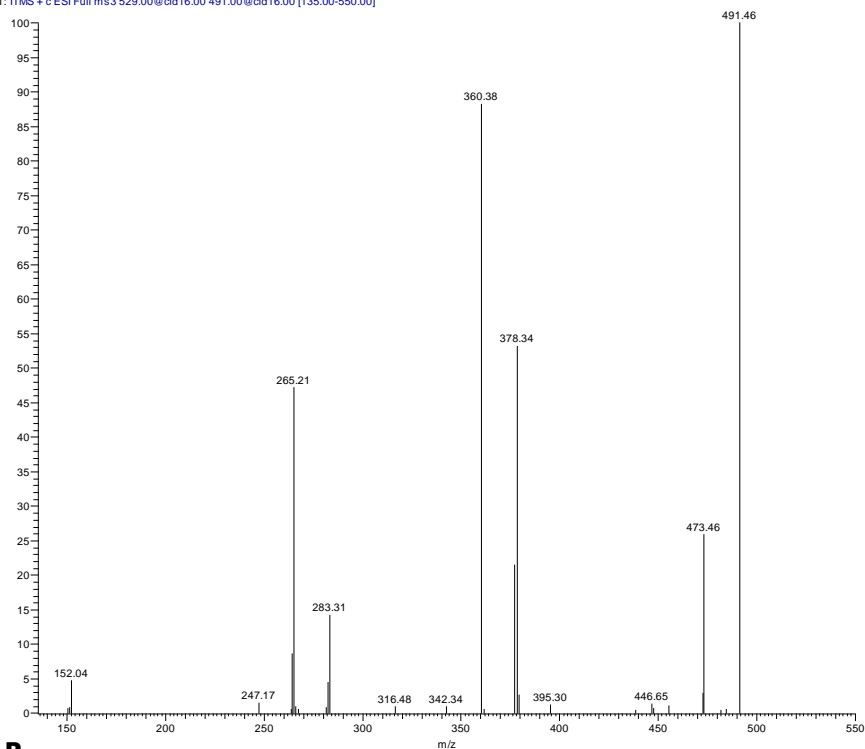


PITCHBRASFILT pos 529\_220503155638 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 7.71E3  
T: ITMS + c ESI Full ms2 529.00@cid16.00 [145.00-550.00]



A

PITCHBRASFILT pos 529 ms491\_220503162017 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.17E2  
T: ITMS + c ESI Full ms3 529.00@cid16.00 491.00@cid16.00 [135.00-550.00]



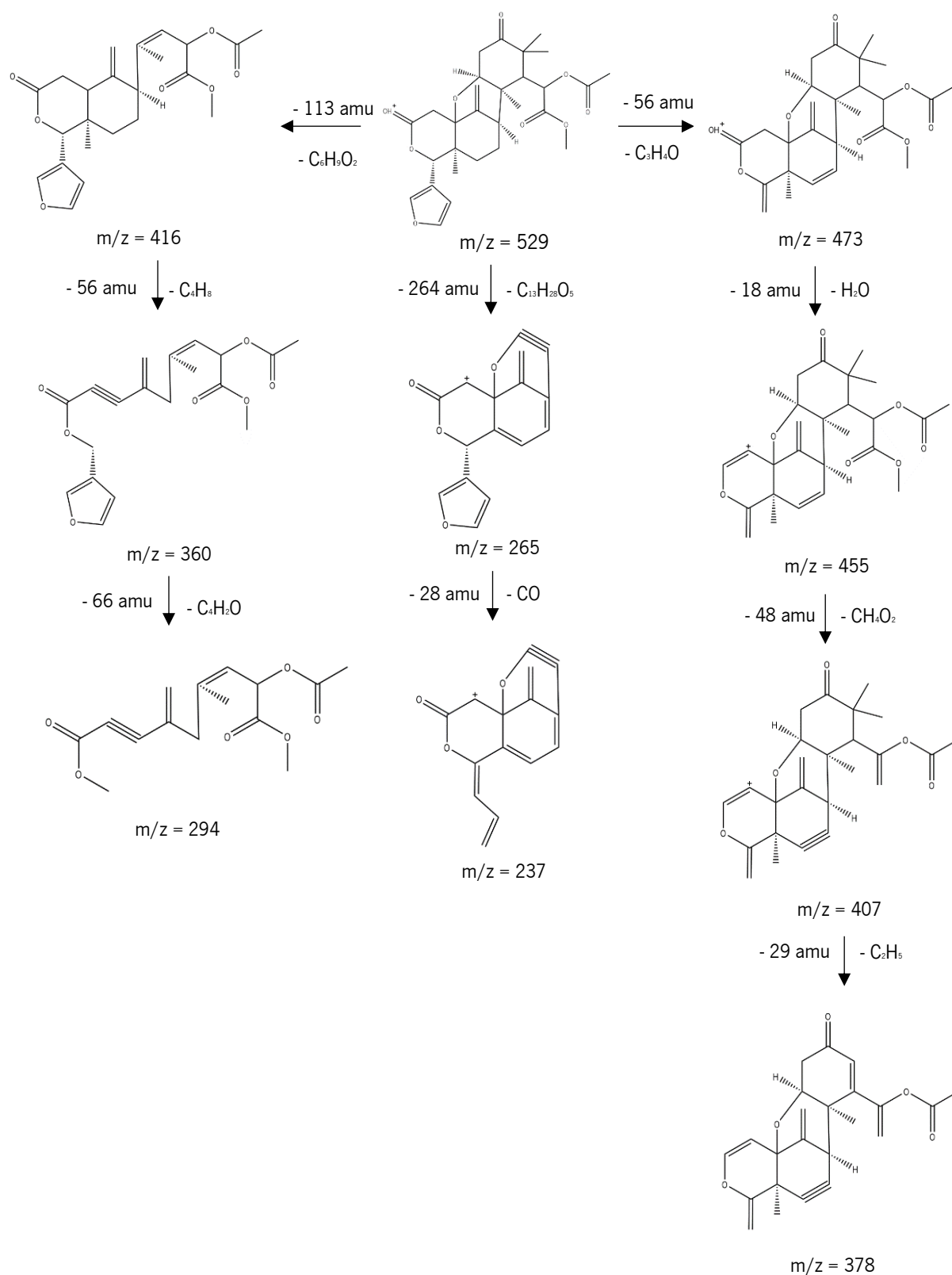
B

**Figura 77:** Espetros de massa no modo positivo do A) ião 529 e do seu B) ião “filho” 491 da solução filtrada de amostra brasileira.

Através da comparação dos padrões de fragmentação do íon 529 com os de compostos das bibliotecas pensa-se que o composto que dá este espetro de massa seja o metil (2*R*)-2-(acetiloxi)-2-[(1*S*,3*S*,7*R*,8*R*,9*R*,12*S*,13*R*)-13-(furan-3-il)-6,6,8,12-tetrametil-17-metilideno-5,15-dioxo-2,14-dioxatetraciclo[7.7.1.0<sup>1,12</sup>.0<sup>3,8</sup>]heptadecan-7-il]acetato, um composto natural encontrado em plantas. Vários dos íões existentes na **Figura 77** podem ser explicados por fragmentações deste composto (**Figura 78**).

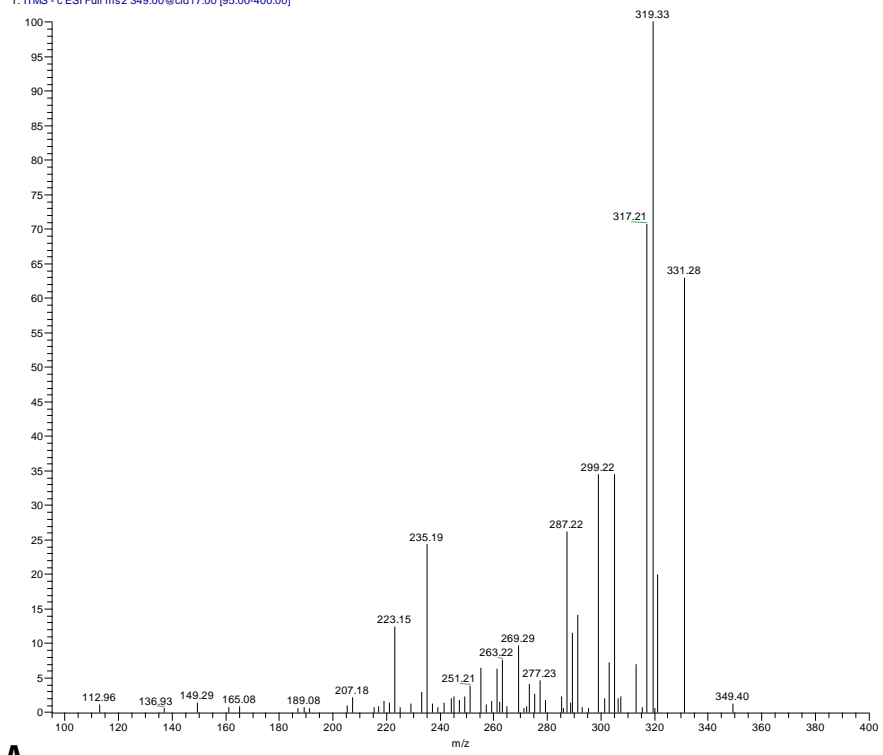
Nos espetros da **Figura 111** vê-se com elevada intensidade o íon 301, que se deve à presença do ácido abiético. Os padrões de fragmentação dos íões 349 e 333 podem ser explicados pela fragmentação de andrografolida e (2*S*,3*S*)-3,5,7-trihidroxi-6-metil-2-(3,4,5-trihidroxifenil)croman-4-ona, respetivamente (**Figura 80** e **Figura 81**). Andrografolida é um metabolito de plantas com atividade anti-inflamatória e (2*S*,3*S*)-3,5,7-trihidroxi-6-metil-2-(3,4,5-trihidroxifenil)croman-4-ona é um composto pertencente ao grupo das catequinas, que são conhecidos por terem atividade antioxidante.

As análises de HPLC-MS e ESI-MS/MS das soluções 80:20 de metanol e éter etílico e soluções filtradas de amostra ibérica e amostra brasileira permitiram a confirmação da presença de ácido abiético, 2-amino-1,3,4-octadecanotriol, ácido oleico e acetato de linalilo na *pitch* e a provável identificação de outros 15 compostos. No total identificou-se 8 ácidos diferentes na composição da *pitch*, isto indica que o procedimento experimental utilizado para obter frações insaponificáveis da *pitch* não é completamente eficaz. Todos os compostos discutidos nesta secção estão representados na **Tabela 19**, onde é possível observar as suas massas molares e estruturas química.



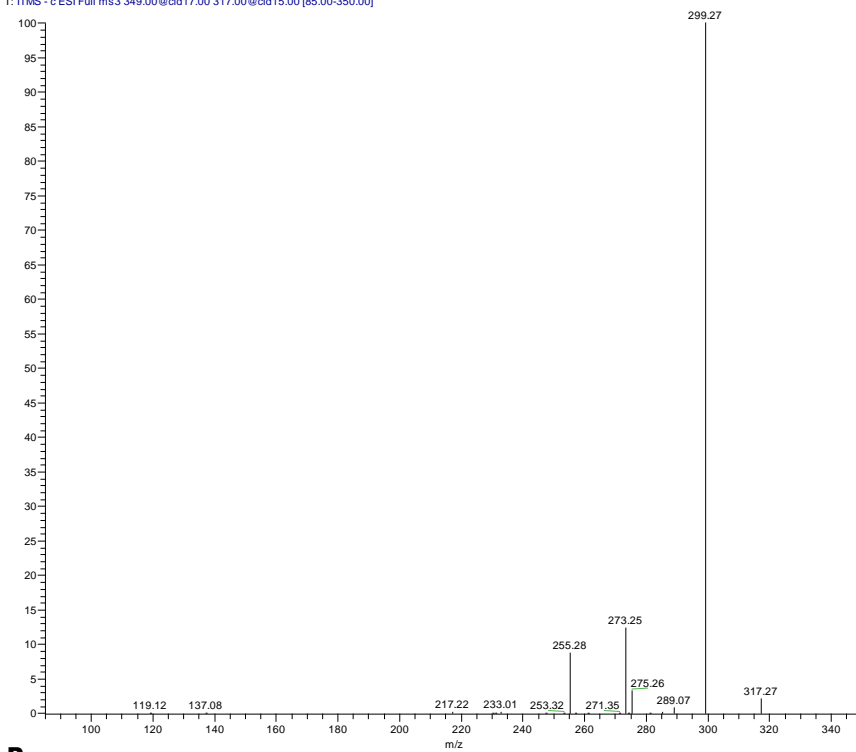
**Figura 78:** Esquema da proposta de fragmentação do metil (2*R*)-2-(acetiloxi)-2-[(1*S*,3*S*,7*R*,8*R*,9*R*,12*S*,13*R*)-13-(furan-3-il)-6,6,8,12-tetrametil-17-metilideno-5,15-dioxo-2,14-dioxatetracilo[7.7.1.0<sup>1,12</sup>.0<sup>3,8</sup>]heptadecan-7-il]acetato.

PITCHBRASFILT neg 349\_220503114104 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.78E2  
T: ITMS - c ESI Full ms2 349.00@cid17.00 [95.00-400.00]



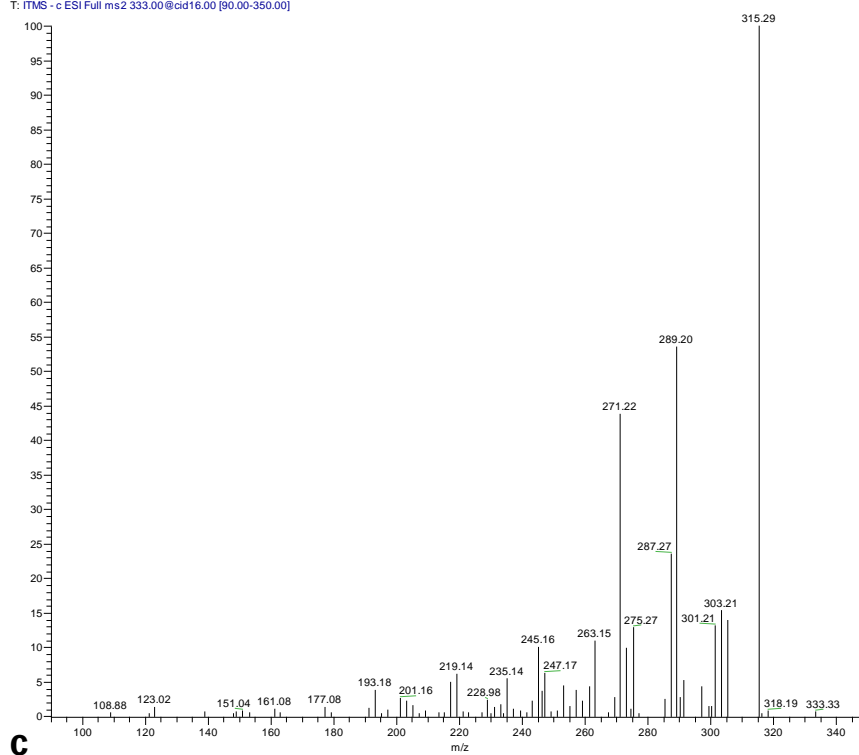
**A**

PITCHBRASFILT neg 349 ms317\_220503114104 #6-183 RT: 0.03-1.01 AV: 178 NL: 2 19F1  
T: ITMS - c ESI Full ms3 349.00@cid17.00 317.00@cid15.00 [85.00-350.00]



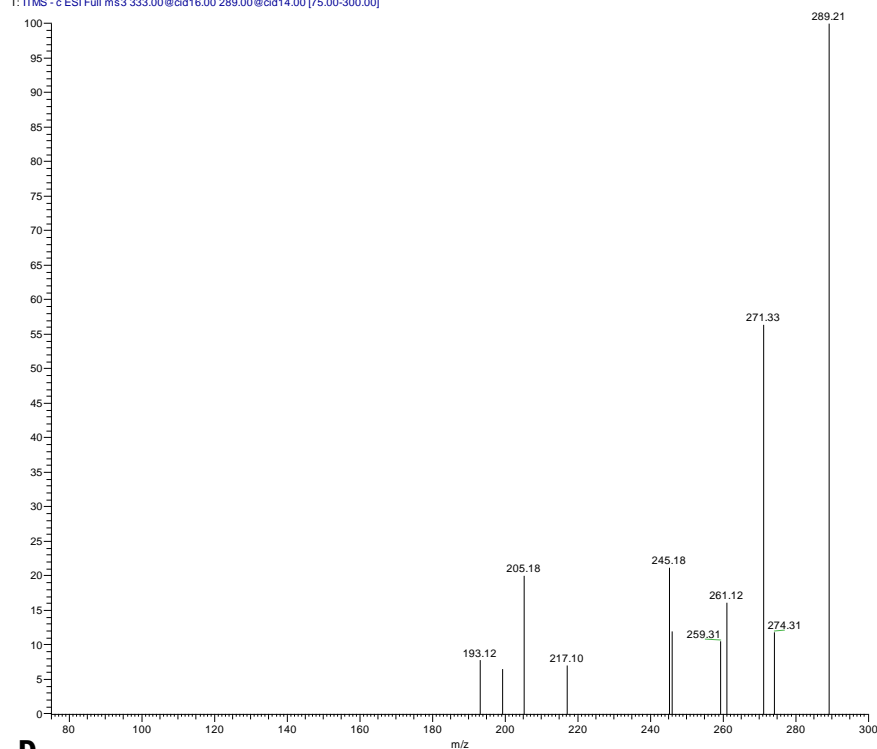
**B**

PITCHBRASFILT neg 333\_220503114104 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.47E2  
T: ITMS - c ESI Full ms2 333.00@cid16.00 [90.00-350.00]



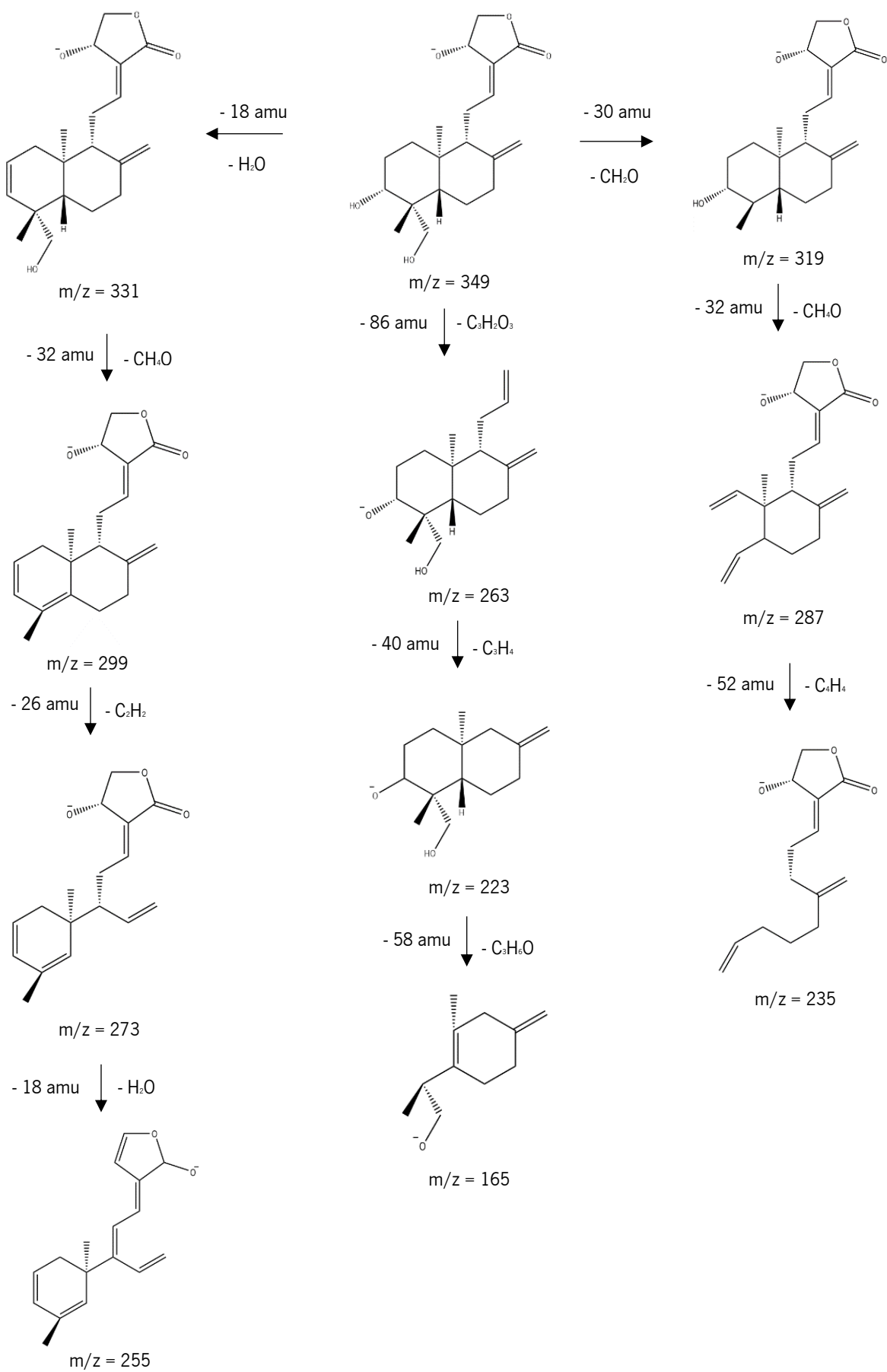
C

PITCHBRASFILT neg 333.ms289\_220503114104 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.59E1  
T: ITMS - c ESI Full ms3 333.00@cid16.00 289.00@cid14.00 [75.00-300.00]

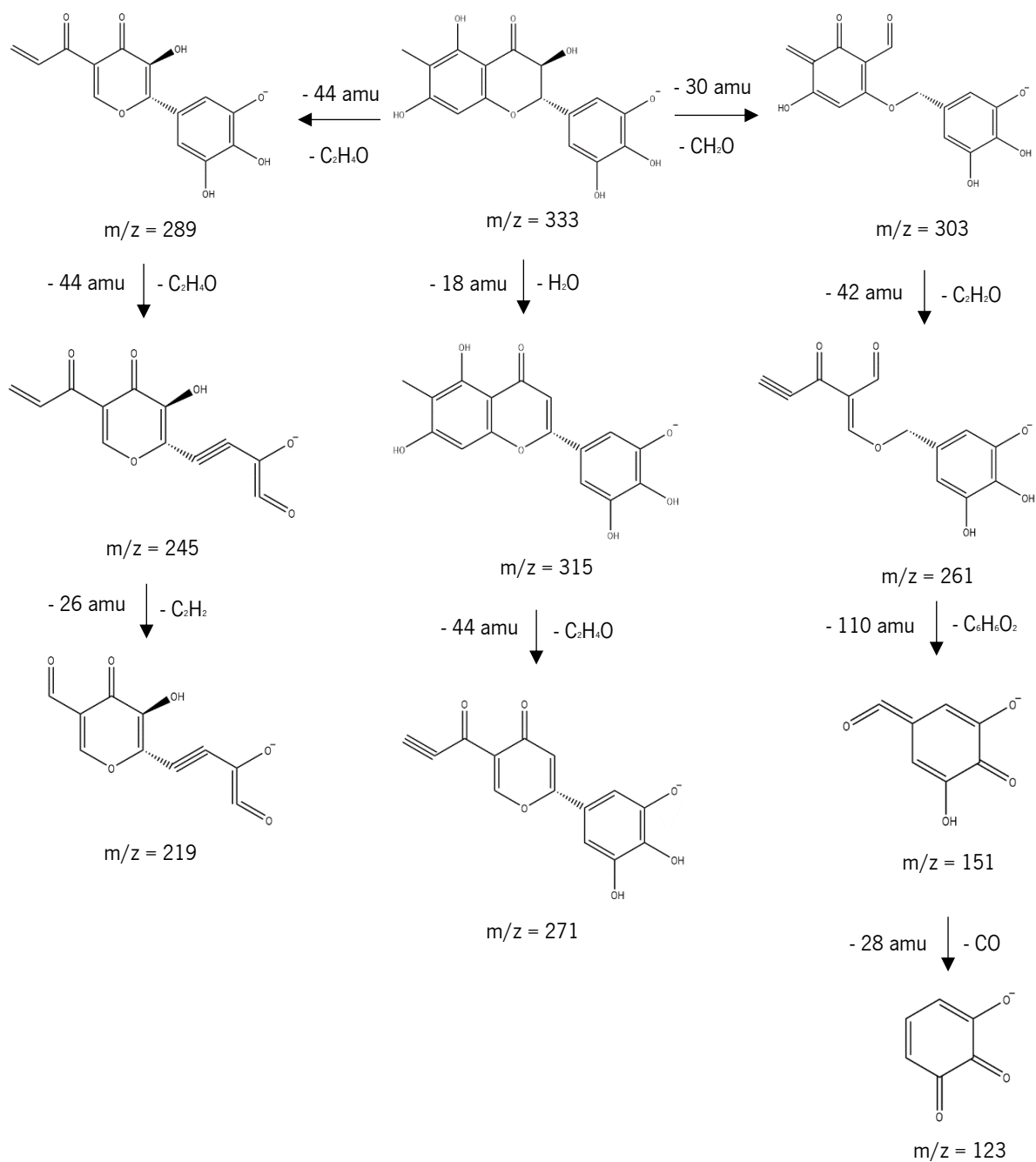


D

**Figura 79:** Espectros de massa no modo negativo do A) ão 349, do seu B) ão “filho” 317, C) ão 333 e do seu D) ão “filho” 289 da soluçõo filtrada de amostra brasileira.

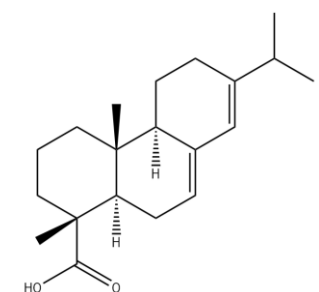
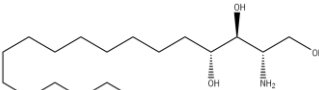
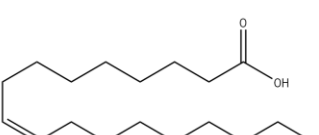
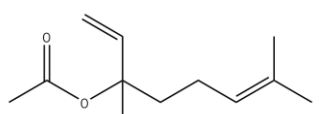
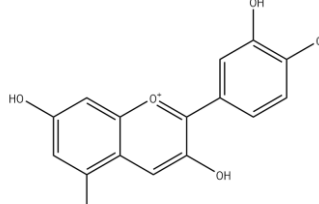
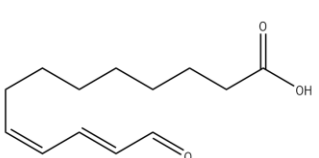
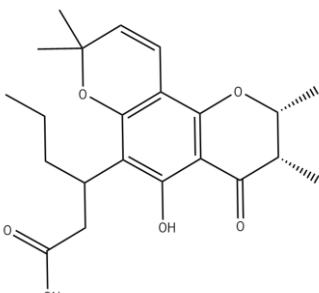


**Figura 80:** Esquema da proposta de fragmentação da andrografolida.

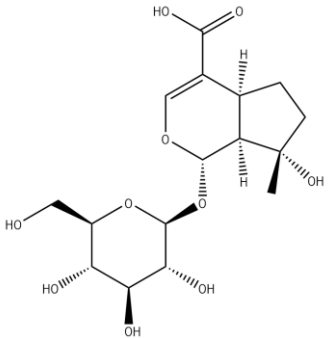
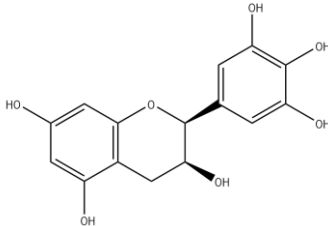
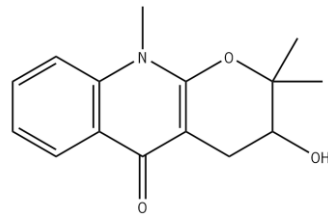
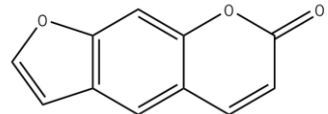
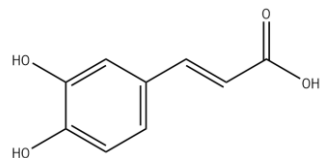
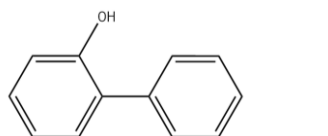
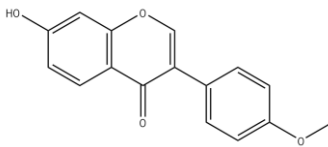
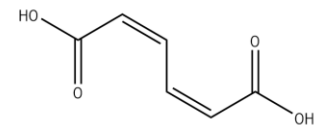


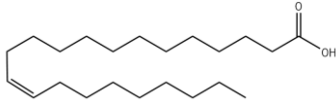
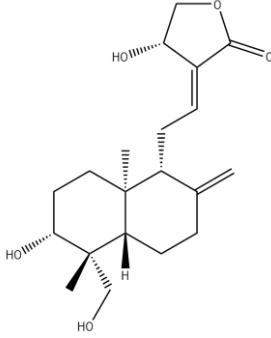
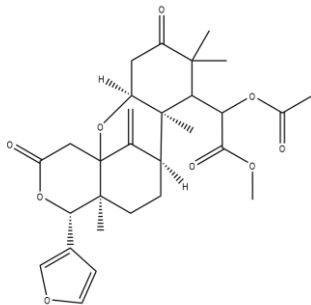
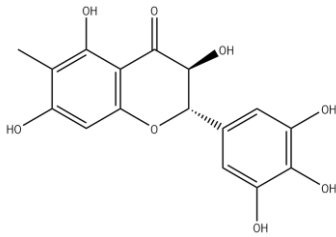
**Figura 81:** Esquema da proposta de fragmentação do (2S,3S)-3,5,7-trihidroxi-6-metil-2-(3,4,5-trihidroxifenil)croman-4-ona.

**Tabela 19:** Compostos identificados nas análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS.

Nome do composto	Massa molar (g/mol)	Estrutura química
Ácido abiético	302,50	
2-amino-1,3,4-octadecanotriol	317,50	
Ácido oleico	282,50	
Acetato de linalilo	196,29	
Cianidina	287,24	
Ácido 13-oxo-9,11-tridecadienóico	224,30	
Ácido isocalolongico	388,50	



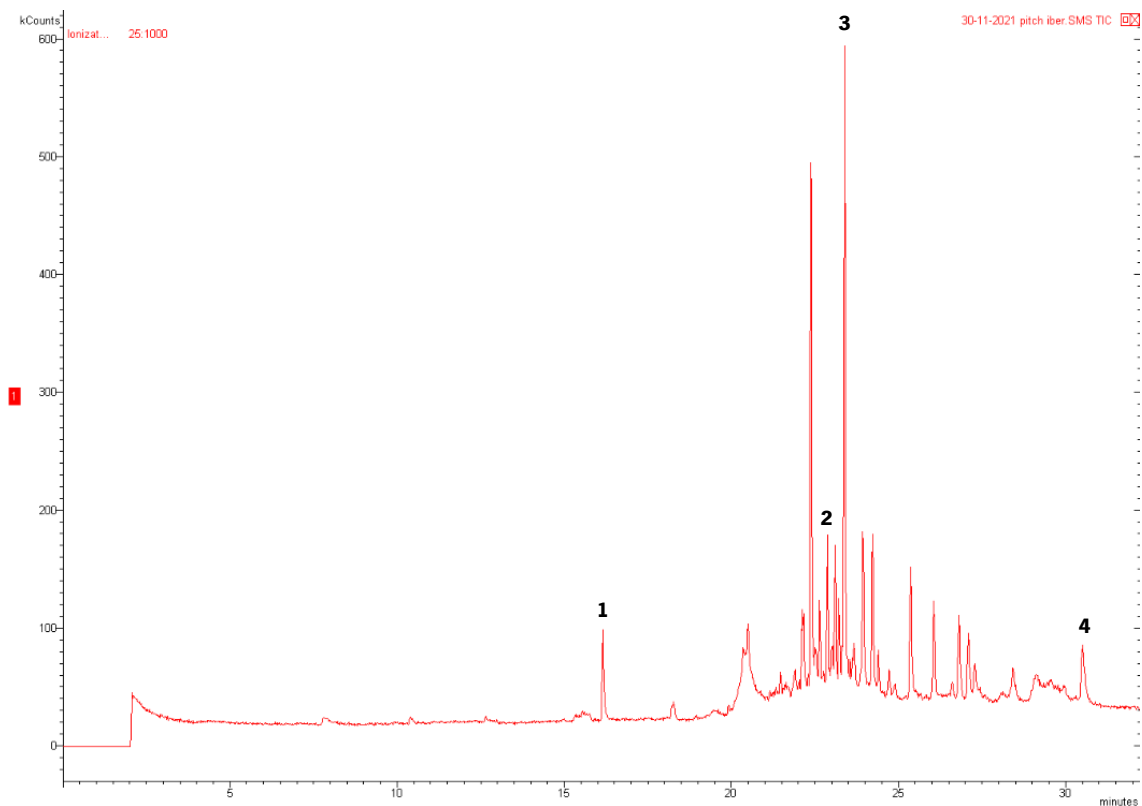
Ácido mussaenosídico	376,36	
(+)-Galocatequina	306,27	
Ribalinina	259,30	
Ficusina	186,16	
Ácido cafeico	180,16	
2-fenilfenol	170,21	
Formononetina	268,26	
Ácido <i>cis,cis</i> -mucónico	142,11	

Ácido erúxico	338,60	
Andrografolida	350,40	
metil (2 <i>R</i> )-2-(acetiloxi)-2- [(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>R</i> )-13-(furan-3- il)-6,6,8,12-tetrametil-17-metilideno-5,15- dioxo-2,14- dioxatetraciclo[7.7.1.0 <sup>1,12</sup> .0 <sup>3,8</sup> ]-heptadecan- -7-il]acetato	528,60	
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3,5,7-trihidroxi-6-metil-2-(3,4,5- trihidroxifenil)croman-4-ona	334,28	

### 5.2.2) GC-MS

Nas **Figuras 82 e 83.A** apresentam-se os cromatogramas de HS-SPME/GC-MS obtidos para a amostra ibérica. O cromatograma resultante da análise da amostra brasileira está apresentado na **Figura 83.B**.

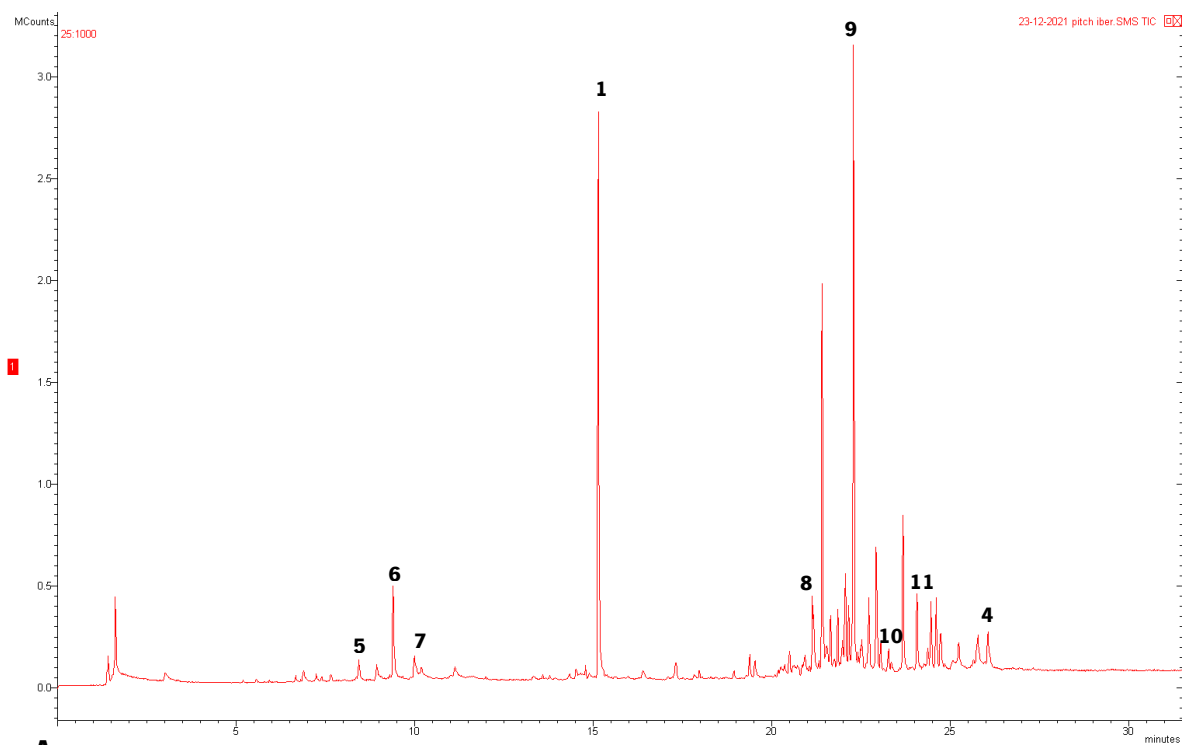
A análise de HS-SPME/GC-MS utilizando a fibra de PDMS de 7 µm permitiu uma separação eficiente e identificação de compostos na amostra ibérica, mas não ocorreu a separação de compostos na amostra brasileira. Através da consulta das bibliotecas espectrais de massa foi possível a identificação de quatro compostos: hidroxitolueno butilado (pico 1), éster di(3-metilfenil), ácido ftálico (pico 2), abietato de metilo (pico 3) e dehidroabietato de metilo (pico 4).



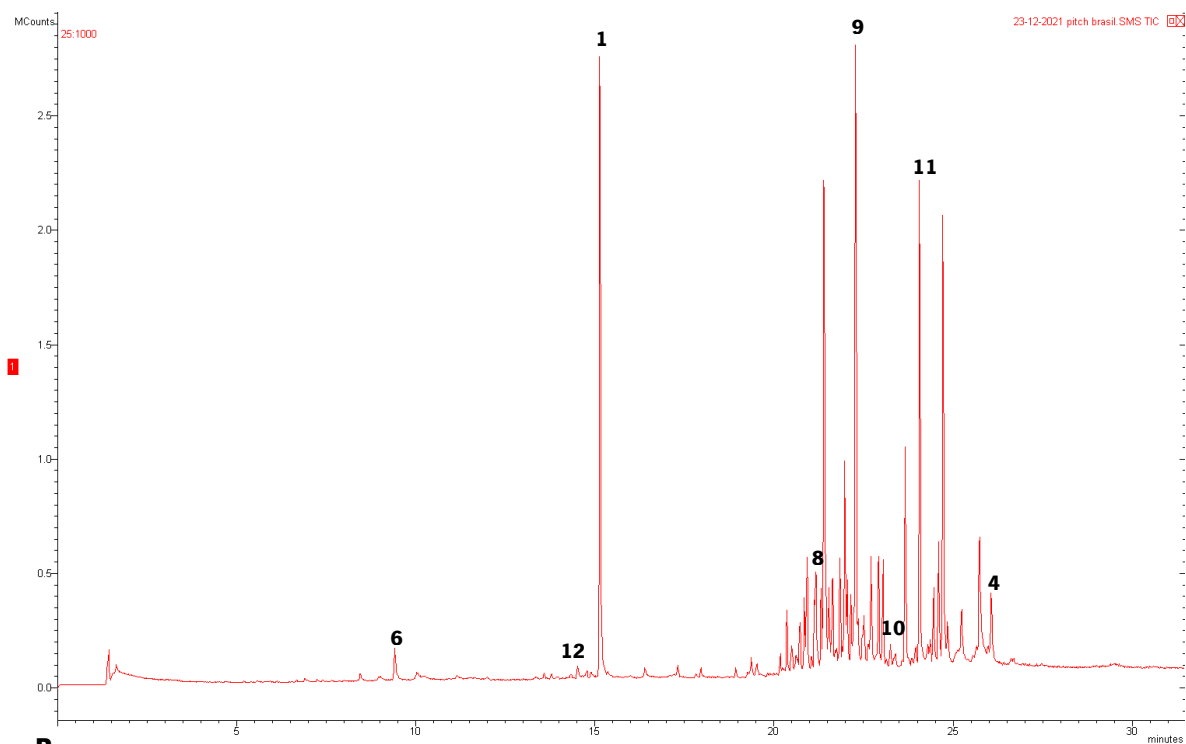
**Figura 82:** Cromatograma obtido da análise de HS-SPME/GC-MS recorrendo à fibra de PDMS de 7  $\mu$ m da amostra ibérica.

Hidroxitolueno butilado é um composto natural com atividade antioxidante que pode ser encontrado em plantas. A presença deste composto não foi previamente relatada na colofónia. Abietato de metilo e dehidroabietato de metilo são derivados dos ácidos resínicos abiético e dehidroabiético, respetivamente, que são ácidos habitualmente encontrados na colofónia de pinheiros. O éster di(3-metilfenil), ácido ftálico é um derivado do ácido ftálico, sendo este um ácido benzenodicarboxílico. Destes três ésteres apenas a presença de dehidroabietato de metilo foi previamente reportada na colofónia.<sup>27</sup>

Recorrendo à fibra de PDMS de 100  $\mu$ m identificou-se uma maior quantidade de compostos na amostra ibérica e foi possível a separação e identificação de compostos presentes na amostra brasileira. A obtenção de melhores resultados com a fibra de 100  $\mu$ m pode dever-se ao facto desta fibra ter poros de maior dimensão, o que permite a adsorção de compostos voláteis de maior peso molecular.



**A**



**B**

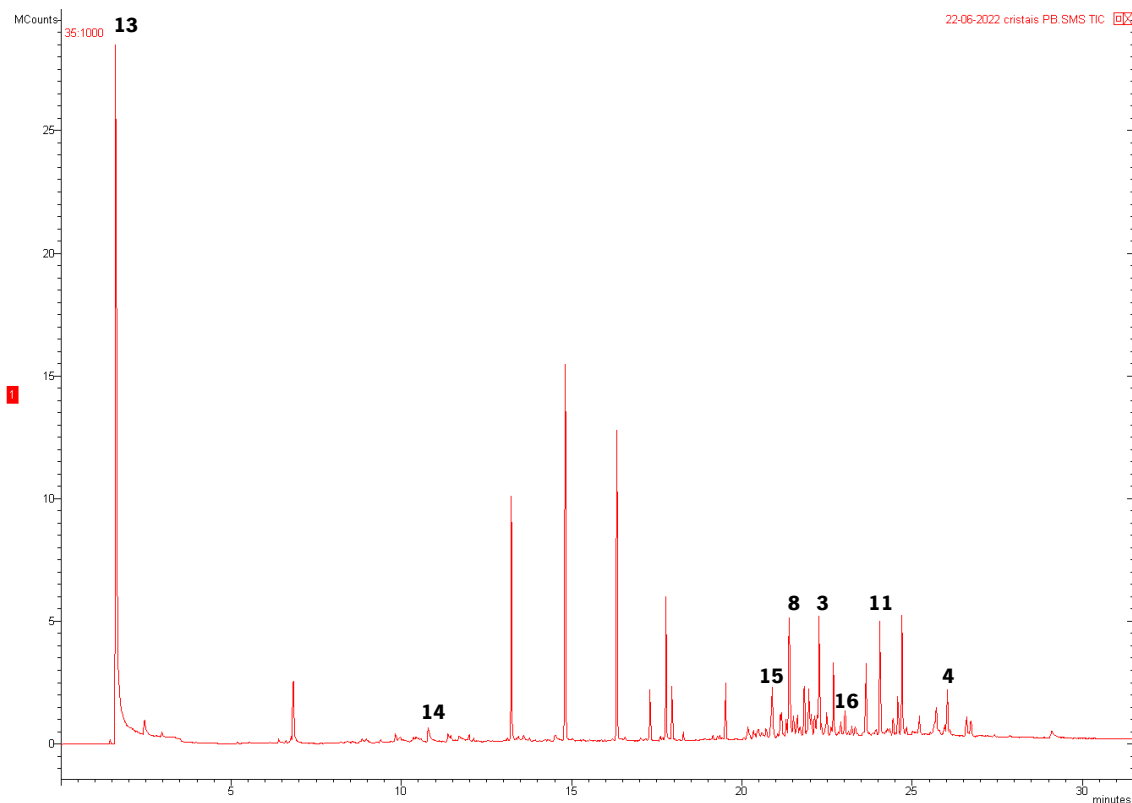
**Figura 83:** Cromatogramas obtidos das análises de HS-SPME/GC-MS recorrendo à fibra de PDMS de 100 µm da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira.

Como podemos ver na **Figura 83.B** a amostra brasileira contém dois dos quatro compostos referidos previamente e contém também borneol, 2,4b-dimetil-8-metileno-2-vinil-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9-dodecahidrofenantreno, dehidroabietina, podocarpa-8,11,13-trieno-15-oato de metilo, sandaracopimarinal e 9-desoxo-9-x-acetoxi-3,8,12-tri-O-acetilingol (picos 6, 8, 9, 10, 11 e 12 respectivamente). A presença dos compostos borneol, 2,4b-dimetil-8-metileno-2-vinil-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9-dodecahidrofenantreno e sandaracopimarinal foram previamente reportados na colofónia.<sup>21,23,27,28</sup> Dehidroabietina e podocarpa-8,11,13-trieno-15-oato de metilo são ambos derivados do ácido dehidroabiético. 9-desoxo-9-x-acetoxi-3,8,12-tri-O-acetilingol é um composto com atividade anti-inflamatória que já foi encontrado nas plantas *Artemisia annua*, *Cassia angustifolia* e *Zingiber officinale*.<sup>115,116,117</sup>

Por sua vez, a análise de GC-MS com a fibra PDMS de 100 µm da amostra ibérica revelou a presença de hidroxitolueno butilado, dehidroabietato de metilo, borneol, 2,4b-dimetil-8-metileno-2-vinil-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9-dodecahidrofenantreno, dehidroabietina, podocarpa-8,11,13-trieno-15-oato de metilo e sandaracopimarinal. Também revelou a presença adicional de dois álcoois cuja presença não foi encontrada na brasileira: fenchol e mirtenol (picos 5 e 7, respectivamente). Fenchol foi previamente detetado na colofónia<sup>22,23</sup>, em contraste com o composto mirtenol. O fenchol, borneol e mirtenol são compostos habitualmente encontrados na terebentina, durante o processo de destilação da goma estes podem ter constituído a composição da colofónia, o que explica a sua existência na *pitch*.

As diferenças observadas da presença de determinados compostos nas duas variedades da *pitch* podem ser justificadas pelas diferentes condições ambientais em que os pinheiros se desenvolvem.

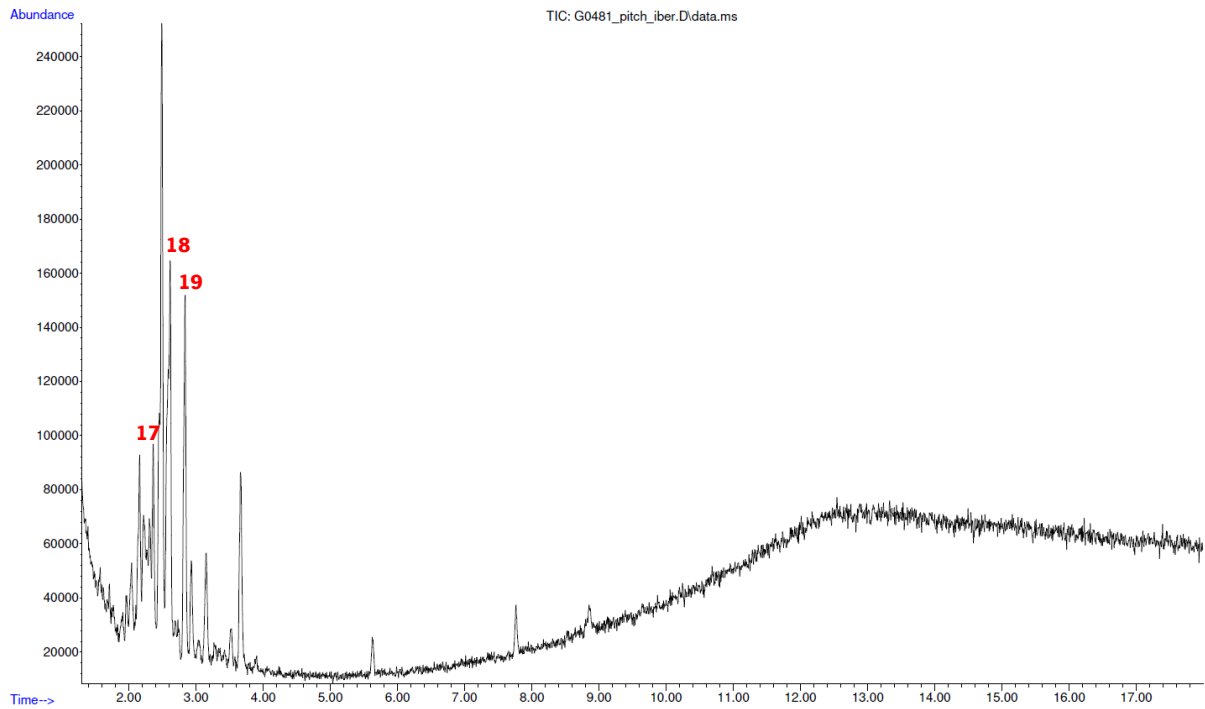
A análise de HS-SPME/GC-MS com a fibra PDMS de 100 µm dos cristais de *pitch* brasileira (**Figura 84**) permitiu a identificação de oito compostos, estando quatro deles presentes nas frações insaponificáveis de *pitch* – abietato de metilo, dehidroabietato de metilo, 2,4b-dimetil-8-metileno-2-vinil-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9-dodecahidrofenantreno e sandaracopimarinal. Além disso, foi revelada a presença dos componentes álcool de diacetona, (+)-carvona, 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona e 1,7,7-trimetil-3-fenilidenebicyclo[2.2.1]heptan-2-ona (picos 13, 14, 15 e 16, respectivamente). Estes quatro componentes são naturais e, geralmente, encontrados em plantas. A ausência dos compostos fenchol, borneol e mirtenol nos cristais de *pitch* brasileira era expectável uma vez que, como já foi referido previamente, estes compostos são constituintes da terebentina.



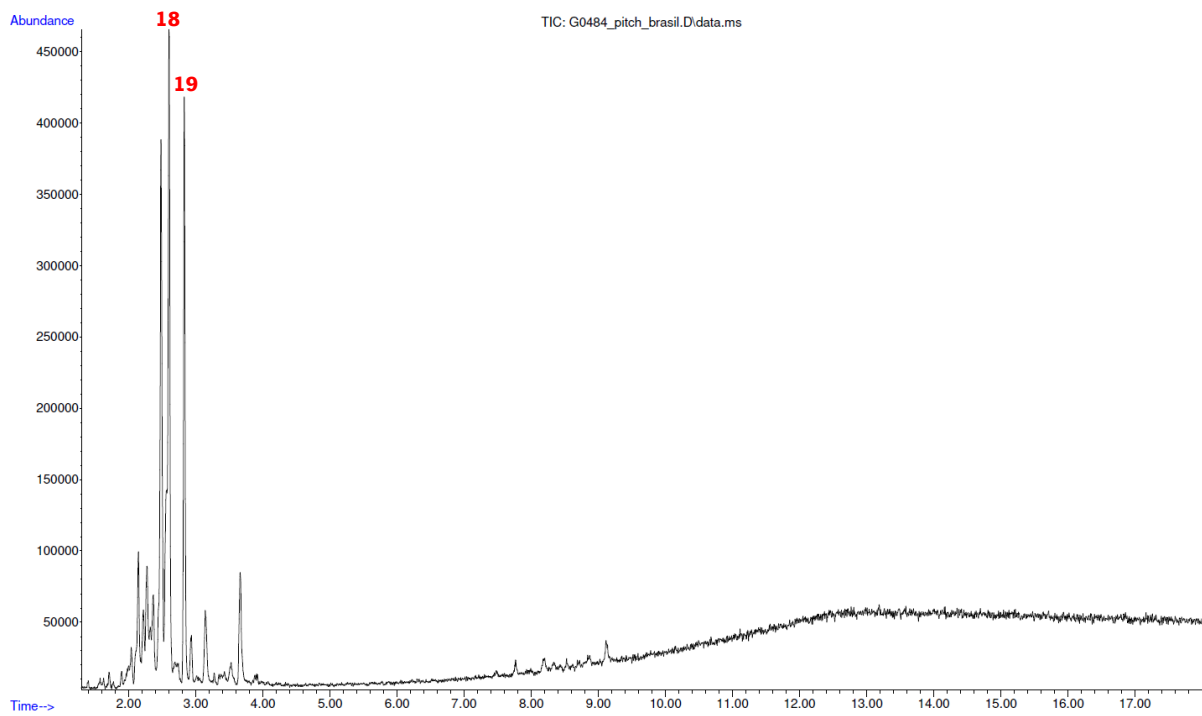
**Figura 84:** Cromatograma obtido da análise de HS-SPME/GC-MS dos cristais de *pitch* brasileira.

Relativamente às análises de DI-SPME/GC-MS não se obtiveram resultados por não ter ocorrido a separação de compostos presentes nas soluções metanólicas de 30 mg de amostra ibérica e brasileira. Isto poderá dever-se à quantidade de analitos nestas soluções ser demasiado baixa para permitir uma separação eficiente.

A análise de GC-MS precedida pela etapa de metilação dos cristais de *pitch* brasileira (**Figura 86**) possibilitou a identificação dos ácidos resínicos isopimárico e neoabiético (picos 20 e 21, respetivamente). Na amostra ibérica (**Figura 85.A**) detetou-se o componente formato de (8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*)-17-((*E*)-5,6-dimetilhept-3-eno-2-il)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantreno-3-il (pico 17), que é um derivado do brassicasterol, um composto natural encontrado em plantas, animais e algas. Nas três amostras analisadas por esta técnica também se detetou os ácidos resínicos dehidroabiético e abiético (picos 18 e 19, respetivamente) e, uma vez que os ésteres metílicos destes ácidos foram detetados nas análises supracitadas, existe a possibilidade de ambas as formas destes compostos estarem presentes na *pitch* ibérica e na *pitch* brasileira.

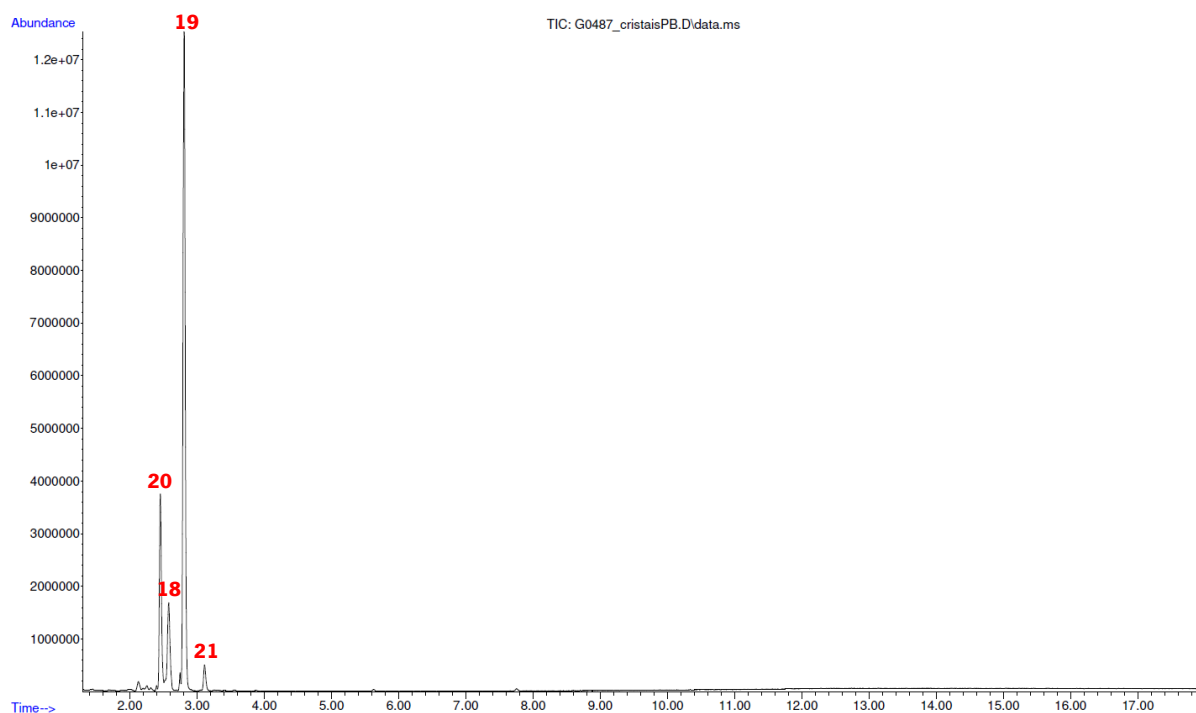


**A**



**B**

**Figura 85:** Cromatogramas obtidos das análises de GC-MS precedidas por metilação da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira.



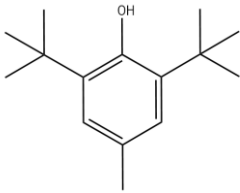
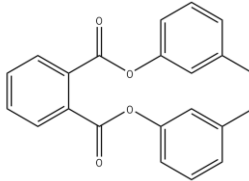
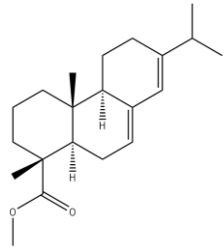
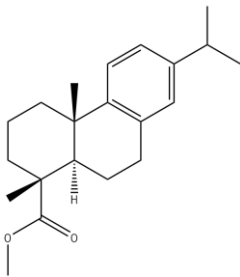
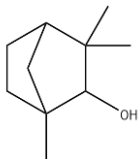
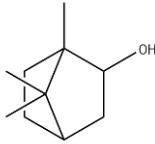
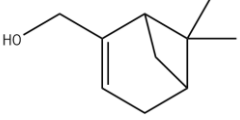
**Figura 86:** Cromatograma obtido da análise de GC-MS precedida por metilação dos cristais de *pitch* brasileira.

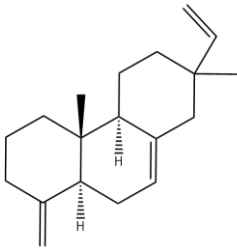
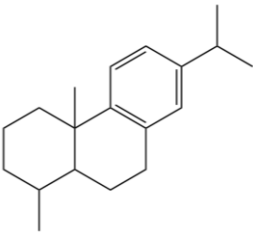
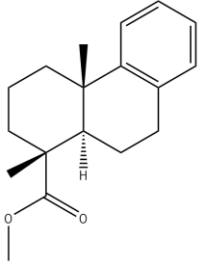
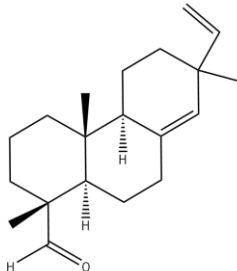
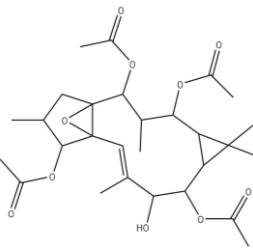
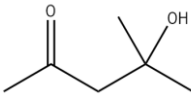
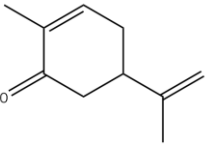
Todos os compostos que originaram os picos numerados nos cromatogramas estão representados na **Tabela 20**, onde é possível observar as suas massas molares e estruturas químicas. Os compostos que deram origem aos restantes picos não numerados não puderam ser identificados através dos seus espetros de massa.

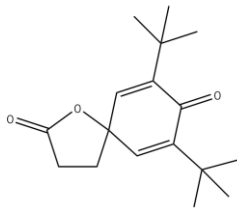
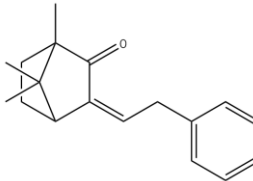
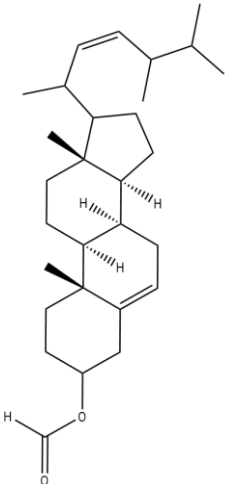
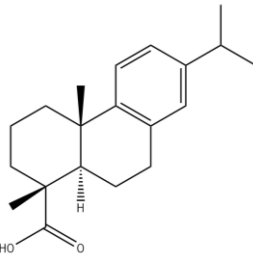
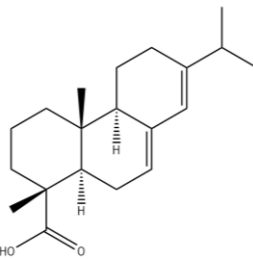
É importante salientar que de todos os compostos identificados nas análises de HPLC-MS e ESI-MS/MS apenas o ácido abiético também foi identificado nas análises de GC-MS, tendo este composto sido identificado na sua forma metilada nas análises de GC-MS precedidas por metilação. A técnica de GC-MS pode não ser capaz de detetar os restantes compostos previamente encontrados nas análises de HPLC-MS e ESI-MS/MS devido a estes poderem ser pouco voláteis ou possuírem grupos funcionais polares que não iam ser detetados por HS-SPME/GC-MS mesmo que estes compostos estivessem presentes nas amostras.

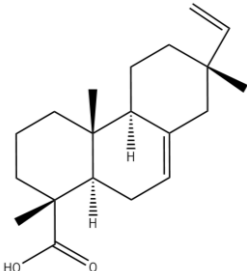
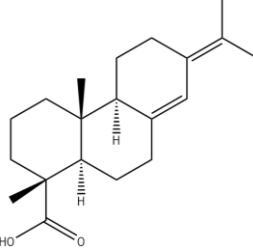


**Tabela 20:** Identificação dos picos numerados presentes nos cromatogramas.

<b>Numeração do pico</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Nome do composto</b>	<b>Massa molar (g/mol)</b>	<b>Estrutura química</b>
<b>1</b>	15,1/16,1	Hidroxitolueno butilado	220,35	
<b>2</b>	22,9	Éster di(3-metilfenil), ácido ftálico	346,40	
<b>3</b>	22,3/23,4	Abietato de metilo	316,50	
<b>4</b>	26,0/30,5	Dehidroabietato de metilo	314,50	
<b>5</b>	8,4	Fenchol	154,31	
<b>6</b>	9,4	Borneol	154,25	
<b>7</b>	10,0	Mirtenol	152,27	

<b>8</b>	21,2/21,3	2,4b-dimetil-8-metileno- 2-vinil-1,2,3,4,4a,4b, 5,6,7,8,8a,9- dodecahidrofenantreno	256,40	
<b>9</b>	22,3	Dehidroabietina	256,40	
<b>10</b>	23,3	Podocarpa-8,11,13- trieno-15-oato de metilo	272,40	
<b>11</b>	24,1	Sandaracopimarinal	286,50	
<b>12</b>	14,5	9-desoxo-9-x-acetoxi- 3,8,12-tri-O-acetilingol	536,60	
<b>13</b>	1,6	Álcool de diacetona	116,16	
<b>14</b>	10,8	(+)-Carvona	150,22	

<b>15</b>	20,9	7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona	276,40	
<b>16</b>	22,9	1,7,7-Trimetil-3-fenetilidenebicyclo[2.2.1]heptan-2-ona	254,40	
<b>17</b>	2,4	Formato de (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> )-17-(( <i>E</i> )-5,6-dimetilhept-3-eno-2-il)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[ <i>a</i> ]fenantreno-3-il	426,69	
<b>18</b>	2,6	Ácido dehidroabiético	300,40	
<b>19</b>	2,8	Ácido abiético	302,50	

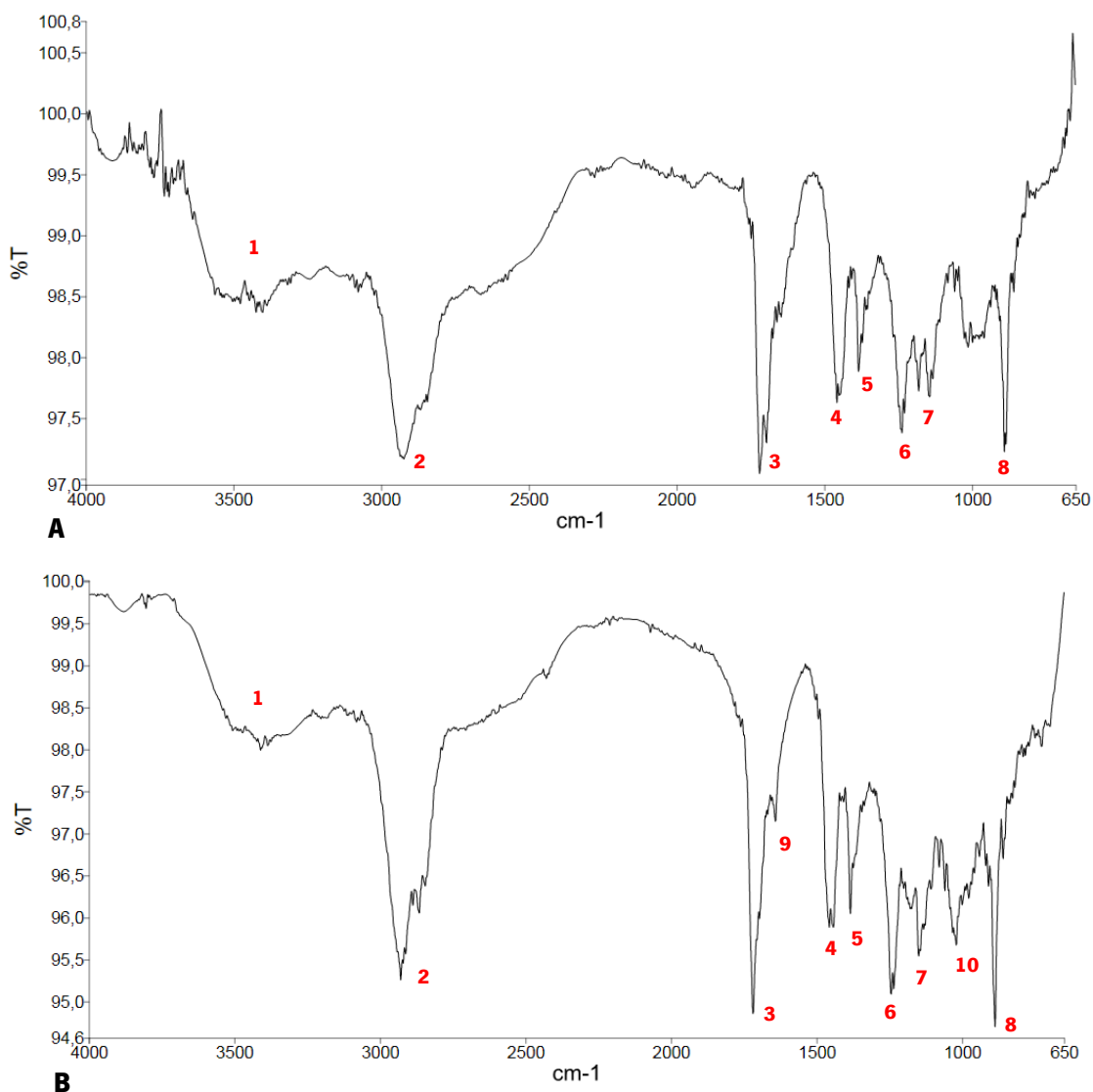
<b>20</b>	2,5	Ácido isopimárico	302,50	
<b>21</b>	3,1	Ácido neoabiético	302,50	

### 5.2.3) FTIR-ATR

Os espectros resultantes das análises de FITR-ATR das amostras ibérica e brasileira estão apresentados na **Figura 87** e na **Tabela 21** apresenta-se as atribuições das bandas de absorção observadas.

Analisando o espectro de FTIR obtido para a amostra ibérica (**Figura 87.A**) na região dos grupos funcionais constatou-se que entre 3650 e 3200  $\text{cm}^{-1}$  surge uma banda de alongamento característica dos grupos OH que estabelecem pontes de hidrogénio (banda 1). O intervalo de número de onda a que esta banda aparece poderá indicar a presença de álcoois na amostra. Tendo em consideração a forma desta banda também poderá haver sinais de N-H, indicando a presença de aminas ou amidas. Abaixo dos 3000  $\text{cm}^{-1}$  surge a banda de alongamento característica da ligação  $\text{sp}^3$  C-H (banda 2). Por volta dos 1720  $\text{cm}^{-1}$  observa-se a banda de alongamento da ligação C=O (banda 3), a existência desta banda sugere a presença de cetonas, aldeídos ou ésteres na *pitch* ibérica. Além disso, a existência das bandas de alongamento da ligação O-H e da ligação C=O poderá indicar a presença de ácidos carboxílicos nas amostras uma vez que se verificou que o procedimento experimental utilizado para a obtenção das frações insaponificáveis da *pitch* não é completamente eficaz. Examinando a região da impressão digital observou-se que as bandas de torção resultantes da ligação C-O-H surgem por volta dos 1460 e 891  $\text{cm}^{-1}$  (bandas 4 e 8) e as resultantes da ligação C-H surgem por volta dos 1382 e 1147  $\text{cm}^{-1}$  (bandas 5 e 7). Constatou-se também a presença da banda de torção da ligação C-O a 1239  $\text{cm}^{-1}$  (banda 6) e, uma vez

que esta banda surge a uma frequência maior das habitualmente observadas para as bandas da ligação C-O dos álcoois alifáticos, isto poderá indicar a presença de compostos fenólicos na *pitch* ibérica.



**Figura 87:** Espectros FTIR-ATR da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira.

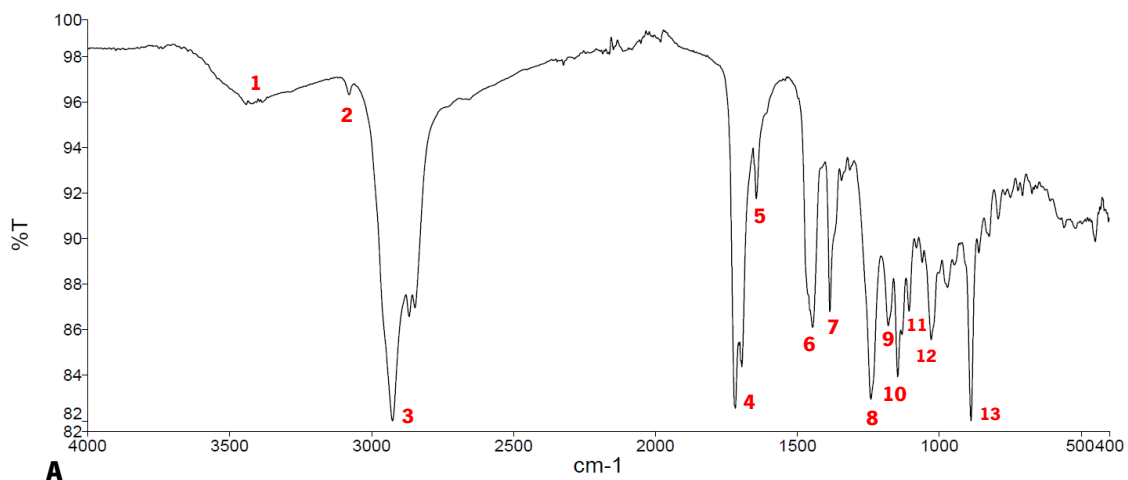
Em relação ao espectro de FTIR obtido para a amostra brasileira (**Figura 87.B**) verificou-se a existência de todas as bandas de alongamento e torção mencionadas anteriormente e observou-se uma banda de alongamento que não está presente na amostra ibérica – a banda da ligação C=C a 1639 cm<sup>-1</sup> (banda 9) – que se encontra sobreposta com a banda da ligação C=O. Além disso, observou-se a presença adicional de uma banda de torção da ligação C-H por volta dos 1023 cm<sup>-1</sup> (banda 10).

**Tabela 21:** Números de onda e atribuição das bandas de absorção observadas nos espectros FTIR-ATR das amostras ibérica e brasileira.

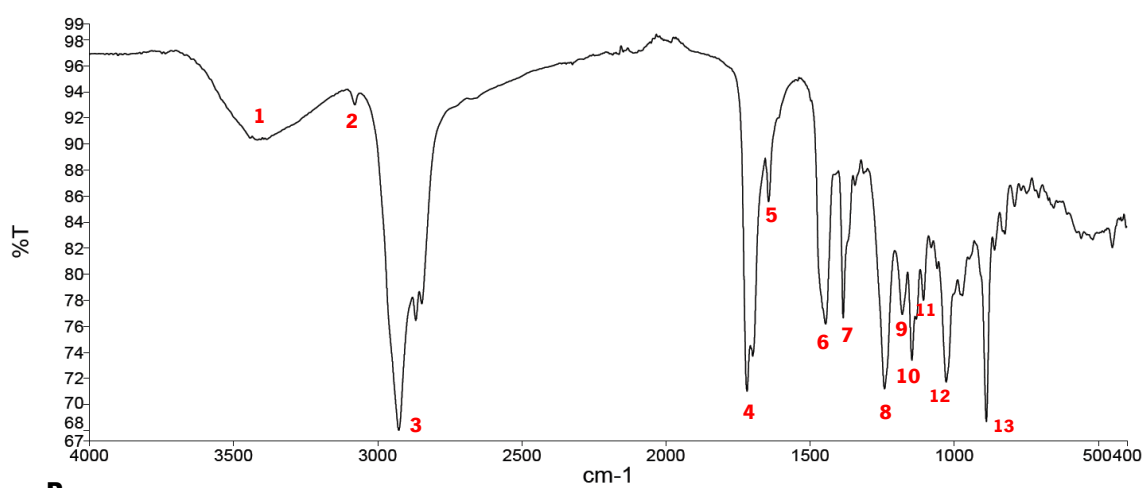
<b>Numeração das bandas de absorção</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>) na Amostra ibérica</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>) na Amostra brasileira</b>	<b>Atribuição das bandas de absorção</b>
<b>1</b>	3650-3200	3650-3200	Alongamento da ligação O-H - álcoois
<b>2</b>	2926	2931	Alongamento da ligação sp <sup>3</sup> C-H
<b>3</b>	1720	1719	Alongamento da ligação C=O
<b>4</b>	1460	1455	Torção da ligação C-O-H
<b>5</b>	1382	1386	Torção da ligação C-H
<b>6</b>	1239	1244	Torção da ligação C-O - fenóis
<b>7</b>	1147	1147	Torção da ligação C-H
<b>8</b>	891	887	Torção da ligação C-O-H
<b>9</b>	–	1639	Alongamento da ligação C=C
<b>10</b>	–	1023	Torção da ligação C-H

Algumas bandas de absorção características de compostos fenólicos tais como, a quercetina, kaempferol e catequina, estão presentes nos espectros das amostras ibérica e brasileira, o que indica a possibilidade da existência de compostos fenólicos na *pitch* ibérica e *pitch* brasileira. Nomeadamente, no espectro do composto quercetina são observadas as bandas de alongamento da ligação C=C e torção da ligação C-O<sup>118</sup>, no espectro da catequina constata-se a presença da banda de alongamento da ligação C=C<sup>119</sup> e no espectro do kaempferol verifica-se a presença da banda de alongamento da ligação sp<sup>3</sup> C-H.<sup>120</sup> Além disso, nos espectros de FTIR destes três compostos observa-se a existência das bandas de alongamento da ligação O-H.<sup>118-120</sup>

Nas **Figuras 88 e 89** apresentam-se os espectros das análises de FTIR-ATR dos precipitados sólidos ibérico e brasileiro e dos cristais de *pitch* brasileira, respetivamente. A **Tabela 22** tem as atribuições das bandas de absorção observadas nestas três amostras.

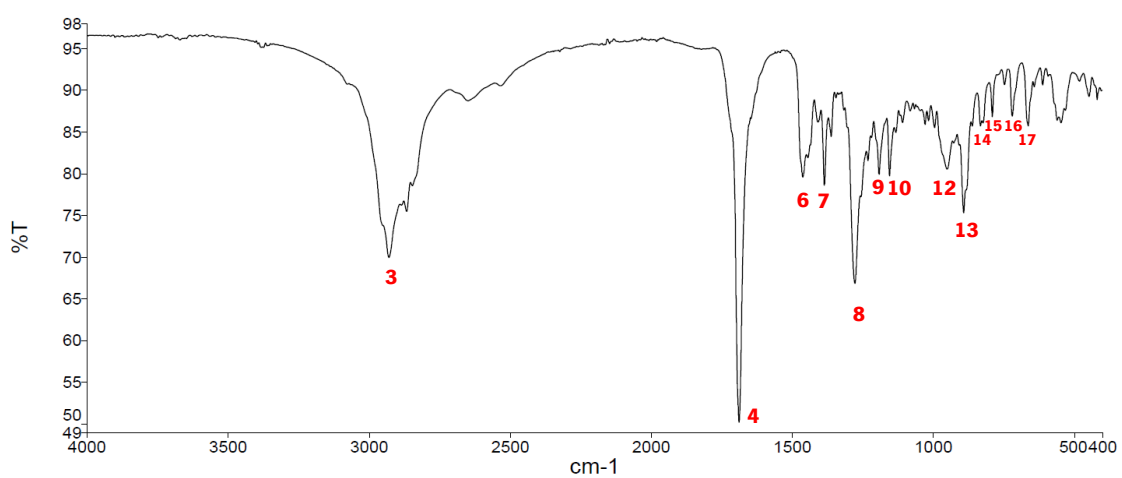


**A**



**B**

**Figura 88:** Espetros FTIR-ATR do A) precipitado ibérico e B) precipitado brasileiro.



**Figura 89:** Espectro FTIR-ATR dos cristais da *pitch* brasileira.

Os dois espectros dos precipitados sólidos apresentam todas as bandas de absorção observadas nos espectros anteriores. Além da presença destas bandas constatou-se a existência da banda de alongamento da ligação  $sp^2$  C-H a  $3081\text{ cm}^{-1}$  (banda 2), o que indica a presença de compostos com ligações duplas entre carbonos na porção apolar da *pitch*.

Por sua vez, o espectro dos cristais (**Figura 89**) apresenta todas as bandas dos espectros da amostra ibérica e amostra brasileira, exceto a banda de alongamento da ligação O-H, e mostra quatro bandas de torção da ligação C-H (bandas 14, 15, 16 e 17) que, devido a se encontrarem no intervalo de número de onda  $832\text{-}664\text{ cm}^{-1}$ , indicam a presença de compostos com anéis aromáticos na *pitch* brasileira. A existência da banda de alongamento da ligação  $sp^2$  C-H e das bandas de torção da ligação C-H do anel aromático contribuem para a hipótese da existência de compostos fenólicos nas duas variedades de *pitch*.

Considerando a estrutura química de todos compostos detetados nas análises de HPLC-MS, ESI-MS/MS e GC-MS apenas o ácido 13-oxo-9,11-tridecadienóico, o sandaracopimarinal e o formato de (8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*)-17-((*E*)-5,6-dimetilhept-3-eno-2-il)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantreno-3-il possuem na sua estrutura um grupo funcional específico cujo sinal não aparece nos espectros de FTIR-ATR das amostras, nomeadamente, o sinal do grupo aldeído. O facto desta banda não aparecer pode dever-se a estes três compostos estarem presentes na *pitch* em concentrações demasiado baixas para o sinal do grupo aldeído ser detetado pela técnica de FTIR-ATR.

**Tabela 22:** Números de onda e atribuição das bandas de absorção observadas nos espectros FTIR-ATR dos precipitados sólidos ibérico e brasileiro e dos cristais de *pitch* brasileira.

<b>Numeração das bandas de absorção</b>	<b>Número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>) no Precipitado ibérico</b>	<b>Número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>) no Precipitado brasileiro</b>	<b>Número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>) nos Cristais da <i>pitch</i> brasileira</b>	<b>Atribuição das bandas de absorção</b>
<b>1</b>	3650-3200	3650-3200	—	Alongamento da ligação O-H – álcoois



<b>2</b>	3081	3081	–	Alongamento da ligação sp <sup>2</sup> C-H
<b>3</b>	2927	2928	2931	Alongamento da ligação sp <sup>3</sup> C-H
<b>4</b>	1718	1718	1688	Alongamento da ligação C=O
<b>5</b>	1644	1644	–	Alongamento da ligação C=C
<b>6</b>	1445	1445	1462	Torção da ligação C-O-H
<b>7</b>	1385	1385	1386	Torção da ligação C-H
<b>8</b>	1240	1240	1277	Torção da ligação C-O - fenóis
<b>9</b>	1179	1179	1192	
<b>10</b>	1145	1146	1154	Torção da ligação C-H
<b>11</b>	1104	1106	–	
<b>12</b>	1025	1027	950	
<b>13</b>	888	887	891	Torção da ligação C-O-H
<b>14</b>	–	–	832	
<b>15</b>	–	–	789	Torção da ligação C-H – anel
<b>16</b>	–	–	720	aromático
<b>17</b>	–	–	664	

#### 5.2.4) RMN

Previamente às análises de <sup>1</sup>H-RMN dissolveu-se 10 mg de amostra ibérica e amostra brasileira em 700 µL de clorofórmio deuterado e DMSO D6, tendo-se observado que a *pitch* não se dissolve completamente no solvente DMSO D6 como se pode ver na **Figura 90**. Isto indica que a *pitch* ibérica e a *pitch* brasileira contêm uma porção significativa de componentes apolares uma vez que o solvente DMSO é muito polar, mais polar do que o clorofórmio, observação que já tinha sido efetuada durante a realização das análises de HPLC-MS e ESI-MS/MS.

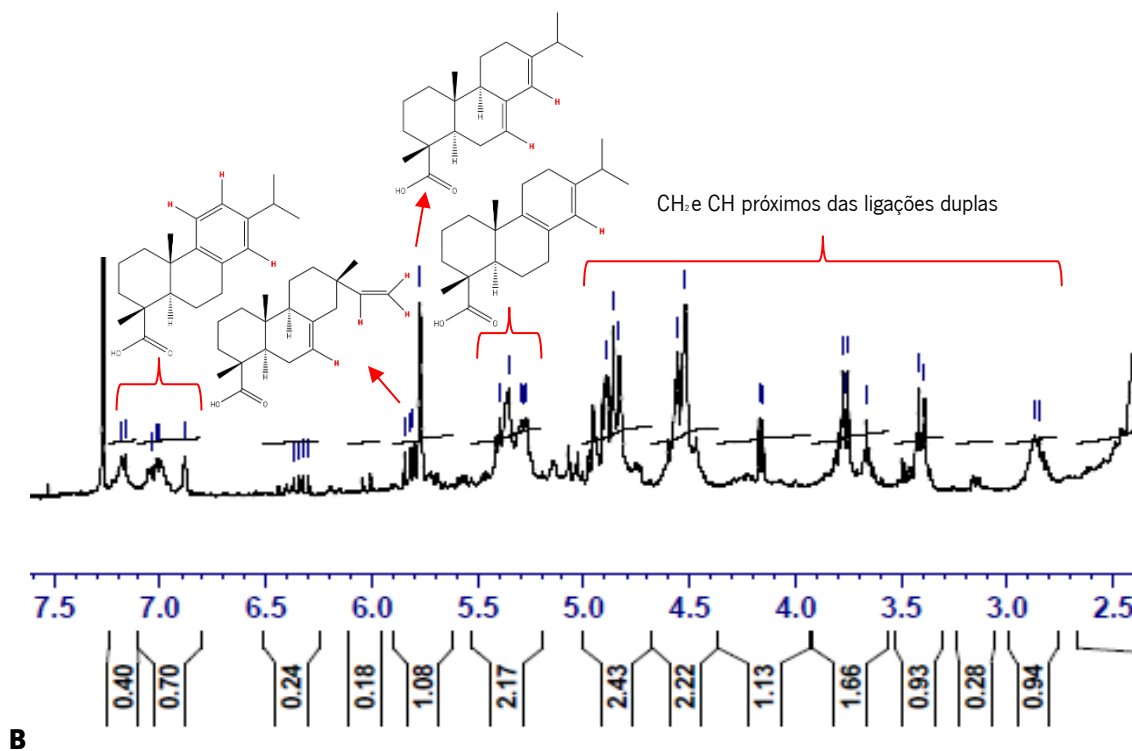
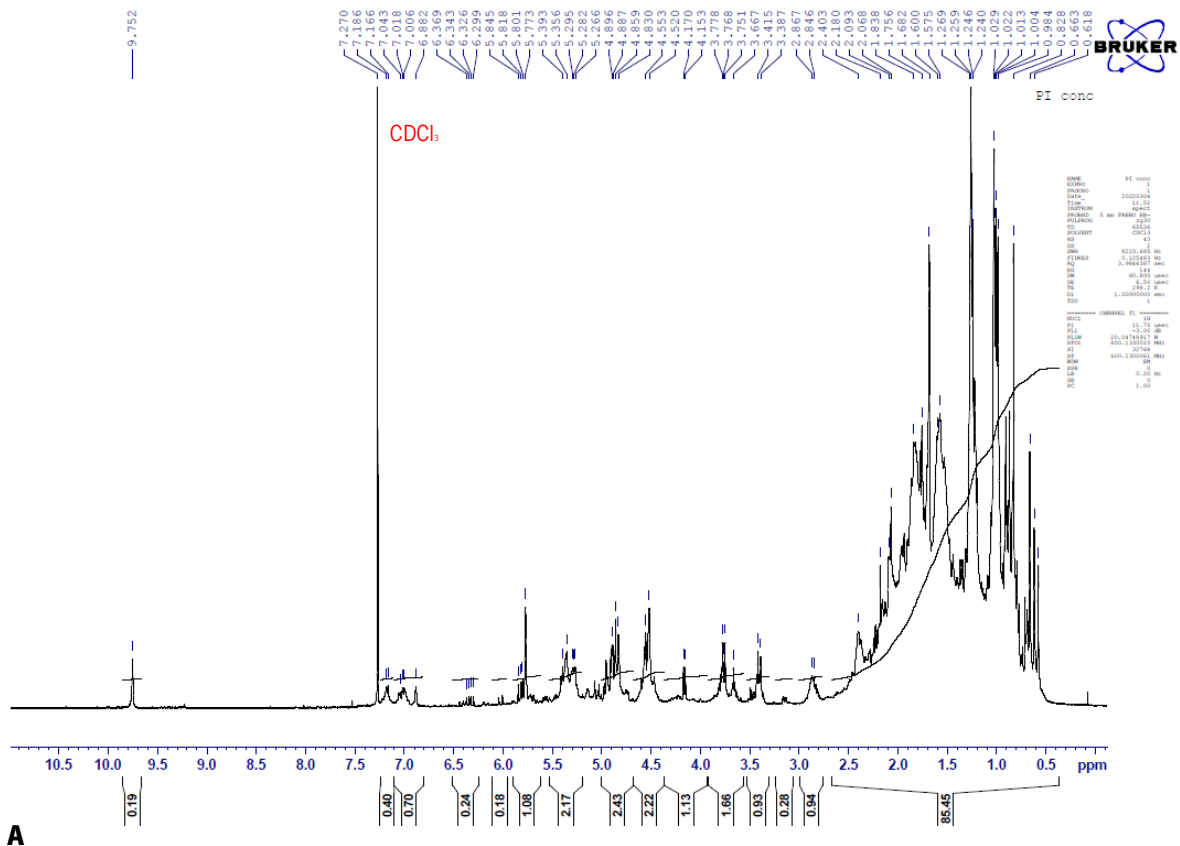
Sendo que as amostras não se dissolvem completamente no solvente DMSO D6 os espectros feitos com este solvente têm sinais menos definidos em comparação com os espectros feitos com clorofórmio deuterado. Por este motivo é mais adequado usar clorofórmio deuterado como solvente para as análises de <sup>1</sup>H-RMN das amostras ibérica e brasileira e dos cristais de *pitch* brasileira. Os espectros destas três amostras estão apresentados nas **Figuras 91, 112 e 96**, respetivamente.



**Figura 90:** Fotografia da parte insolúvel observada na solução de 10 mg de amostra ibérica em DMSO D6.

No espectro da **Figura 91.A** observa-se um sinal intenso a 7,270 ppm que corresponde ao sinal do solvente usado, sendo este desprezado visto que não é relevante para o estudo desenvolvido. Na região entre 0,5-2,5 ppm, apresentam-se os picos correspondentes aos hidrogénios  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$  de todos os compostos presentes na amostra ibérica. Esta é uma região alifática complexa, não sendo possível realizar nenhuma atribuição específica. Como se pode ver na **Figura 91.B** a região entre 2,5-5,0 ppm corresponde aos sinais de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$  que se encontram na proximidade de ligações duplas entre carbonos. O sinal observado a aproximadamente 5,3 ppm corresponde a hidrogénios de carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$ . Este sinal é característico do ácido palústrico<sup>121</sup> que possui na sua estrutura apenas um hidrogénio ligado a um carbono com hibridização  $\text{sp}^2$ , o que poderá indicar a presença deste ácido resínico na amostra ibérica.

Sinais de hidrogénios ligados a carbonos  $\text{sp}^2$  característicos de outros ácidos resínicos também são observados no espectro da amostra ibérica, nomeadamente, ácido abiético<sup>13,121,122</sup> com um singleto a 5,773 ppm e ácido isopimárico<sup>121</sup> com um tripleto a 5,801-5,845 ppm. Os dupletos a 7,2 ppm e 7,0 ppm e o singleto a 6,9 ppm encontram-se na zona característica de prótons ligados a anéis aromáticos. Integrando cada um destes sinais a um hidrogénio eles são atribuíveis aos três hidrogénios no anel aromático do ácido dehidroabiético<sup>13,121,122</sup>, o único ácido resínico aromático. Por sua vez, o sinal que surge a 9,572 ppm pode corresponder a um hidrogénio do grupo aldeído, o que indica a presença de aldeídos nesta amostra. É importante notar que, apesar de serem visíveis sinais relacionados com a presença de ácidos resínicos, o sinal do hidrogénio do grupo funcional  $\text{COOH}$  não aparece na zona esperada (10-12 ppm). A ausência deste sinal pode dever-se a ter ocorrido uma troca de prótons com o solvente clorofórmio deuterado, tendo o grupo  $\text{COOH}$  dos ácidos resínicos sido convertido em  $\text{COOD}$ , cujo sinal não aparece no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN.



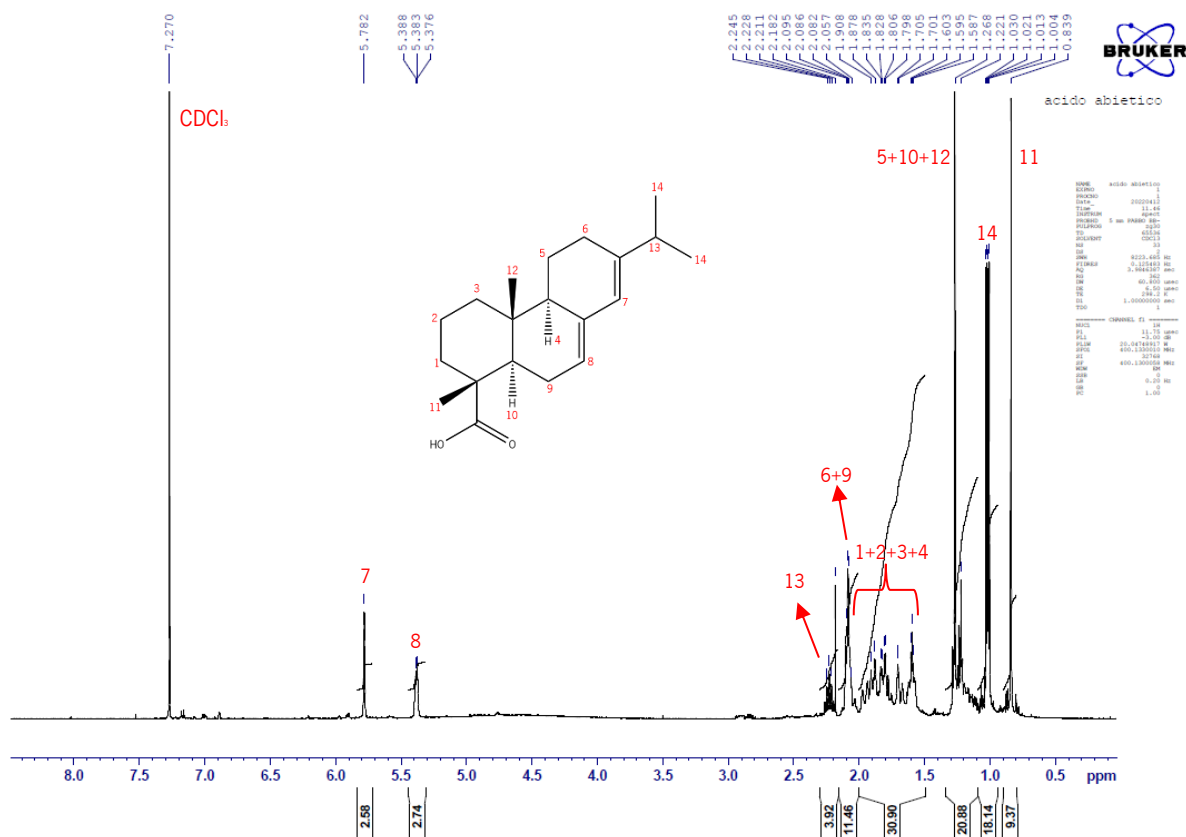
**Figura 91:** A) Espetro de <sup>1</sup>H-RMN de 10 mg da amostra ibérica em clorofórmio deuterado e B) alargamento da zona espectral entre 2,5-7,5 ppm.

Não existem diferenças aparentes entre o espectro da amostra ibérica e o espectro da amostra brasileira. De facto, a única diferença observável consiste num sinal de baixa intensidade que surge a 9,23 ppm, aproximadamente, no espectro da amostra brasileira (**Figura 112 do Anexo C.3**). Este sinal pode ser atribuído a um hidrogénio do grupo aldeído, sendo que a amostra brasileira apresenta, deste modo, dois sinais distintos de hidrogénios pertencentes a este grupo funcional.

Também se realizou análises de  $^1\text{H-RMN}$  dos padrões ácido abiético, acetato de linalilo, ácido oleico e 2-amino-1,3,4-octadecanotriol cujos espectros estão apresentados nas **Figuras 92, 93, 94 e 95**, respetivamente. Nestas figuras é possível observar os hidrogénios presentes na estrutura química dos compostos numerados e a atribuição dos picos.

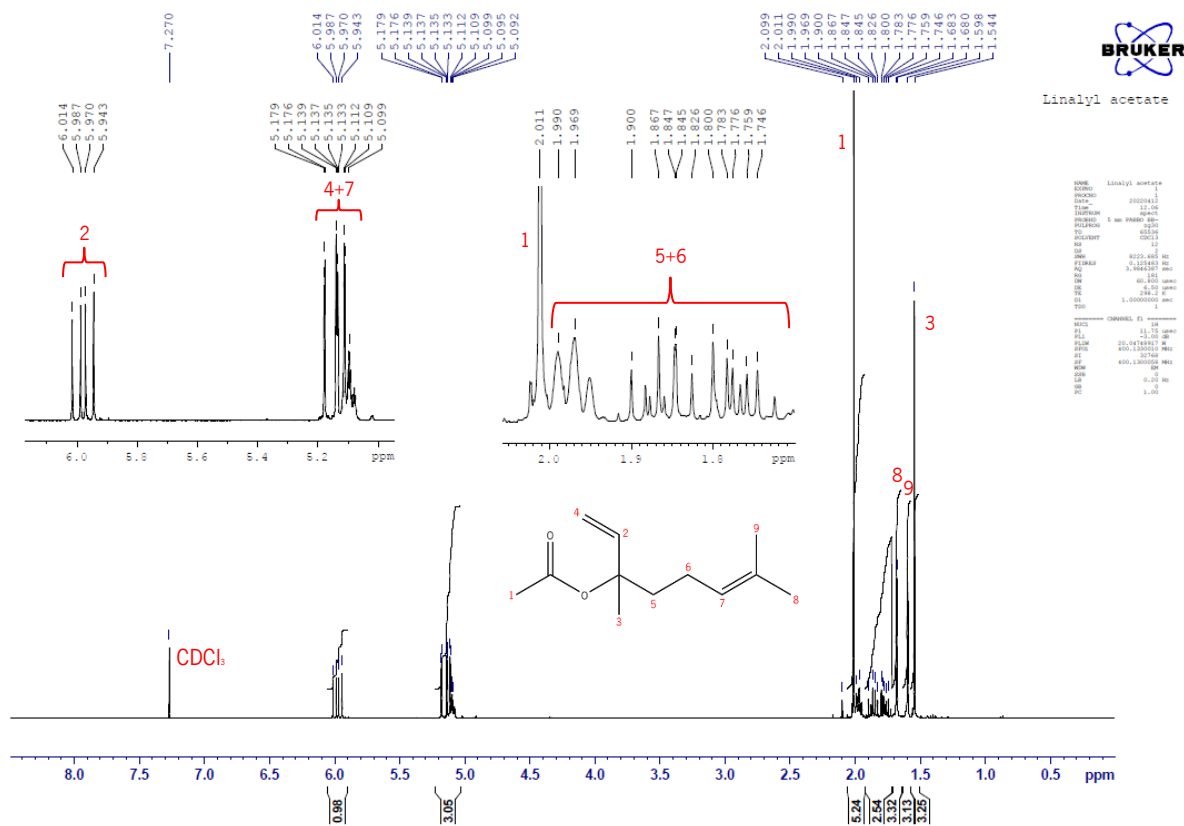
No espectro do ácido abiético (**Figura 92**) observam-se sinais com elevada intensidade a 0,839 e 1,0 ppm que correspondem aos hidrogénios dos grupos metilo na posição 11 e 14, respetivamente. Os protões da posição 14 geram um único sinal devido a estarem no mesmo ambiente químico. Também se constata a presença de um sinal intenso a 1,263 ppm. Este pico é atribuído aos hidrogénios das posições 5 e 10 e aos hidrogénios do grupo metilo 12 que estão em ambientes químicos semelhantes, o que resulta na geração de um único sinal. Os vários picos da região compreendida entre 1,5 e 2,0 ppm são atribuídos aos protões das posições 1, 2, 3 e 4. O sinal observado a aproximadamente 2,09 ppm corresponde a protões ligados aos carbonos das posições 6 e 9. O protão ligado ao carbono que se encontra ligado aos dois grupos metilo origina um sinal a cerca de 2,23 ppm. Por sua vez, os protões dos carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$  do ácido abiético originam os picos a 5,38 e 5,782 ppm.

Os espectros da amostra ibérica e da amostra brasileira mostram vários sinais dos protões do ácido abiético. Uma vez que não se observou o sinal do protão do grupo  $\text{COOH}$  no espectro do ácido abiético e, como já foi referido anteriormente, este também não aparece nos espectros das amostras, a ausência deste sinal é mais uma evidência da presença deste ácido resínico nas amostras.



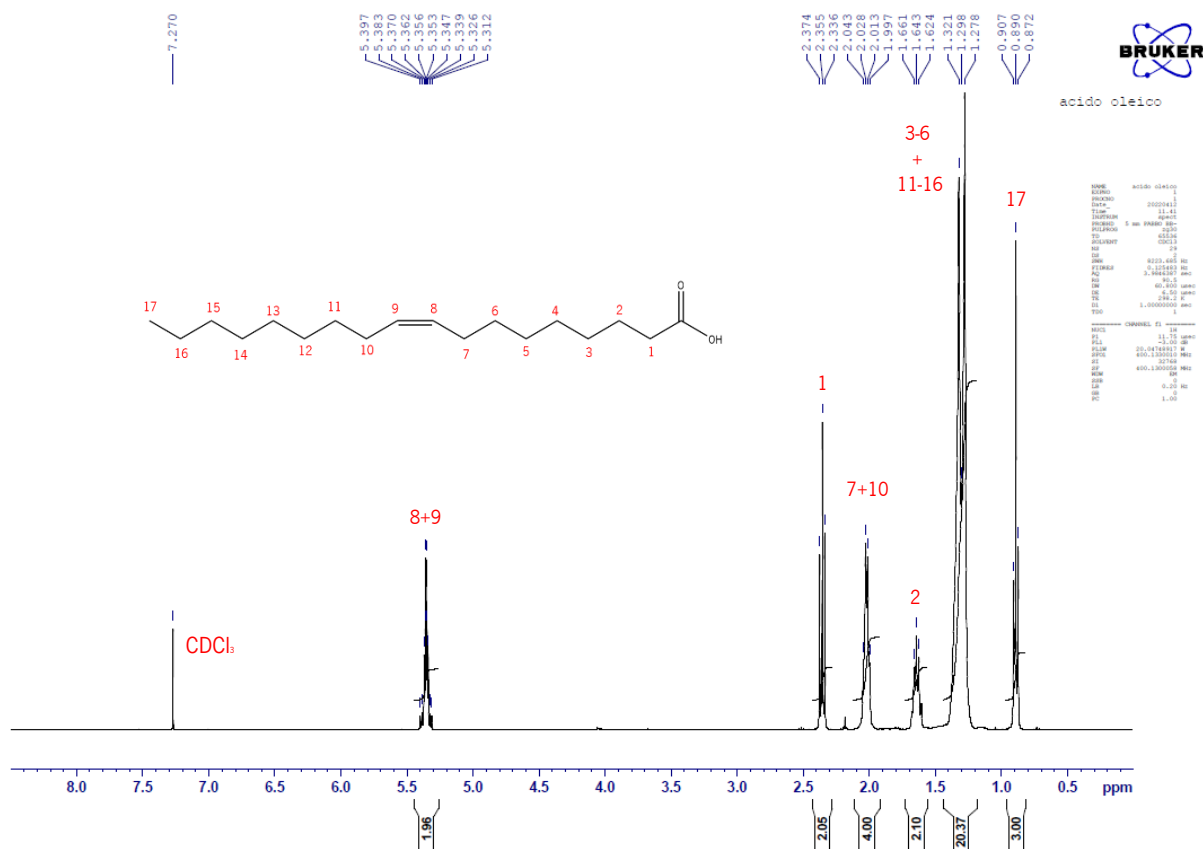
**Figura 92:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 5 mg de ácido abiético em clorofórmio deuterado.

Relativamente ao espectro do acetato de linalilo (**Figura 93**) os quatro picos de maior intensidade que estão localizados na região espectral de 1,5-2,1 ppm correspondem aos prótons dos quatro grupos metilo da estrutura química do composto. Os vários sinais que se observam entre 1,7 e 2,0 ppm podem ser atribuídos aos prótons das posições 5 e 6. Consta-se a presença de um conjunto de sinais entre 5,1-5,2 ppm que se devem à presença de prótons ligados aos carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$  das posições 4 e 7. Finalmente, o quarteto observado a, aproximadamente, 6,0 ppm pode ser atribuído ao próton da posição 2. Os sinais de todos os prótons ligados a carbonos  $\text{sp}^3$  do acetato de linalilo podem estar presentes na zona alifática complexa dos espectros das amostras ibérica e brasileira e o sinal dos prótons ligados aos carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$  das posições 4 e 7 pode estar na região entre 2,5-5,0 ppm dos espectros das amostras. Nos espectros das amostras ibérica e brasileira não se observa o sinal correspondente ao próton do carbono  $\text{sp}^2$  da posição 2 do acetato de linalilo.



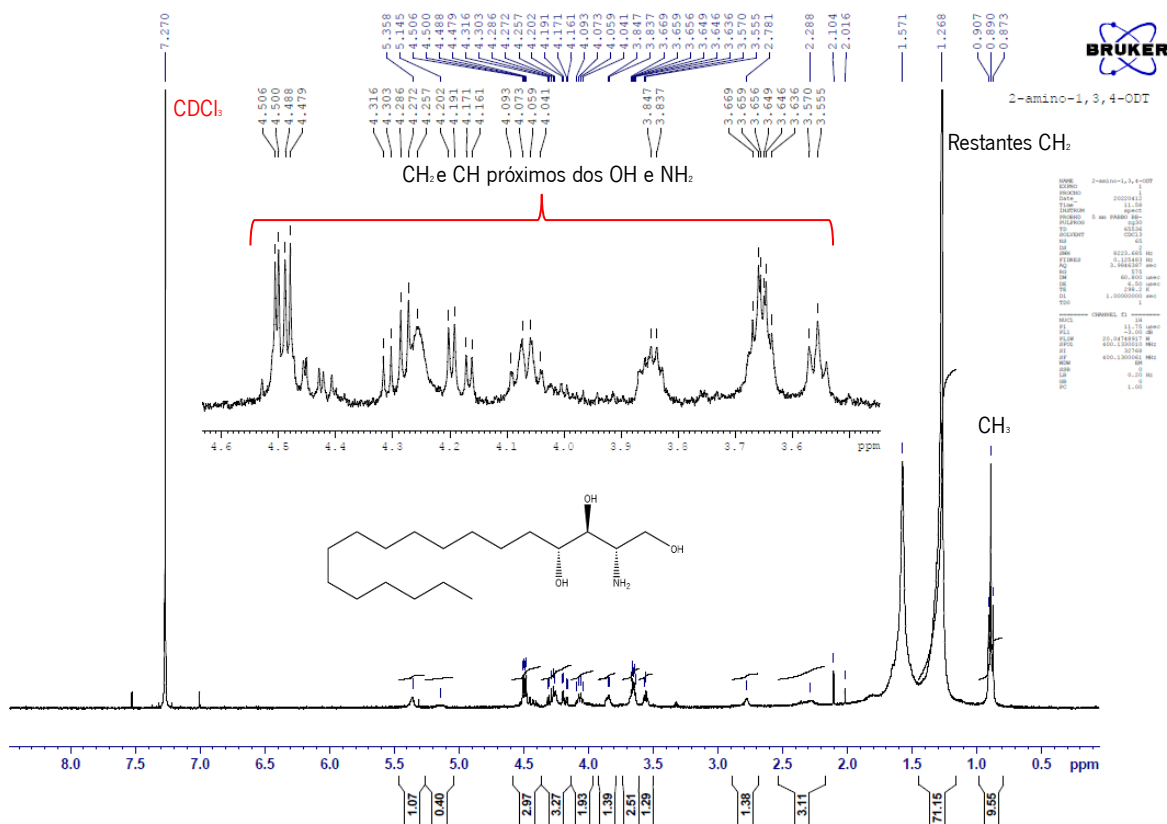
**Figura 93:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de acetato de linalilo em clorofórmio deuterado.

No espectro do ácido oleico (**Figura 94**) os prótons das posições 3-6 e 11-16 geram um único sinal muito intenso a 1,3 ppm devido a estarem em ambientes químicos bastante semelhantes. Os prótons próximos da ligação dupla também formam em conjunto um sinal a 2,0 ppm por terem ambientes químicos muito semelhantes. Constata-se a presença de um pico a, aproximadamente, 5,3 ppm, que é atribuído aos hidrogénios dos carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$  do ácido oleico. Os prótons ligados aos carbonos da posição 17 e 2 originam os sinais a cerca de 0,9 e 1,6 ppm, respetivamente. Por sua vez, os prótons do carbono ligado ao grupo  $\text{COOH}$  geram o sinal a 2,3 ppm. Tal como no caso do ácido abiético não se observou o sinal do próton do grupo  $\text{COOH}$  no espectro do ácido oleico. Os sinais de todos os prótons ligados a carbonos  $\text{sp}^3$  do ácido oleico podem estar presentes na zona alifática complexa dos espectros das amostras ibérica e brasileira e o sinal dos prótons ligados aos carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$  pode estar sobreposto ao sinal característico do ácido palústrico.



**Figura 94:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de ácido oleico em clorofórmio deuterado.

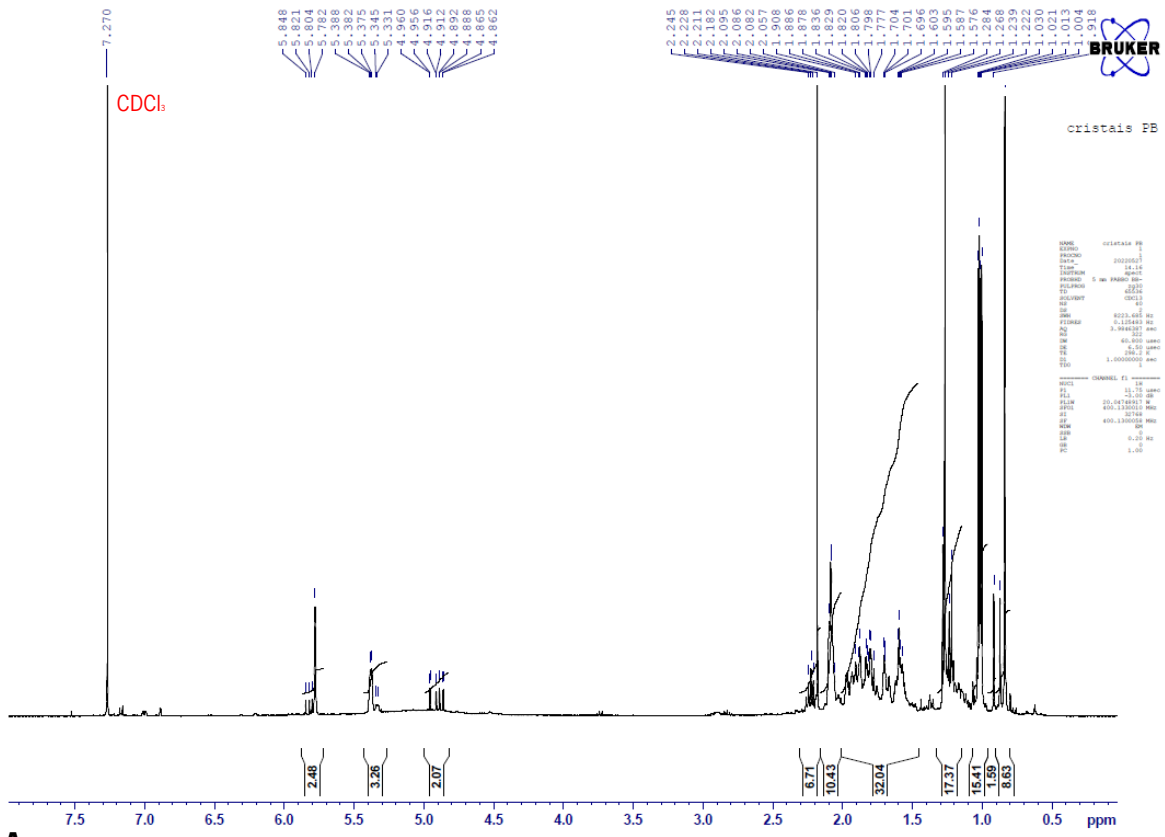
Em relação ao espectro do 2-amino-1,3,4-octadecanotriol os sinais não estão bem definidos e é difícil fazer a atribuição dos sinais (**Figura 95**). Neste espectro os vários picos da região compreendida entre 3,5 e 4,5 ppm são atribuídos aos prótons dos carbonos próximos dos grupos hidroxilo e do grupo amino. Os prótons do carbono localizado no extremo da cadeia alifática deste composto originam o sinal que se observa a, aproximadamente, 0,9 ppm. Por sua vez, os prótons dos restantes carbonos da cadeia alifática que não estão perto dos grupos hidroxilo e do grupo amino, por estarem em ambientes químicos muito semelhantes originam um único pico a 1,268 ppm. Os sinais com atribuição do 2-amino-1,3,4-octadecanotriol podem estar incluídos na zona alifática complexa e na região entre 2,5-5,0 ppm correspondente aos sinais de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$  que se encontram na proximidade de ligações duplas entre carbonos dos espectros das amostras ibérica e brasileira.



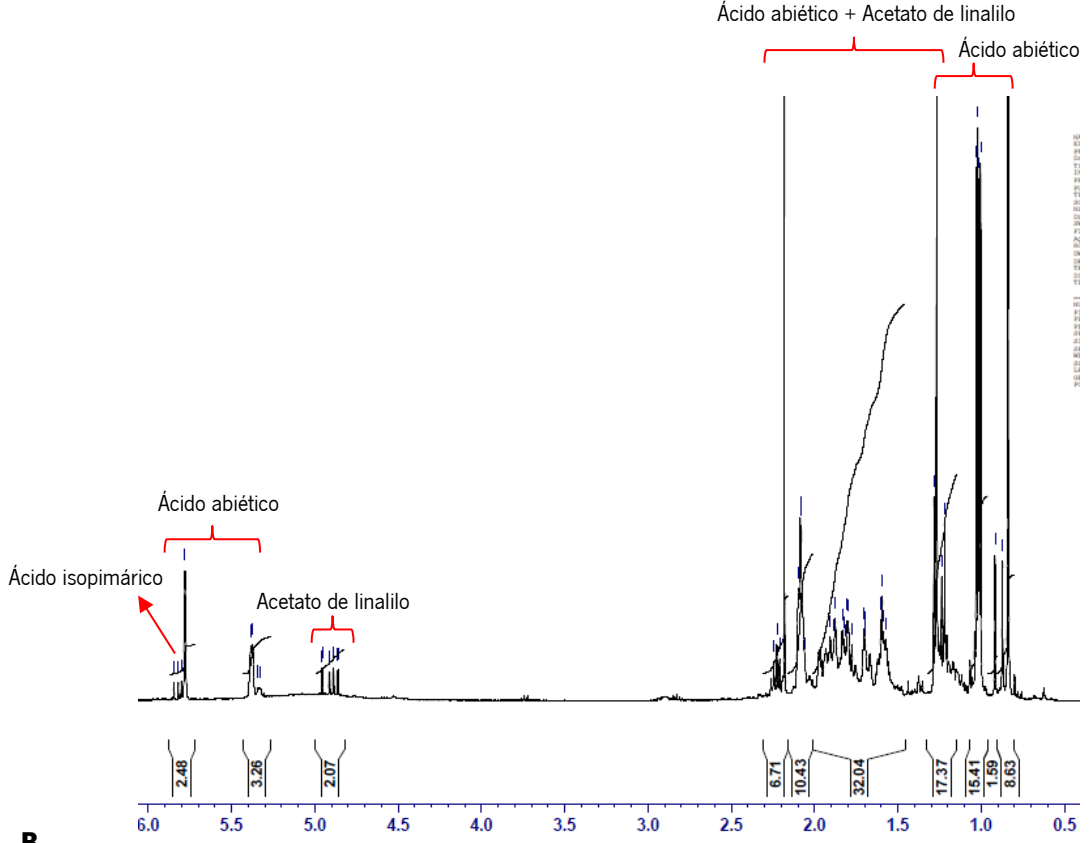
**Figura 95:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de 5 mg de 2-amino-1,3,4-octadecanotriol em clorofórmio deuterado.

O espectro dos cristais de *pitch* brasileira (**Figura 96**) é menos complexo em comparação com os espectros das amostras ibérica e brasileira, verificando-se que os sinais são mais bem definidos. Neste espectro verifica-se a presença de vários sinais dos compostos ácido abiético e acetato de linalilo. Constata-se a presença de três picos de elevada intensidade entre 0,5-1,5 ppm que podem ser atribuídos aos picos dos prótons do ácido abiético observados nessa região no espectro do mesmo. O pico localizado a, aproximadamente 1,3 ppm pode também ser atribuído aos prótons de um dos grupos metilo do acetato de linalilo. A região compreendida entre 1,5 e 2,5 ppm inclui os picos dos prótons de carbonos sp<sup>3</sup> destes dois padrões. Também se verifica a existência do conjunto de sinais a 4,9 ppm, que se devem à presença de prótons ligados aos carbonos com hibridização sp<sup>2</sup> das posições 4 e 7 do acetato de linalilo, e de dois picos a 5,4 e 5,8 ppm que são atribuídos aos prótons dos carbonos com hibridização sp<sup>2</sup> do ácido abiético. É possível observar também um tripleto a 5,804-5,848 ppm correspondente aos prótons ligados a carbonos sp<sup>2</sup> característicos do ácido isopimárico, cujo sinal tinha sido previamente observado nos espectros das amostras ibérica e brasileira.





A



B

**Figura 96:** A) Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 5 mg dos cristais de *pitch* brasileira em clorofórmio deuterado e B) alargamento da zona espectral entre 0,5-6,0 ppm.

As análises de  $^1\text{H}$ -RMN das três amostras e dos quatro padrões permite-nos concluir que a *pitch* ibérica e a *pitch* brasileira devem possuir na sua composição os ácidos resínicos abiético, palústrico, isopimárico e dehidroabiético e o composto neutro acetato de linalilo. Em relação aos espectros do ácido oleico e 2-amino-1,3,4-octadecanotriol não surgiram sinais que não pudessem estar presentes nos espectros das três amostras e que contradizassem a presença dos mesmos na *pitch*. Considerando a estrutura química dos restantes compostos detetados nas análises de HPLC-MS, ESI-MS/MS e GC-MS, em teoria, os sinais dos hidrogénios destes compostos poderiam estar presentes nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN da *pitch*.

Adicionalmente fez-se a análise de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra ibérica mas, como se pode ver pela **Figura 113** do **Anexo C.3**, o espectro é muito complexo, o que impossibilita a atribuição dos picos com certeza.

### **5.3) Avaliação da atividade antioxidante das frações insaponificáveis de *pitch***

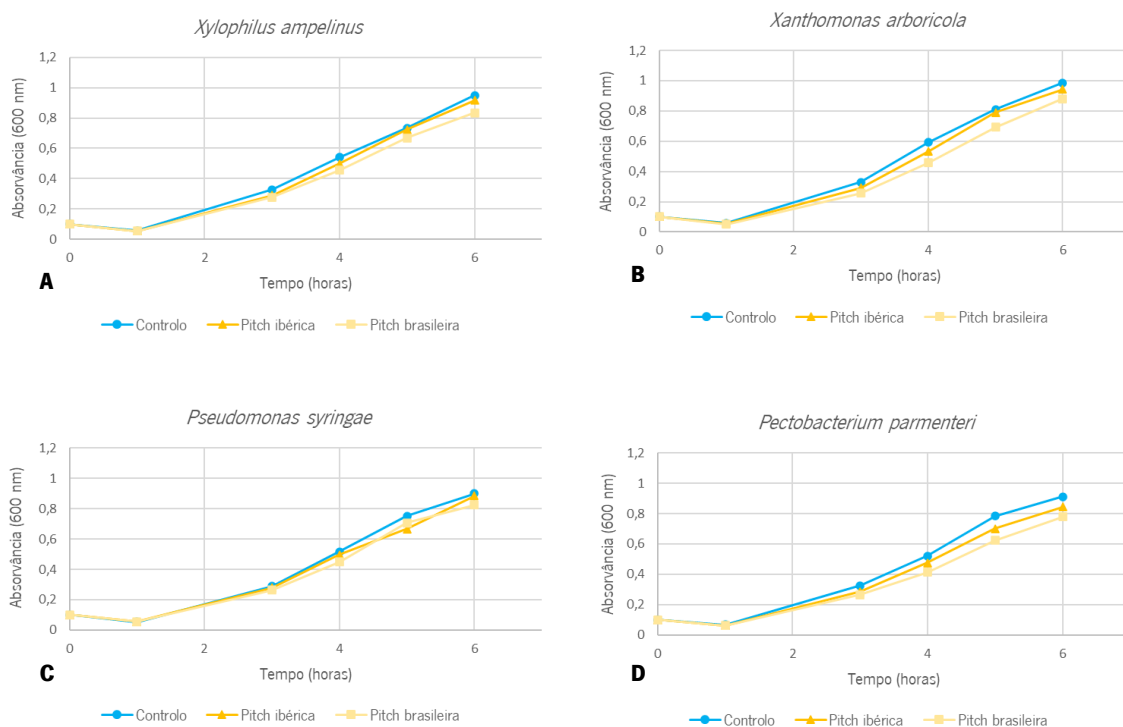
As amostras ibérica e brasileira não evidenciaram atividade antioxidante no ensaio DPPH uma vez que não se observou uma mudança de cor nos poços da microplaca contendo amostra ibérica/brasileira e solução de DPPH ao longo do tempo. Caso as amostras tivessem atividade antioxidante era esperado que com o aumento da sua concentração a percentagem do DPPH aumentasse, o que provocaria uma alteração da cor violeta intensa do radical para uma mais amarelada. No entanto tal não se verificou, mesmo a cor da solução de *pitch* de concentração mais elevada (1 mg/mL) não se modificou, permanecendo igual ao controlo. Por este motivo não se considerou necessário fazer a leitura da absorvância dos poços da microplaca pois, se tivesse sido feita, daria uma percentagem do radical DPPH reduzido, teoricamente, nula.

Apesar de não se ter obtido resultados positivos isto não indica que a *pitch* não apresenta, efetivamente, atividade antioxidante. Existem outros ensaios de atividade antioxidante que se poderiam empregar num futuro trabalho que, possivelmente, dariam resultados diferentes, por exemplo, o ensaio de formação de complexo de fosfomolibdénio, poder antioxidante redutor férrico, eliminação de radicais superóxido, inibição da peroxidação lipídica e atividade de eliminação de radicais hidróxilo. Além disso, alguns dos compostos identificados na *pitch* por ESI-MS/MS, HPLC-MS e GC-MS tem atividade antioxidante, mas podem estar presentes em quantidades demasiado baixas para exercer um efeito significativo.

#### 5.4) Avaliação da atividade antibacteriana das frações insaponificáveis de *pitch*

Na **Figura 97** observa-se os gráficos das curvas de crescimento das quatro bactérias ao longo do tempo de incubação. A elaboração de curvas de crescimento ajuda a determinar se uma amostra tem algum efeito antibacteriano, se consegue retardar ou até inibir o crescimento de determinadas bactérias. Como se pode ver pelos gráficos, o crescimento das bactérias co-incubadas com amostra ibérica e amostra brasileira acompanham o crescimento das bactérias sem qualquer tratamento (grupo de controlo), isto leva-nos a concluir que as duas variedades de *pitch* não apresentam atividade contra estas estirpes bacterianas.

É de salientar que as bactérias estudadas são fitopatogénicas. A *pitch* pode vir a demonstrar uma resposta diferente relativamente a bactérias clínicas tais como, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. e *Staphylococcus* spp.. Também existe a possibilidade da *pitch* ter compostos com atividade contra as estirpes bacterianas estudadas, mas estes estarem presentes em concentrações baixas, não exercendo um efeito antibacteriano significativo.



**Figura 97:** Gráficos da absorvância lida a 600 nm das bactérias fitopatogénicas A) *Xylophilus ampelinus*, B) *Xanthomonas arboricola*, C) *Pseudomonas syringae* e D) *Pectobacterium parmenteri* em função do tempo de incubação.

## Capítulo 6. Conclusão

Os objetivos propostos pela Eurochemicals Pine Rosins Portugal S.A. para este estágio curricular foram focados na separação, identificação e caracterização dos compostos neutros presentes na *pitch* proveniente de duas espécies de pinheiro - *Pinus elliotii* (*pitch* brasileira) e *Pinus pinaster* (*pitch* ibérica) - através das técnicas de ESI-MS/MS, HPLC-MS, GC-MS, FTIR-ATR e RMN. Também foram realizadas análises de qualidade da *pitch* para avaliar o impacto destes compostos no desempenho das colofónias e ensaios de atividade antioxidante e antibacteriana.

As análises de qualidade demonstraram que a *pitch* ibérica apresentou um índice de acidez inferior ao da *pitch* brasileira. A *pitch* brasileira apresentou uma cor ligeiramente mais clara, menores valores de viscosidade, ponto de amolecimento e ponto de turvação em comparação com a *pitch* ibérica. Além disso, constatou-se que nenhuma das amostras cristalizou durante os períodos de tempo estipulados no protocolo experimental dos dois ensaios de cristalização.

As análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS das soluções de frações insaponificáveis da *pitch* permitiram a confirmação da presença de ácido abiético, 2-amino-1,3,4-octadecanotriol, ácido oleico e acetato de linalilo na *pitch* e a provável identificação de mais 16 compostos diferentes. O ácido abiético e 2-amino-1,3,4-octadecanotriol estão presentes nas duas amostras de *pitch*, enquanto o ácido oleico e o acetato de linalilo aparentam estarem presentes apenas na *pitch* brasileira e na *pitch* ibérica, respetivamente. Com recurso a estas duas técnicas foram identificados um total de 11 compostos neutros e 8 ácidos. As análises de GC-MS permitiram a identificação de 21 compostos diferentes na *pitch*, sendo 17 deles neutros. 12 dos 39 compostos identificados por estas três técnicas tiveram a sua presença previamente reportada em extratos vegetais de *Pinus* spp. De todos os compostos identificados nas análises de HPLC-MS e ESI-MS/MS apenas o ácido abiético também foi identificado nas análises de GC-MS. Alguns dos compostos identificados por GC-MS apenas estavam presentes numa variedade de *pitch*. As diferenças observadas da presença de determinados compostos nas duas variedades da *pitch* e dos valores dos parâmetros de controlo da qualidade podem ser devidas a vários fatores, tais como, as diferentes localizações geográficas e espécies dos pinheiros, diferentes condições ambientais em que os pinheiros se desenvolvem, diferenças nos métodos de extração, purificação e destilação utilizados, entre outros.

Relativamente aos espetros de FTIR-ATR foram identificadas várias bandas de absorção que indicam a presença de álcoois, amins ou amidas, cetonas, aldeídos, ésteres e ácidos carboxílicos nas

duas amostras de *pitch*. Além do mais, a existência da banda de alongamento da ligação  $sp^2$  C-H e das bandas de torção da ligação C-H do anel aromático indicam a presença de compostos com anéis aromáticos na *pitch*, podendo estes ser compostos fenólicos. Considerando a estrutura química de todos os compostos detetados nas análises de HPLC-MS, ESI-MS/MS e GC-MS apenas três deles possuem na sua estrutura um grupo funcional específico cujo sinal não aparece nos espectros de FTIR-ATR das amostras, nomeadamente, o sinal do grupo aldeído. O facto desta banda não aparecer pode dever-se a estes três compostos estarem presentes na *pitch* em concentrações demasiado baixas para o sinal do grupo aldeído ser detetado pela técnica de FTIR-ATR.

As análises de  $^1H$ -RMN revelaram a presença de sinais correspondentes aos hidrogénios  $CH_3$ ,  $CH_2$  e  $CH$  de todos os compostos presentes nas duas variedades de *pitch*, sendo esta uma região alifática complexa, aos hidrogénios  $CH_2$  e  $CH$  que se encontram na proximidade de ligações duplas entre carbonos, sinais característicos de determinados ácidos resínicos e sinais de hidrogénios do grupo aldeído. Não se verificou diferenças significativas entre o espectro da amostra ibérica e o espectro da amostra brasileira. Os espectros de  $^1H$ -RMN da *pitch* mostraram vários sinais dos prótons do ácido abiético e do acetato de linalilo. Relativamente aos compostos ácido oleico e 2-amino-1,3,4-octadecanotriol não surgiram sinais que não pudessem estar presentes nos espectros da *pitch* e que contradizassem a presença dos mesmos neste material. Considerando a estrutura química dos restantes compostos detetados nas análises de HPLC-MS, ESI-MS/MS e GC-MS, em teoria, os sinais dos hidrogénios destes compostos poderiam estar presentes nos espectros de  $^1H$ -RMN da *pitch*. Adicionalmente fez-se a análise de  $^{13}C$ -RMN da amostra ibérica, mas o espectro era muito complexo, o que impossibilitou a atribuição dos picos com certeza.

A *pitch* não mostrou atividade antioxidante nem atividade antibacteriana. Apesar de não se ter obtido resultados positivos isto não indica que a *pitch* não apresenta, efetivamente, atividade antioxidante e antibacteriana. Alguns dos compostos identificados na *pitch* por ESI-MS/MS, HPLC-MS e GC-MS tem atividade antioxidante, mas podem estar presentes em quantidades demasiado baixas para exercer um efeito significativo. É de salientar que as bactérias estudadas no ensaio antibacteriano eram fitopatogénicas, a *pitch* pode vir a demonstrar uma resposta diferente relativamente a bactérias clínicas. Também existe a possibilidade da *pitch* ter compostos com atividade contra as estirpes bacterianas estudadas, mas estes estarem presentes em concentrações baixas, não exercendo um efeito antibacteriano significativo.

Deste modo, os objetivos propostos para esta dissertação foram cumpridos, uma vez que se conseguiu separar, identificar e caracterizar os compostos neutros presentes na *pitch*, tendo-se identificado um total de 28 compostos neutros. Também se conseguiu realizar análises de qualidade da *pitch* e os ensaios de atividade antioxidante e antibacteriana. Inclusive, superou-se o obstáculo da *pitch* precipitar em contacto com o meio de cultura aquoso no ensaio antibacteriano, devido à composição deste material ser maioritariamente apolar, com a utilização do emulsificante Tween 80.

Como sugestões para futuros trabalhos ou continuação do presente trabalho, seria interessante utilizar um método de obtenção de frações insaponificáveis da *pitch* diferente como, por exemplo, a técnica de fracionamento por troca iónica, uma vez que neste trabalho identificou-se vários ácidos diferentes na composição da *pitch*, o que indica que o método utilizado neste trabalho não foi completamente eficaz. Também seria interessante estudar a composição neutra da *pitch* de mais espécies de pinheiro e realizar outros tipos de ensaios de atividade antioxidante e antibacteriana. Além do mais poder-se-ia fazer ensaios de outras atividades biológicas tais como, atividade antifúngica, anti-inflamatória e citotóxica.

## Capítulo 7. Bibliografía



- (1) *Manual Do Sistema de Gestão Integrado (Qualidade, Ambiente, Segurança e Segurança Alimentar)*; Pine Rosins Portugal.
- (2) Gernandt, D. S.; López, G. G.; García, S. O.; Liston, A. Phylogeny and Classification of *Pinus*. *TAXON* **2005**, *54* (1), 29–42. <https://doi.org/10.2307/25065300>.
- (3) Silvestre, A. J. D.; Gandini, A. Chapter 4 - Rosin: Major Sources, Properties and Applications. In *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*; Belgacem, M. N., Gandini, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2008; pp 67–88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00004-1>.
- (4) Kadri, N.; Khettal, B.; Aid, Y.; Kherfellah, S.; Sobhi, W.; Barragan-Montero, V. Some Physicochemical Characteristics of *Pinus* (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) Seeds from North Algeria, Their Lipid Profiles and Volatile Contents. *Food Chem.* **2015**, *188*, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.138>.
- (5) Plomion, C.; Chagne, D.; Pot, D.; Kumar, S.; Wilcox, P.; Burdon, R.; Prat, D.; Peterson, D.; Paiva, J.; Chaumeil, P.; Giovanni Giuseppe, V.; Sebastiani, F.; Nelson, C.; Echt, C.; Savolainen, O.; Kubisiak, T. L.; Cervera, M. T.; De María, N.; Faridi, N. Pines. In *Forest trees*; Kole, C., Ed.; Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants; Springer: Berlin, Heidelberg, 2007; Vol. 7, pp 29–78. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34541-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34541-1_2).
- (6) *Pinus pinaster/maritime pine*. American Conifer Society. <https://conifersociety.org/conifers/pinus-pinaster/> (accessed 2021-11-22).
- (7) Lee, W. G. Introduced Plants, Negative Effects Of. In *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)*; Levin, S. A., Ed.; Academic Press: Waltham, 2001; pp 345–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00076-9>.
- (8) *Pinus elliottii/slash pine*. American Conifer Society. <https://conifersociety.org/conifers/pinus-elliottii/> (accessed 2021-11-22).
- (9) *Pinus elliottii (slash pine)*. CABI. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/41600> (accessed 2021-11-22).
- (10) Arrieta, M. P.; Samper, M. D.; Jiménez-López, M.; Aldas, M.; López, J. Combined Effect of Linseed Oil and Gum Rosin as Natural Additives for PVC. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *99*, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.009>.
- (11) Rodríguez-García, A.; Martín, J. A.; López, R.; Sanz, A.; Gil, L. Effect of Four Tapping Methods on Anatomical Traits and Resin Yield in Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Ind. Crops Prod.* **2016**, *86*, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.033>.
- (12) Forte, M. A. F. Desenvolvimento de Métodos Analíticos Para Controlo de Qualidade de Resinas Naturais. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, 2015.
- (13) Rosa, M. J. S. Caracterização de Amostras de Resina Por GC-MS, RMN e Análise Quimiométrica Composição e Origem. Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, 2014.

- (14) *Resina&Resinagem*. Resipinus Associação de Destiladores e Exploradores de Resina. <https://www.resipinus.pt/resinagem/resina/> (accessed 2021-11-02).
- (15) Kilic Pekgözlü, A.; Ceylan, E. Chemical Composition of Taurus Fir (*Abies cilicica* subsp. *isaurica*) Oleoresin. *Rev. Árvore* **2018**, *42* (1). <https://doi.org/10.1590/1806-90882018000100015>.
- (16) Zinkel, D. F.; Russell, J. *Naval Stores: Production, Chemistry, Utilization*; Pulp Chemicals Association: 60 East 42nd Street New York, NY 10165, 1989.
- (17) Coppen, J. J. W.; Hone, G. A. *Gum Naval Stores: Turpentine and Rosin from Pine Resin*; Non-Wood Forest Products; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, 1995.
- (18) Rodrigues-Corrêa, K.; Rodrigues-Corrêa, S.; De Lima, J.; Fett-Neto, A. Oleoresins from Pine: Production and Industrial Uses. In *Natural Products*; Ramawat, K. G., Mérillon, J. M., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 4038–4059. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_175](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_175).
- (19) Satil, F.; Selvi, S.; Polat, R. Ethnic Uses of Pine Resin Production from *Pinus brutia* by Native People on the Kazdag Mountain (Mt. Ida) in Western Turkey. *J. Food Agric. Environ.* **2011**, *9* (3–4), 1059–1063.
- (20) Smith, P. A.; Bowerbank, C. R.; Lee, M. L.; Solberg, M.; Drown, D. B.; Alexander, W.; Still, K. R. Airborne Aldehydes from Heating Rosin Core Solder and Liquid Rosin Flux to Soldering Temperatures. *AIHAJ J. Sci. Occup. Environ. Health Saf.* **2000**, *61* (1), 95–101. <https://doi.org/10.1080/778879059>.
- (21) Joye, N.; Proveaux, A. T.; Lawrence, R. V. Composition of Neutral Oils from Rosin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1973**, *50* (4), 104–107. <https://doi.org/10.1007/BF02633558>.
- (22) Gören, A. C.; Bilsel, G.; Oztürk, A. H.; Topçu, G. Chemical Composition of Natural Colophony from *Pinus brutia* and Comparison with Synthetic Colophony. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5* (11), 1729–1732. <http://dx.doi.org/10.1177/1934578X1000501105>.
- (23) Pengelly, M. I.; Foster, R. D.; Groves, J. A.; Ellwood, P. A.; Turnbull, G. B.; Wagg, R. M. An Investigation into the Composition of Solder Fume. *Ann. Occup. Hyg.* **1994**, *38* (5), 753–763. <https://doi.org/10.1093/annhyg/38.5.753>.
- (24) Natsir, M.; Nurdin, M.; Ansharullah, A.; Muzakkar, M.; Trimutia, E.; Irwan, I.; Salim, L. O. A.; Salmah, S.; Maulidiyah, M. The Technique for Separation and Purification of Gondorukem (Gum Rosin) from Pine Gum (*Pinus merkusii*) with a Simple Distillation Method. *J. Phys. Conf. Ser.* **2021**, *1899* (1), 012038. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1899/1/012038>.
- (25) Lange, W.; Janežić, T. S.; Spanoudaki, M. J. Cembratrienols and Other Components of White Bark Pine (*Pinus heldreichii*) Oleoresin. *Phytochemistry* **1994**, *36* (5), 1277–1279. <https://doi.org/10.1016/S0031-9422%2800%2989650-8>.
- (26) Pavon, C.; Aldas, M.; Hernández-Fernández, J.; López-Martínez, J. Comparative Characterization of Gum Rosins for Their Use as Sustainable Additives in Polymeric Matrices. *J. Appl. Polym. Sci.* **2022**, *139* (9), e51734. <https://doi.org/10.1002/app.51734>.

- (27) Ma, S.; Jia, R.; Liu, L.; Zhu, Z.; Qiao, X.; Zhang, W.; Zhang, L.; Dong, J. The Adjuvant Effects of Rosin and Coconut Oil on Nicosulfuron and Mesotrione to Control Weeds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *225*, 112766. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112766>.
- (28) Harris, G. C.; Sanderson, T. F. Resin Acids. VII. Isolation and Structure of Isodextropimarinal, a Possible Resin Acid Precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70* (11), 3870–3872. <https://doi.org/10.1021/ja01191a100>.
- (29) Yadav, B. K.; Gidwani, B.; Vyas, A. Rosin: Recent Advances and Potential Applications in Novel Drug Delivery System. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2016**, *31* (2), 111–126. <https://doi.org/10.1177/0883911515601867>.
- (30) *Water white GUM ROSIN*. GUM CHEMICAL. <https://www.gumchemical.com/index.php/homepage/water-white-gum-rosin/?lang=pt-pt> (accessed 2022-02-21).
- (31) Watt, P. R. Molecular Distillation. *Vacuum* **1956**, *6*, 113–160. [https://doi.org/10.1016/0042-207X\(56\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0042-207X(56)90009-4).
- (32) Rodriguez, N. E.; Martinello, M. A. Molecular Distillation Applied to the Purification of Biodiesel from Ethanol and Soybean Oil. *Fuel* **2021**, *296*, 120597. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120597>.
- (33) Johnston, C. *Resin - USDA vs. Gardner scales*. Are.na. <https://www.are.na/block/3948500> (accessed 2021-11-10).
- (34) Gallo Corredor, J.; Sarria Villa, R. A. Obtention of Colophony and Turpentine from Resin of *Pinus oocarpa* Extracted from a Forest in Cauca-Colombia. *J. Cienc. E Ing.* **2014**, *6* (1), 65–69.
- (35) Merillon, J. M.; Ramawat, K. G. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, 1st ed.; Springer reference; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013.
- (36) Mason, L. *Liquid Viscosity – What You Need to Know*. FILAMATIC. <https://www.filamatic.com/blog/liquid-viscosity-what-you-need-to-know/> (accessed 2021-11-24).
- (37) Palkin, S.; Smith, W. C. A New Non-Crystallizing Gum Rosin. *Oil Soap* **1938**, *15* (5), 120–122. <https://doi.org/10.1007/BF02639482>.
- (38) Watkins, S. H. *Rosin and Rosin Size*; TAPPI Monograph Series No.33; Internal Sizing of Paper and Paperboard: Atlanta, GA, 1971.
- (39) Smith, R. W. Mass Spectrometry. In *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)*; Siegel, J. A., Saukko, P. J., Houck, M. M., Eds.; Academic Press: Waltham, 2013; pp 603–608. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00250-6>.
- (40) Ho, C. S.; Lam, C. W. K.; Chan, M. H. M.; Cheung, R. C. K.; Law, L. K.; Lit, L. C. W.; Ng, K. F.; Suen, M. W. M.; Tai, H. L. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev* **2003**, *24* (1), 3–12.

- (41) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *2012*, 282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- (42) Steckel, A.; Schlosser, G. An Organic Chemist's Guide to Electrospray Mass Spectrometric Structure Elucidation. *Molecules* **2019**, *24* (3), 611. <https://doi.org/10.3390/molecules24030611>.
- (43) So, P.-K.; Hu, B.; Yao, Z.-P. Mass Spectrometry: Towards *in vivo* Analysis of Biological Systems. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*(5), 915–929. <https://doi.org/10.1039/c2mb25428j>.
- (44) Stauffer, E.; Dolan, J. A.; Newman, R. CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In *Fire Debris Analysis*; Academic Press: Burlington, 2008; pp 235–293. <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>.
- (45) Kellogg, M. D. Chapter 8 - Measurement of Biological Materials. In *Clinical and Translational Science (Second Edition)*; Robertson, D., Williams, G. H., Eds.; Academic Press, 2017; pp 137–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802101-9.00008-9>.
- (46) Cech, N. B.; Enke, C. G. Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20* (6), 362–387. <https://doi.org/10.1002/mas.10008>.
- (47) Cole, R. B. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470588901>.
- (48) Forgács, E.; Cserhádi, T. 9 - Gas Chromatography. In *Food Authenticity and Traceability*; Lees, M., Ed.; Woodhead Publishing, 2003; pp 197–217. <https://doi.org/10.1533/9781855737181.1.197>.
- (49) Mellon, F. A. MASS SPECTROMETRY | Principles and Instrumentation. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Oxford, 2003; pp 3739–3749. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00746-X>.
- (50) Clarke, W. Chapter 1 - Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: Determining the Need and Avoiding Pitfalls. In *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*, Nair, H., Clarke, W., Eds.; Academic Press: San Diego, 2017; pp 1–15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00001-8>.
- (51) Jabbour, R. E.; Snyder, A. P. 14 - Mass Spectrometry-Based Proteomics Techniques for Biological Identification. In *Biological Identification*; Schaudies, R. P., Ed.; Woodhead Publishing, 2014; pp 370–430. <https://doi.org/10.1533/9780857099167.4.370>.
- (52) Borràs, E.; Pastor, O.; Sabidó, E. Use of Linear Ion Traps in Data-Independent Acquisition Methods Benefits Low-Input Proteomics. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (34), 11649–11653. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01885>.
- (53) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2005.

- (54) Payne, A. H.; Glish, G. L. Tandem Mass Spectrometry in Quadrupole Ion Trap and Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometers. In *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2005; Vol. 402, pp 109–148. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)02004-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)02004-5).
- (55) Pagotto, F.; Reid, A. 9 - Emerging Methods for Foodborne Bacterial Subtyping. In *Tracing Pathogens in the Food Chain*; Brul, S., Fratamico, P. M., McMeekin, T. A., Eds.; Woodhead Publishing, 2011; pp 181–213. <https://doi.org/10.1533/9780857090508.2.181>.
- (56) McNaught, A. D.; Wilkinson, A. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed.; International Union of Pure and Applied Chemistry: Research Triangle Park, NC, 1997.
- (57) Verma, S.; Santoyo, E. High-Performance Liquid and Ion Chromatography: Separation and Quantification Analytical Techniques for Rare Earth Elements. *Geostand. Geoanalytical Res.* **2007**, *31* (3), 161–184. <https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2007.00842.x>.
- (58) Gika, H.; Kaklamanos, G.; Manesiotes, P.; Theodoridis, G. Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography. In *Encyclopedia of Food and Health*; Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F., Eds.; Academic Press: Oxford, 2016; pp 93–99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00159-8>.
- (59) Doran, P. M. 10 - Unit Operations. In *Bioprocess Engineering Principles*; Doran, P. M., Ed.; Academic Press: London, 1995; pp 218–253. <https://doi.org/10.1016/B978-012220855-3/50010-9>.
- (60) Spangler, G. Relationships for Modeling the Performance of Rectangular Gas Chromatographic Columns. *J. Microcolumn Sep.* **2001**, *13* (7), 285–292. <https://doi.org/10.1002/mcs.10008>.
- (61) Maurer, H. H.; Pflieger, K.; Weber, A. A. *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants, and Their Metabolites*, 5th ed.; John Wiley & Sons, 2016.
- (62) Braithwaite, A.; Smith, F. J. *Chromatographic Methods*, 5th ed.; Springer Dordrecht, 1999. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0599-6>.
- (63) Grob, R. L.; Barry, E. F. *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2004; Vol. 126.
- (64) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed.; Saunders golden sunburst series; Philadelphia: Saunders College Pub.: Orlando, 1998.
- (65) Bicchi, C. ESSENTIAL OILS | Gas Chromatography. In *Encyclopedia of Separation Science*; Wilson, I. D., Ed.; Academic Press: Oxford, 2000; pp 2744–2755. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/02471-6>.
- (66) *Solid Phase Microextraction (SPME)*. MERCK. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/applications/analytical-chemistry/sample-preparation/solid-phase-microextraction> (accessed 2022-02-03).
- (67) Sparkman, O. D.; Penton, Z. E.; Kitson, F. G. Chapter 2 - Gas Chromatography. In *Gas Chromatography and Mass Spectrometry (Second Edition)*; Sparkman, O. D., Penton, Z. E., Kitson, F. G., Eds.; Academic Press: Amsterdam, 2011; pp 15–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12->

373628-4.00002-2.

- (68) Gong, X.; Lu, D.; Hower, D.; Gulbinski, J.; Cavagnino, D.; Cojocariu, C. Analytical Solutions for Challenges in Headspace GC-MS Analysis of Volatile Extractable and Leachable Compounds. *ThermoFisher Scientific*. 2019, pp 1–8.
- (69) Spietelun, A.; Kloskowski, A.; Chrzanowski, W.; Namieśnik, J. Understanding Solid-Phase Microextraction: Key Factors Influencing the Extraction Process and Trends in Improving the Technique. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1667–1685. <https://doi.org/10.1021/cr300148j>.
- (70) Al-Khshemawee, H.; Du, X.; Agarwal, M.; Yang, J. O.; Ren, Y. L. Application of Direct Immersion Solid-Phase Microextraction (DI-SPME) for Understanding Biological Changes of Mediterranean Fruit Fly (*Ceratitis capitata*) During Mating Procedures. *Molecules* **2018**, *23* (11), 2951. <https://doi.org/10.3390/molecules23112951>.
- (71) Weggler, B. A.; Gruber, B.; Teehan, P.; Jaramillo, R.; Dorman, F. L. Chapter 5 - Inlets and Sampling. In *Separation Science and Technology*, Snow, N. H., Ed.; Academic Press, 2020; Vol. 12, pp 141–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813745-1.00005-2>.
- (72) Vas, G.; Vékey, K. Solid-Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39* (3), 233–254. <https://doi.org/10.1002/jms.606>.
- (73) *A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC*; Restek Chromatography Products and Solutions: Bellefonte, PA, 2000.
- (74) Rieley, G. Derivatization of Organic Compounds Prior to Gas Chromatographic–Combustion–Isotope Ratio Mass Spectrometric Analysis: Identification of Isotope Fractionation Processes. *Analyst* **1994**, *119*, 915–919. <https://doi.org/10.1039/AN9941900915>.
- (75) Asmatulu, R. *Introduction to Nanotechnology, Class Text Notes*; Wichita State University, 2017.
- (76) Gurusurthy, B. R.; Ramesh, K. P. Application of Scanning Electron Microscopy and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy to Study Surface Design and Chemical Group Components of Merino Wool, Paschmina and Angora Fibers. *Curr. Trends. Fashion. Technol. Text. Eng.* **2018**, *3* (2), 30–40. <https://doi.org/10.19080>.
- (77) Petit, S.; Madejova, J. Chapter 2.7 - Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In *Handbook of Clay Science*; Bergaya, F., Lagaly, G., Eds.; Developments in Clay Science; Elsevier, 2013; Vol. 5, pp 213–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-098259-5.00009-3>.
- (78) Titus, D.; Samuel, E. J. J.; Roopan, S. M. Chapter 12 - Nanoparticle Characterization Techniques. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*; Shukla, A. K., Iravani, S., Eds.; Micro and Nano Technologies; Elsevier, 2019; pp 303–319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>.
- (79) Taha, M.; Hassan, M.; Essa, S.; Tartor, Y. Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Spectroscopy for Rapid and Accurate Identification of Yeasts Isolated from Human and Animals. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **2013**, *1* (1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.03.001>.



- (80) Larkin, P. Chapter 3 - Instrumentation and Sampling Methods. In *Infrared and Raman Spectroscopy*, Larkin, P., Ed.; Elsevier: Oxford, 2011; pp 27–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386984-5.10003-5>.
- (81) Subramanian, A.; Rodriguez-Saona, L. Chapter 7 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*; Sun, D.-W., Ed.; Academic Press: San Diego, 2009; pp 145–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374136-3.00007-9>.
- (82) Ausili, A.; Sánchez, M.; Gómez-Fernández, J. Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy: A Powerful Method for the Simultaneous Study of Structure and Spatial Orientation of Lipids and Membrane Proteins. *Biomed. Spectrosc. Imaging* **2015**, *4* (2), 159–170. <https://doi.org/10.3233/BSI-150104>.
- (83) Raffa, P.; Korving, L.; Picchioni, F. *Characterisation of Polyelectrolytes for Sludge Dewatering*; STOWA 2017-24.
- (84) Alves, J. Aplicação de Técnicas de RMN em Solução ao Estudo de Sistemas Químicos e Biológicos. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, 2010.
- (85) *Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy*. Course Hero. <https://www.coursehero.com/sg/organic-chemistry/nuclear-magnetic-resonance-nmr-spectroscopy/> (accessed 2021-11-05).
- (86) Larive, C. K.; Barding, G. A. J.; Dinges, M. M. NMR Spectroscopy for Metabolomics and Metabolic Profiling. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (1), 133–146. <https://doi.org/10.1021/ac504075g>.
- (87) Markley, J. L.; Brüschweiler, R.; Edison, A. S.; Eghbalnia, H. R.; Powers, R.; Raftery, D.; Wishart, D. S. The Future of NMR-Based Metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *43*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>.
- (88) Koenig, J. L. Chapter 7 - Applications of High-Resolution Solution NMR. In *Spectroscopy of Polymers (Second Edition)*; Koenig, J. L., Ed.; Elsevier Science: New York, 1999; pp 315–351. <https://doi.org/10.1016/B978-044410031-3/50007-4>.
- (89) Contreras-Guzman, E.; Strong, F. C. Determination of Tocopherols (Vitamin E) by Reduction of Cupric Ion. *J. AOAC Int.* **1982**, *65* (5), 1215–1221. <https://doi.org/10.1093/JAOAC%2F65.5.1215>.
- (90) Kedare, S. B.; Singh, R. P. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, *48* (4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.
- (91) Gajić, I.; Stanojević, L.; Tačić, A.; Stanojević, J.; Nikolic, L.; Nikolic, V.; Savić, V. The Chemical Composition of the Essential Oil and Volatile Compounds from Caraway Fruit (*Carum carvi* L.) Extracted by Headspace-Solid Phase Microextraction and the Antioxidant Activity. *Adv. Technol.* **2020**, *9* (1), 37–43. <https://doi.org/10.5937/savteh2001037G>.
- (92) Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.

- (93) Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- (94) Ericsson, H. M.; Sherris, J. C. Antibiotic Sensitivity Testing. Report of an International Collaborative Study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B] Microbiol. Immunol.* **1971**, *217*, Suppl 217:1+.
- (95) Jorgensen, J. H.; Turnidge, J. D. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion. In *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology: Washington DC, 2007; pp 1152–1172.
- (96) Jorgensen, J. H.; Ferraro, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2009**, *49* (11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>.
- (97) Sellimi, S.; Maalej, H.; Rekik, D. M.; Benslima, A.; Ksouda, G.; Hamdi, M.; Sahnoun, Z.; Li, S.; Nasri, M.; Hajji, M. Antioxidant, Antibacterial and *in vivo* Wound Healing Properties of Laminaran Purified from *Cystoseira barbata* Seaweed. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *119*, 633–644. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.171>.
- (98) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition*, 10th ed.; CLSI document M07-A10; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2015; Vol. 35.
- (99) Lubber, P.; Bartelt, E.; Genschow, E.; Wagner, J.; Hahn, H. Comparison of Broth Microdilution, E Test, and Agar Dilution Methods for Antibiotic Susceptibility Testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41* (3), 1062–1068. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1062-1068.2003>.
- (100) Schumacher, A.; Vranken, T.; Malhotra, A.; Arts, J. J. C.; Habibovic, P. *In vitro* Antimicrobial Susceptibility Testing Methods: Agar Dilution to 3D Tissue-Engineered Models. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **2018**, *37* (2), 187–208. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3089-2>.
- (101) Cheikh-Rouhou, S.; Hentati, B.; Besbes, S.; Blecker, C.; Deroanne, C.; Attia, H. Chemical Composition and Lipid Fraction Characteristics of Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Mill.) Seeds Cultivated in Tunisia. *Food Sci. Technol. Int.* **2006**, *12* (5), 407–415. <https://doi.org/10.1177/1082013206069910>.
- (102) Piispanen, R.; Saranpää, P. Neutral Lipids and Phospholipids in Scots Pine (*Pinus sylvestris*) Sapwood and Heartwood. *Tree Physiol.* **2002**, *22* (9), 661–666. <https://doi.org/10.1093/treephys/22.9.661>.
- (103) Nasri, N.; Khaldi, A.; Fady, B.; Triki, S. Fatty Acids from Seeds of *Pinus pinea* L.: Composition and Population Profiling. *Struct. Elucidation* **2005**, *66* (14), 1729–1735. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.05.023>.
- (104) Semenova, N. V.; Makarenko, S. P.; Shmakov, V. N.; Konstantinov, Yu. M.; Dudareva, L. V. Fatty Acid Composition of Total Lipids from Needles and Cultured Calluses of Conifers *Pinus sylvestris* L., *Picea pungens* Engelm., *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc., and *Larix sibirica* Ledeb. *Biochem.*



- Mosc. Suppl. Ser. Membr. Cell Biol.* **2017**, *11* (4), 287–295.  
<https://doi.org/10.1134/S1990747817040092>.
- (105) Fidan, H.; Stankov, S.; Stoyanova, M.; Petkova, Z.; Petkova, N.; Stoyanova, A.; Ercisli, S.; Choudhary, R.; Karunakaran, R. Chemical Composition of *Pinus nigra* Arn. Unripe Seeds from Bulgaria. *Plants* **2022**, *11* (3), 245. <https://doi.org/10.3390/plants11030245>.
- (106) Sezik, E.; Ustun, O.; Demirci, B.; Baser, K. H. C. Composition of the Essential Oil of *Pinus nigra* Arnold from Turkey. *Turk. J. Chem.* **2010**, *34*(2), 313–325. <https://doi.org/10.3906/kim-0903-39>.
- (107) Dzedzinski, M.; Kobus-Cisowska, J.; Szymanowska, D.; Stuper-Szablewska, K.; Baranowska, M. Identification of Polyphenols from Coniferous Shoots as Natural Antioxidants and Antimicrobial Compounds. *Molecules* **2020**, *25*(15), 3527. <https://doi.org/10.3390/molecules25153527>.
- (108) Ku, C. S.; Mun, S. P. Antioxidant Properties of Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Fractions in Hot Water Extract from *Pinus radiata* Bark. *Wood Sci. Technol.* **2008**, *42* (1), 47–60. <https://doi.org/10.1007/s00226-007-0150-9>.
- (109) Ferreira-Santos, P.; Genisheva, Z.; Pereira, R. N.; Teixeira, J. A.; Rocha, C. M. R. Moderate Electric Fields as a Potential Tool for Sustainable Recovery of Phenolic Compounds from *Pinus pinaster* Bark. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (9), 8816–8826. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00780>.
- (110) Willför, S.; Ali, M.; Karonen, M.; Reunanen, M.; Arfan, M.; Harlamow, R. Extractives in Bark of Different Conifer Species Growing in Pakistan. **2009**, *63* (5), 551–558. <https://doi.org/10.1515/HF.2009.095>.
- (111) Kaundun, S. S.; Fady, B.; Lebreton, P. Genetic Differences between *Pinus halepensis*, *Pinus brutia* and *Pinus eldarica* Based on Needle Flavonoids. *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, *25* (6), 553–562. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(97\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(97)00049-5).
- (112) Shahat, A. A.; Marzouk, M. S. 13 - Tannins and Related Compounds from Medicinal Plants of Africa. In *Medicinal Plant Research in Africa*; Kuete, V., Ed.; Elsevier: Oxford, 2013; pp 479–555. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00013-8>.
- (113) Lantto, T. A.; Dorman, H. J. D.; Shikov, A. N.; Pozharitskaya, O. N.; Makarov, V. G.; Tikhonov, V. P.; Hiltunen, R.; Raasmaja, A. Chemical Composition, Antioxidative Activity and Cell Viability Effects of a Siberian Pine (*Pinus sibirica* Du Tour) Extract. *Food Chem.* **2009**, *112* (4), 936–943. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.008>.
- (114) Matilainen, A.; Gjessing, E. T.; Lahtinen, T.; Hed, L.; Bhatnagar, A.; Sillanpää, M. An Overview of the Methods Used in the Characterisation of Natural Organic Matter (NOM) in Relation to Drinking Water Treatment. *Chemosphere* **2011**, *83* (11), 1431–1442. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.018>.
- (115) Altameme, H.; Hameed, I.; Idan, S. Artemisia Annu: Biochemical Products Analysis of Methanolic Aerial Parts Extract and Anti-Microbial Capacity. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **2016**, *7* (2), 1843–1868.

- (116) Al-Marzoqi, A.; Hadi, M.; Hameed, I. Determination of Metabolites Products by *Cassia angustifolia* and Evaluate Antimicrobial Activity. *J. Pharmacogn. Phytother.* **2016**, *8* (2), 25–48. <https://doi.org/10.5897/JPP2015.0367>.
- (117) Shareef, H.; Haidar, J.; Hussein, H.; Hameed, I. Antibacterial Effect of Ginger (*Zingiber officinale*) Roscoe and Bioactive Chemical Analysis Using Gas Chromatography Mass Spectrum. *Orient. J. Chem.* **2016**, *32* (2), 817–837. <https://doi.org/10.13005/ojc/320207>.
- (118) Catauro, M.; Papale, F.; Bollino, F.; Piccolella, S.; Marciano, S.; Nocera, P.; Pacifico, S. Silica/Quercetin Sol-Gel Hybrids as Antioxidant Dental Implant Materials. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, *16* (3), 035001–035001. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/035001>.
- (119) Maoela, M.; Arotiba, O.; Baker, P.; Mabusela, W.; Jahed, N.; Songa, E.; Iwuoha, E. Electroanalytical Determination of Catechin Flavonoid in Ethyl Acetate Extracts of Medicinal Plants. *Int J Electrochem Sci Int. J.* **2009**, *4* (11), 1497–1510.
- (120) Telange, D.; Patil, A.; Pethe, A.; Tatode, A.; Sridhar, A.; Dave, V. Kaempferol-Phospholipid Complex: Formulation, and Evaluation of Improved Solubility, *in vivo* Bioavailability, and Antioxidant Potential of Kaempferol. *J. Excip. Food Chem.* **2016**, *7* (4), 89.
- (121) Meehan-Atrash, J.; Strongin, R. M. Pine Rosin Identified as a Toxic Cannabis Extract Adulterant. *Forensic Sci. Int.* **2020**, *312*, 110301. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110301>.
- (122) Sarria-Villa, R. A.; Gallo-Corredor, J. A.; Benitez-Benitez, R. Characterization and Determination of the Quality of Rosins and Turpentine Extracted from *Pinus oocarpa* and *Pinus patula* Resin. *Heliyon* **2021**, *7* (8), e07834. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07834>.

Anexos

## A) Procedimentos laboratoriais

### A.1) Determinação do índice de acidez

Norma de referência: ASTM D 463

Material e equipamento:

- Balança analítica Mettler Toledo ( $\pm 0,0001$  g);
- Espátula;
- Pipeta de Pasteur;
- Balão Erlenmeyer de vidro neutro de 250 mL;
- Proveta de 25 mL ( $\pm 0,25$  mL);
- Bureta automática graduada de 25 mL ( $\pm 0,045$  mL).

Reagentes:

- Solução alcoólica de KOH (0,1 N);
- Solução alcoólica de fenolftaleína 1%;
- Etanol.

Procedimento:

- 1) Medir 25 mL de etanol na proveta e transferir o volume medido para o balão Erlenmeyer;
- 2) Adicionar 3 gotas de solução de fenolftaleína (indicador);
- 3) Adicionar a solução alcoólica de KOH contida na bureta ao balão até se obter uma cor rosa;
- 4) Pesar a amostra no balão. A massa a ser pesada depende do índice de acidez esperado da amostra, esta informação é consultada na **Tabela 23**.
- 5) Esperar que a amostra se dissolva completamente;
- 6) Titular a amostra com a solução alcoólica de KOH até se obter uma cor rosa que persista por 15 s (ponto de viragem) e registrar o volume gasto na titulação;
- 7) Calcular o índice de acidez de acordo com a equação 1:

$$\text{(Equação 1)} \quad \text{Índice de acidez} = \frac{56,11 \times v \times N}{g}$$

**Tabela 23:** Massa de amostra de colofônia a pesar em função do índice de acidez.

<b>Índice de acidez esperado na amostra (mg<sub>(KOH)</sub>/g<sub>(amostra)</sub>)</b>	<b>Massa de amostra a pesar (g)</b>
> 100	0,2–0,5
80 < IA < 100	0,5–0,8
40 < IA < 80	0,8–2
10 < IA < 40	2–3
3 < IA < 10	3–5
1 < IA < 3	5–15
< 1	15–20

## **A.2) Determinação da cor**

Norma de referência: ASTM D 1544

Material e equipamento:

- Colorímetro Lovibond 3-FIELD;
- Tubo de ensaio de vidro neutro vol. 7 mL 12x100 mm com tampa de silicone;
- Balança analítica Mettler Toledo ( $\pm 0,0001$  g);
- Pipeta de Pasteur;
- Espátula.

Reagentes:

- Tolueno

Procedimento:

- 1) Pesar 2 g de amostra para um tubo de ensaio;
- 2) Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur adicionar 2 g de tolueno ao tubo de ensaio;
- 3) Rolhar o tubo e agitá-lo até que a amostra esteja completamente dissolvida;
- 4) Introduzir o tubo de ensaio no colorímetro (**Figura 98**), procurar o disco de padrões mais adequado no colorímetro e comparar a cor da solução com as dos padrões de referência;
- 5) Escolher o padrão cuja cor mais se assemelha à da amostra ou, caso isso não seja possível, escolher o intervalo de cores mais próximo possível da cor da solução do tubo de ensaio.



**Figura 98:** Fotografia do colorímetro.

### **A.3) Determinação da viscosidade**

Norma de referência: ASTM D 2196 – 99

Material e equipamento:

- Balança analítica Mettler Toledo ( $\pm 0,0001$  g);
- Espátula;
- Viscosímetro Brookfield DV-E;
- Banho termostático - *Termosef*;
- *Spindle*;
- Cuba metálica.

Procedimento:

- 1) Pesar 8 g da amostra a analisar para a cuba;
- 2) Selecionar a temperatura pretendida no *Termosef*. Colocar a cuba dentro do *Termosef* e, no caso da amostra ser sólida, aguardar alguns minutos para que a amostra amoleça;
- 3) Selecionar o *spindle* de acordo com a gama de viscosidade da amostra;
- 4) Ligar o equipamento, colocar o *spindle* adequado e selecionar a velocidade de rotação e o *spindle* no viscosímetro;
- 5) Iniciar a leitura da viscosidade utilizando a velocidade mais baixa (0,3 rpm). Aumentar gradualmente a velocidade até àquela cuja gama de trabalho melhor se ajuste ao valor de viscosidade apresentada no viscosímetro em cP;
- 6) Esperar até que o valor de viscosidade lido no equipamento estabilize. O valor é considerado estabilizado quando a viscosidade não varia significativamente durante, pelo menos, 10 min. Registrar o resultado.

#### **A.4) Determinação da cristalização**

##### Material e equipamento:

- Balança analítica Mettler Toledo ( $\pm 0,0001$  g);
- Espátula;
- Tubo de fundo redondo com rolha em rosca;
- Suporte para tubos;
- Pipeta de Pasteur.

##### Reagentes:

- Acetona pura

##### Procedimento:

- 1) Pesar a quantidade de amostra necessária, dependendo da razão de amostra/acetona, de modo a perfazer um total de 20 g. Para uma razão de 50:50 pesa-se 10 g de amostra e 10 g de acetona e para uma razão de 70:30 pesa-se 14 g de amostra e 6 g de acetona;
- 2) Quando a razão é de 50:50 rolha-se o tubo e agita-se até dissolver completamente. Reserva-se o tubo no suporte e começa-se a contar o tempo de ensaio observando-se a solução a intervalos de tempo regulares (primeiros 30 min: observar de 5 em 5 min, dos 30 aos 90 min: observar de 15 em 15 min e dos 90 min às 4 h: observar de 30 em 30 min);
- 3) Quando a razão é de 70:30 rolha-se o tubo, coloca-se o tubo no suporte sem que ocorra agitação e começa-se a contar o tempo de ensaio, observando-se a solução de 12 em 12 h até perfazer as 72 h de ensaio;
- 4) Ao longo do decorrer do ensaio se tiver ocorrido formação de cristais, precipitação ou turvação na solução descreve-se o resultado como “cristalizou”. Se nenhuma destas situações tiver ocorrido até ao final do tempo do ensaio o resultado é descrito como “não cristalizou”.

#### **A.5) Determinação do ponto de amolecimento**

Norma de referência: ASTM E 28

##### Material e equipamento:

- Espátula metálica;
- Cadinho de porcelana;

- Placa de aquecimento;
- Gobelé de 600 mL;
- Equipamento *Normalab* NBA440;
- Duas argolas com 19,8 mm de diâmetro;
- Duas esferas de aço com 9,53 mm de diâmetro e com massa de 3,45 g a 3,55 g;

Reagentes:

- Glicerina

Procedimento:

- 1) Introduzir uma determinada quantidade da amostra para um cadinho de porcelana e colocar o cadinho por cima da placa de aquecimento. Esperar que a amostra funda;
- 2) Quando a resina estiver fundida encher as duas argolas colocadas sobre uma superfície horizontal lisa, previamente revestida com glicerina para que as argolas não adiram à superfície;
- 3) Após o arrefecimento, nivelar as argolas com auxílio de uma espátula metálica, previamente aquecida na placa de aquecimento;
- 4) Colocar as argolas nos olhais do suporte metálico do equipamento *Normalab* NBA440 e colocar as guias existentes no suporte do equipamento e uma esfera na parte central das argolas de resina;
- 5) Deitar glicerina no gobelé e instalar o suporte, o agitador e a sonda de temperatura do equipamento nos seus devidos lugares (**Figura 99**);
- 6) Selecionar o método a utilizar no equipamento dependendo do fluido a utilizar. Ao longo do tempo vai ocorrer um aquecimento gradual do fluido a 5°C/min;
- 7) Esperar que a resina das argolas amoleça e, com o peso das esferas, tomem a forma de saco. Quando o ponto mais baixo de cada um dos sacos atinge a barra metálica inferior do suporte (flecha) o ensaio é dado como terminado e o equipamento regista os valores de temperatura ao qual as esferas atingiram a flecha;
- 8) Calcular o ponto de amolecimento através da média das duas temperaturas obtidas.





**Figura 99:** Fotografia do início do ensaio do ponto de amolecimento.

### **A.6) Determinação do ponto de turvação**

Norma de referência: ASTM D 6038

Material e equipamento:

- Balança analítica Mettler Toledo ( $\pm 0,0001$  g);
- Espátula;
- Chemotronic Cool da Novomatics;
- Tubo de ensaio de vidro do equipamento Chemotronic Cool;
- Agitador magnético.

Reagentes:

- *Test oil*/PKWF 6/9 AF

Procedimento:

- 1) Pesar 2 g de amostra para um tubo de vidro e adicionar 18 g *do Test oil*;
- 2) Colocar o agitador magnético no interior do tubo de ensaio. Inserir o tubo no equipamento Chemotronic Cool e introduzir a sonda de temperatura no tubo (**Figura 100**);
- 3) Ligar o equipamento e o respetivo *software*;

- 4) Esperar, aproximadamente, 20 min para o ensaio terminar. Ao fim do ensaio forma-se um gráfico no computador e é indicado o valor do ponto de turvação em °C.



**Figura 100:** Fotografia do equipamento Chemotronic Cool utilizado no ensaio do ponto de turvação.

## **B) Fichas de segurança dos reagentes**

### **B.1) Ficha de segurança do Hidróxido de potássio**

#### Classificação e rotulagem de perigo:

- Irritante/nocivo;
- Corrosivo.

#### Advertências de perigo:

- H290 - pode ser corrosivo para os metais;
- H302 - nocivo por ingestão;
- H314 - provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

#### Recomendações de prudência – prevenção:

- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

#### Medidas de primeiros socorros:

- Retirar imediatamente todo o vestuário contaminado. Autoproteção do socorrista;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: lavar imediata e abundantemente com água. É necessário tratamento médico imediato, uma vez que as queimaduras químicas podem levar a feridas de cura difícil;
- Após contacto com os olhos: lavar de imediato com bastante água corrente mantendo as pálpebras

abertas e consultar um oftalmologista. Proteger o olho não atingido;

- Após ingestão: enxaguar imediatamente a boca e beber muita água. Lavar repetidamente a boca com água (apenas se a vítima estiver consciente). Contactar imediatamente o médico. Em caso de ingestão, existe risco de perfuração do esófago e do estômago (efeito corrosivo forte). Contactar um médico.

#### Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral. Usar proteção facial;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há desenvolvimento de poeiras.

## **B.2) Ficha de segurança da Fenolftaleína**

#### Classificação e rotulagem de perigo:

- Mutagénico/carcinogénico.

#### Advertências de perigo:

- H341 - suspeito de provocar anomalias genéticas;
- H350 - pode provocar cancro;
- H361f - suspeito de afetar a fertilidade.

#### Recomendações de prudência – prevenção:

- P201 - pedir instruções específicas antes da utilização;
- P261 - evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis;
- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

#### Medidas de primeiros socorros:

- Retirar a roupa contaminada;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: enxaguar a pele com água/tomar um duche;
- Após contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários min. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;

- Após ingestão: enxaguar a boca. Deixar beber água em pequenos goles (efeito de diluição). Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

#### Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há desenvolvimento de poeiras.

### **B.3) Ficha de segurança do Etanol**

#### Classificação e rotulagem de perigo:

- Inflamável;
- Irritante/nocivo.

#### Advertências de perigo:

- H225 - líquido e vapor facilmente inflamáveis;
- H319 - provoca irritação ocular grave.

#### Recomendações de prudência – prevenção:

- P210 - manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar;
- P233 - manter o recipiente bem fechado.

#### Medidas de primeiros socorros:

- Retirar a roupa contaminada;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: enxaguar a pele com água/tomar um duche. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com os olhos: Irrigar os olhos com água corrente limpa durante pelo menos 10 min mantendo as pálpebras abertas. Em caso de irritação ocular, consultar o oftalmologista;
- Após ingestão: enxaguar a boca. Caso sinta indisposição contactar um médico.

#### Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de aerossol ou névoa.

#### **B.4) Ficha de segurança do Tolueno**

##### Classificação e rotulagem de perigo:

- Inflamável;
- Irritante/nocivo;
- Mutagénico/carcinogénico.

##### Advertências de perigo:

- H225 - líquido e vapor facilmente inflamáveis;
- H304 - pode ser mortal por ingestão e penetração nas vias respiratórias;
- H315 - provoca irritação cutânea;
- H336 - pode provocar sonolência ou vertigens;
- H361d - suspeito de afetar o feto;
- H373 - pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.

##### Recomendações de prudência – prevenção:

- P210 - manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar;
- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

##### Medidas de primeiros socorros:

- Retirar a roupa contaminada;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: enxaguar a pele com água/tomar um duche. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se

surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;

- Após ingestão: Contacte imediatamente o médico. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

#### Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de aerossol ou névoa.

### **B.5) Ficha de segurança da Acetona**

#### Classificação e rotulagem de perigo:

- Inflamável;
- Irritante/nocivo.

#### Advertências de perigo:

- H225 - líquido e vapor facilmente inflamáveis;
- H319 - provoca irritação ocular grave;
- H336 - pode provocar sonolência ou vertigens.

#### Recomendações de prudência – prevenção:

- P210 - manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.

#### Medidas de primeiros socorros:

- Retirar a roupa contaminada;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: enxaguar a pele com água/tomar um duche;
- Após contacto com os olhos: irrigar os olhos com água corrente limpa durante pelo menos 10 min mantendo as pálpebras abertas. Em caso de irritação ocular, consultar o oftalmologista;
- Após ingestão: enxaguar a boca. Caso sinta indisposição contacte um médico.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de aerossol ou névoa.

**B.6) Ficha de segurança do *Test oil*/PKWF 6/9 AF**

Classificação e rotulagem de perigo:

- Mutagénico/carcinogénico.

Advertências de perigo:

- H304 - pode ser mortal por ingestão e penetração nas vias respiratórias.

Recomendações de prudência - prevenção:

- P405 - armazenar o recipiente fechado;
- P501 - descartar o conteúdo/recipiente de acordo com as regulações locais/regionais/nacionais/internacionais.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas.

**B.7) Ficha de segurança do *Ácido acético glacial***

Classificação e rotulagem de perigo:

- Inflamável;
- Corrosivo.

Advertências de perigo:

- H226 - líquido e vapor inflamáveis;
- H314 - provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

Recomendações de prudência – prevenção:

- P210 - manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de

ignição. Não fumar;

- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

#### Medidas de primeiros socorros:

- Retirar imediatamente todo o vestuário contaminado;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: lavar imediata e abundantemente com água. É necessário tratamento médico imediato, uma vez que as queimaduras químicas podem levar a feridas de cura difícil;
- Após contacto com os olhos: lavar de imediato com bastante água corrente mantendo as pálpebras abertas e consultar um oftalmologista. Proteger o olho não atingido;
- Após ingestão: enxaguar imediatamente a boca e beber muita água. Contactar imediatamente o médico.

#### Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral. Usar proteção facial;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de aerossol ou névoa.

### **B.8) Ficha de segurança do Acetonitrilo**

#### Classificação e rotulagem de perigo:

- Inflamável;
- Irritante/nocivo.

#### Advertências de perigo:

- H225 - líquido e vapor facilmente inflamáveis;
- H302+H312+H332 - nocivo por ingestão, contacto com a pele ou inalação;
- H319 - provoca irritação ocular grave.

#### Recomendações de prudência – prevenção:

- P210 - manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar;



- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

#### Medidas de primeiros socorros:

- Retirar a roupa contaminada;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: enxaguar a pele com água/tomar um duche. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com os olhos: irrigar os olhos com água corrente limpa durante pelo menos 10 min mantendo as pálpebras abertas. Em caso de irritação ocular, consultar o oftalmologista;
- Após ingestão: lavar repetidamente a boca com água (apenas se a vítima estiver consciente). Contactar um médico.

#### Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de aerossol ou névoa.

### **B.9) Ficha de segurança do Metanol**

#### Classificação e rotulagem de perigo:

- Inflamável;
- Tóxico;
- Mutagénico/carcinogénico.

#### Advertências de perigo:

- H225 - líquido e vapor facilmente inflamáveis;
- H301+H311+H331 - tóxico por ingestão, contacto com a pele ou inalação;
- H370 - afeta os órgãos (sistema nervoso central).

#### Recomendações de prudência – prevenção:

- P210 - manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar;

- P270 - não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto;
- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Medidas de primeiros socorros:

- Retirar imediatamente todo o vestuário contaminado;
- Após inalação: contactar imediatamente o médico. Em caso de dificuldade respiratória ou paragem respiratória iniciar respiração artificial;
- Após contacto com a pele: lavar imediata e abundantemente com água;
- Após contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários min. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após ingestão: enxaguar imediatamente a boca e beber muita água. Contactar imediatamente o médico.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de aerossol ou névoa.

## **B.10) Ficha de segurança do Éter etílico**

Classificação e rotulagem de perigo:

- Inflamável;
- Irritante/nocivo.

Advertências de perigo:

- H224 - líquido e vapor extremamente inflamáveis;
- H302 - nocivo por ingestão;
- H336 - pode provocar sonolência ou vertigens.

Recomendações de prudência – prevenção:

- P210 - manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar;
- P243 - tomar medidas para evitar acumulação de cargas eletrostáticas;

- P261 - evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

#### Medidas de primeiros socorros:

- Retirar a roupa contaminada;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: enxaguar a pele com água/tomar um duche;
- Após contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários min. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após ingestão: Lavar repetidamente a boca com água (apenas se a vítima estiver consciente). Contactar imediatamente o médico.

#### Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de aerossol ou névoa.

### **B.11) Ficha de segurança do Hidróxido de sódio**

#### Classificação e rotulagem de perigo:

- Corrosivo.

#### Advertências de perigo:

- H290 - pode ser corrosivo para os metais;
- H314 - provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

#### Recomendações de prudência – prevenção:

- P233 - manter o recipiente bem fechado;
- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

#### Medidas de primeiros socorros:

- Retirar imediatamente todo o vestuário contaminado;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;

- Após contacto com a pele: lavar imediata e abundantemente com água;
- Após contacto com os olhos: lavar de imediato com bastante água corrente mantendo as pálpebras abertas e consultar um oftalmologista;
- Após ingestão: Enxaguar imediatamente a boca e beber muita água. Contactar imediatamente o médico.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral. Usar proteção facial;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há desenvolvimento de poeiras.

**B.12) Ficha de segurança do Clorofórmio deuterado**

Classificação e rotulagem de perigo:

- Irritante/nocivo;
- Mutagénico/carcinogénico.

Advertências de perigo:

- H302 - nocivo por ingestão;
- H315 - provoca irritação cutânea;
- H351 - suspeito de provocar cancro;
- H373 - pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.

Recomendações de prudência – prevenção:

- P202 - não manusear o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança;
- P260 - não respirar as névoas/vapores/aerossóis.

Medidas de primeiros socorros:

- Após inalação: contactar imediatamente o médico. Em caso de dificuldade respiratória ou paragem respiratória, iniciar respiração artificial;
- Após contacto com a pele: enxaguar a pele com água/tomar um duche. Em caso de irritações cutâneas, consultar um dermatologista;
- Após contacto com os olhos: irrigar os olhos com água corrente limpa durante pelo menos 10 min

mantendo as pálpebras abertas. Em caso de irritação ocular, consultar o oftalmologista;

- Após ingestão: lavar repetidamente a boca com água (apenas se a vítima estiver consciente). Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de aerossol ou névoa.

### **B.13) Ficha de segurança do Dimetilsulfóxido deuterado**

Classificação e rotulagem de perigo:

- Irritante/nocivo.

Advertências de perigo:

- H335 - pode provocar irritação das vias respiratórias.

Recomendações de prudência – prevenção:

- P210 - manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar;
- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Medidas de primeiros socorros:

- Após inalação: proporcionar ar fresco;
- Após contacto com a pele: enxaguar a pele com água/tomar um duche. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após ingestão: enxaguar a boca. Caso sinta indisposição contactar um médico.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;

- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de aerossol ou névoa.

#### **B.14) Ficha de segurança do DPPH**

##### Classificação e rotulagem de perigo:

- Inflamável;
- Mutagénico/carcinogénico;
- Irritante/nocivo.

##### Advertências de perigo:

- H242 - pode incendiar sob ação do calor;
- H302 + H312 + H332 - nocivo se ingerido, em contato com a pele ou se inalado;
- H315 - provoca irritação à pele;
- H317 - pode provocar reações alérgicas na pele;
- H319 - provoca irritação ocular grave;
- H334 - quando inalado pode provocar sintomas alérgicos, de asma ou dificuldades respiratórias.

##### Recomendações de prudência – prevenção:

- P210 - manter afastado do calor/fáscia/chama aberta/superfícies quentes. Não fumar;
- P235 - manter em local fresco;
- P280 - usar luvas protetoras/roupas protetoras/proteção para os olhos/proteção para o rosto/proteção auricular;
- P403 - armazenar em local bem ventilado.

##### Medidas de primeiros socorros:

- Após inalação: exposição ao ar fresco. Chamar imediatamente um médico. Em caso de paragem respiratória proceder imediatamente à ventilação cardiopulmonar, eventualmente administração de oxigénio;
- Após contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche. Consultar um médico;

- Após contacto com os olhos: enxaguar abundantemente com água. Consultar um oftalmologista. Remover as lentes de contato;
- Após ingestão: fazer a vítima beber imediatamente água (dois copos no máximo) Consultar um médico.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de pós.

### **B.15) Ficha de segurança do Hidróxido de tetrametilamónio**

Classificação e rotulagem de perigo:

- Muito tóxico;
- Inflamável.

Advertências de perigo:

- H300 + H310 - fatal se for ingerido ou em contacto com a pele;
- H314 - provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves;
- H370 - afeta os órgãos (sistema nervoso central);
- H372 - afeta os órgãos (fígado, timo) através de exposição prolongada ou repetida com a pele;
- H411 - tóxico para a vida aquática com efeitos a longo prazo.

Recomendações de prudência – prevenção:

- P260 - não respirar as névoas/vapores/aerossóis;
- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Medidas de primeiros socorros:

- Após inalação: exposição ao ar fresco. Chamar imediatamente um médico. Em caso de paragem respiratória proceder imediatamente à ventilação cardiopulmonar, eventualmente administração de oxigénio;

- Após contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche. Consultar um médico;
- Após contacto com os olhos: enxaguar abundantemente com água. Consultar um oftalmologista. Remover as lentes de contato;
- Após ingestão: fazer a vítima beber imediatamente água (dois copos no máximo) Consultar um médico. Apenas em casos excepcionais, se não houver atendimento médico dentro de uma hora induzir o vômito (somente em pessoas bem acordadas e totalmente conscientes), administrar carvão ativado e consultar um médico o mais rápido possível.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de pós.

**B.16) Ficha de segurança do Ácido abiético**

Classificação e rotulagem de perigo:

- Irritante/nocivo;
- Prejudicial para o meio ambiente.

Advertências de perigo:

- H315 - provoca irritação cutânea;
- H319 - provoca irritação ocular grave;
- H335 - pode provocar irritação das vias respiratórias;
- H410 - muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos permanentes.

Recomendações de prudência – prevenção:

- P273 - evitar a libertação para o ambiente;
- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Medidas de primeiros socorros:

- Retirar a roupa contaminada;



- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: lavar com sabonete e abundantemente com água. Em caso de irritações cutâneas consultar um dermatologista;
- Após contacto com os olhos: irrigar os olhos com água corrente limpa durante pelo menos 10 min mantendo as pálpebras abertas. Em caso de irritação ocular, consultar o oftalmologista;
- Após ingestão: enxaguar a boca. Caso sinta indisposição contactar um médico.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de poeiras.

**B.17) Ficha de segurança do Acetato de linalilo**

Classificação e rotulagem de perigo:

- Irritante/nocivo.

Advertências de perigo:

- H315 - provoca irritação cutânea;
- H317 - pode provocar reações alérgicas na pele;
- H319 - provoca irritação ocular grave.

Recomendações de prudência – prevenção:

- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Medidas de primeiros socorros:

- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se não estiver a respirar, aplicar respiração artificial. Consultar um médico se ocorrerem sintomas;
- Após contacto com a pele: lavar imediatamente com bastante água durante, pelo menos, 15 min. Em caso de irritações cutâneas consultar um dermatologista;

- Após contacto com os olhos: irrigar os olhos com água corrente limpa durante pelo menos, 15 min mantendo as pálpebras abertas. Consultar um médico;
- Após ingestão: enxaguar a boca e beber bastante água.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: quando os trabalhadores enfrentam concentrações acima do limite de exposição devem usar respiradores certificados apropriados.

**B.18) Ficha de segurança do 2-amino-1,3,4-octadecanotriol**

Classificação e rotulagem de perigo:

- Irritante/nocivo.

Advertências de perigo:

- H315 - provoca irritação cutânea;
- H319 - provoca irritação ocular grave;
- H413 - pode provocar efeitos nocivos permanentes nos organismos aquáticos.

Recomendações de prudência – prevenção:

- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Medidas de primeiros socorros:

- Após inalação: se for respirado, proporcionar o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico;
- Após contacto com a pele: lavar com sabão e muita água. Consultar um médico;
- Após contacto com os olhos: lavar cuidadosamente com muita água, durante, pelo menos, 15 min, e consultar o médico;
- Após ingestão: nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de poeiras.

**B.19) Ficha de segurança do Hidrato de quercetina**

Classificação e rotulagem de perigo:

- Tóxico.

Advertências de perigo:

- H301 - Tóxico por ingestão.

Recomendações de prudência – prevenção:

- P270 - não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto;
- P405 - armazenar o recipiente fechado;
- P501 - descartar o conteúdo/recipiente de acordo com as regulações locais/regionais/nacionais/internacionais.

Medidas de primeiros socorros:

- Após inalação: expor ao ar fresco;
- Após contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche;
- Após contacto com os olhos: enxaguar abundantemente com água. Remover as lentes de contato;
- Após ingestão: dar água a beber (dois copos no máximo). Consultar um médico imediatamente. Apenas em casos excepcionais, se o cuidado médico não estiver disponível numa hora, induzir o vômito (apenas em pessoas que estejam bem acordadas e conscientes), administrar carvão ativado e consultar o médico assim que possível.

Medidas de proteção individual:

- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;

- Proteção respiratória: é necessária quando há formação de pós.

## **B.20) Ficha de segurança do Hidrato de (+)-catequina**

### Classificação e rotulagem de perigo:

- Irritante/nocivo.

### Advertências de perigo:

- H315 - provoca irritação cutânea;
- H319 - provoca irritação ocular grave;
- H335 - pode provocar irritação das vias respiratórias.

### Recomendações de prudência – prevenção:

- P280 - usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### Medidas de primeiros socorros:

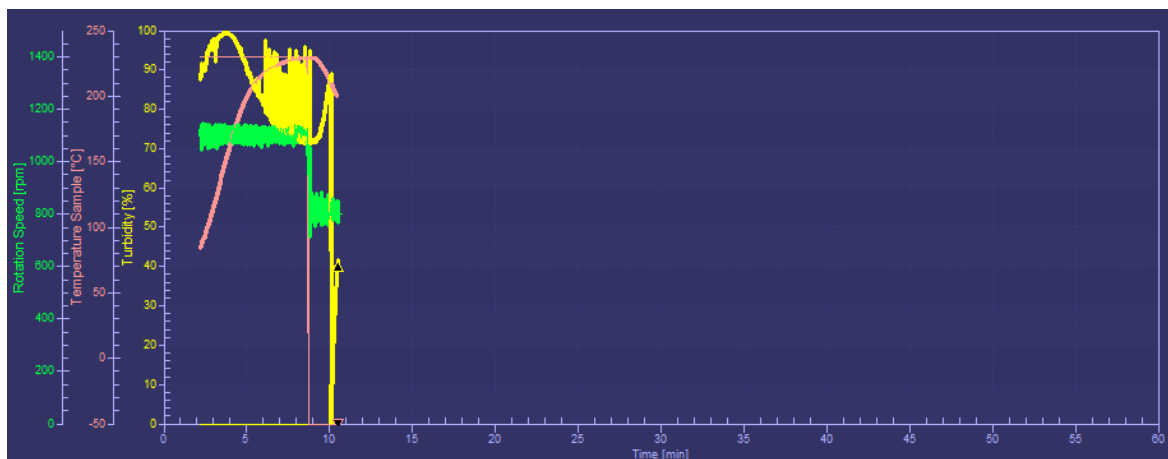
- Retirar a roupa contaminada;
- Após inalação: proporcionar ar fresco. Se surgirem queixas ou em caso de persistência dos sintomas, consultar um médico;
- Após contacto com a pele: enxaguar a pele com água/tomar um duche. Em caso de irritações cutâneas consultar um dermatologista;
- Após contacto com os olhos: irrigar os olhos com água corrente limpa durante, pelo menos, 10 min mantendo as pálpebras abertas. Em caso de irritação ocular, consultar o oftalmologista;
- Após ingestão: enxaguar a boca. Caso sinta indisposição contactar um médico.

### Medidas de proteção individual:

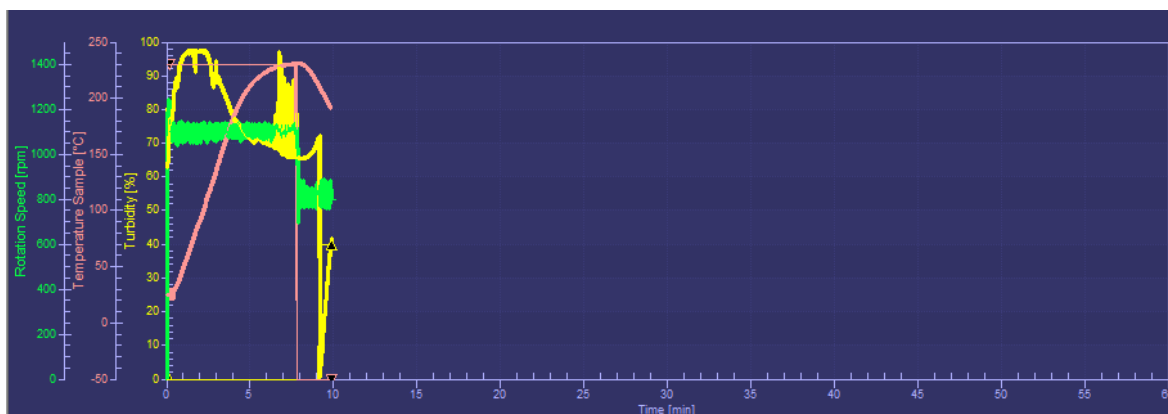
- Proteção ocular/facial: usar óculos de segurança com proteção lateral;
- Proteção das mãos: usar luvas adequadas;
- Proteção respiratória: é necessária quando há desenvolvimento de poeiras.

## C) Resultados experimentais

### C.1) Análises da qualidade de amostras de *pitch*

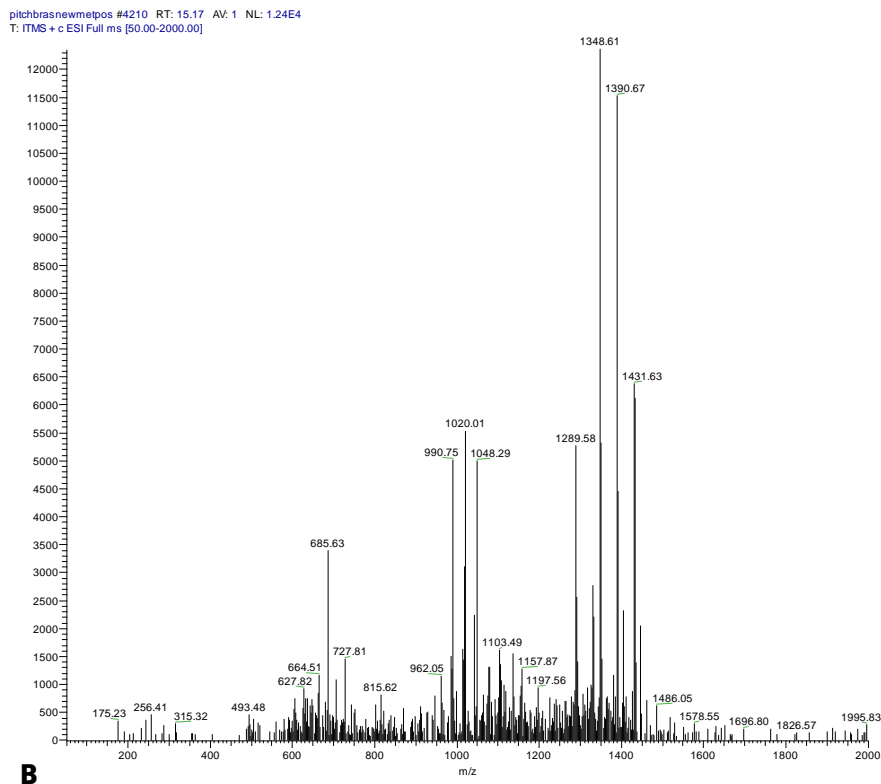
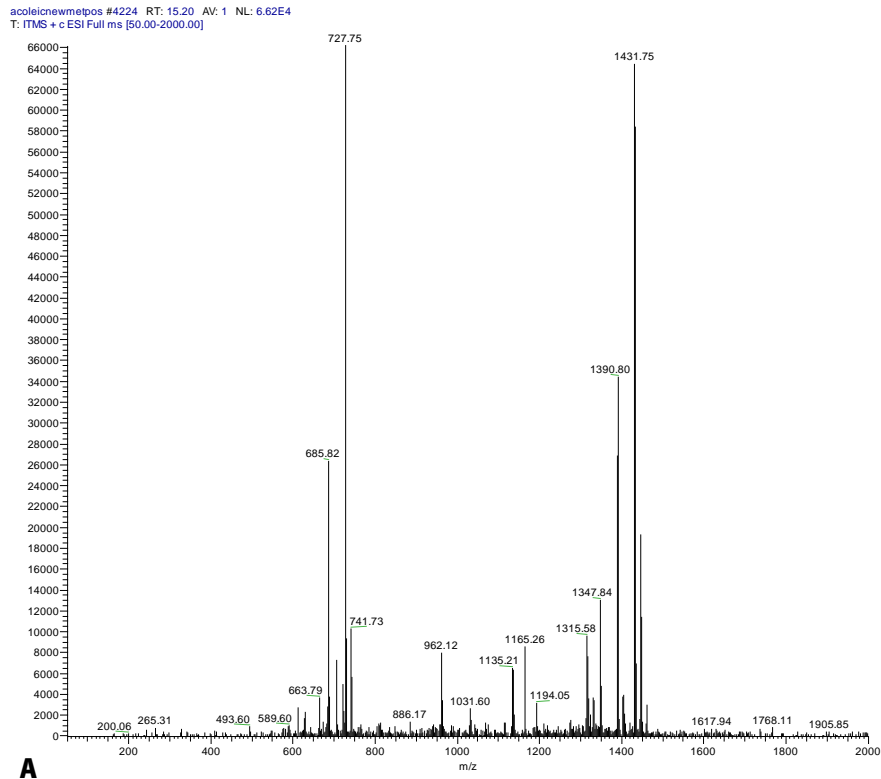


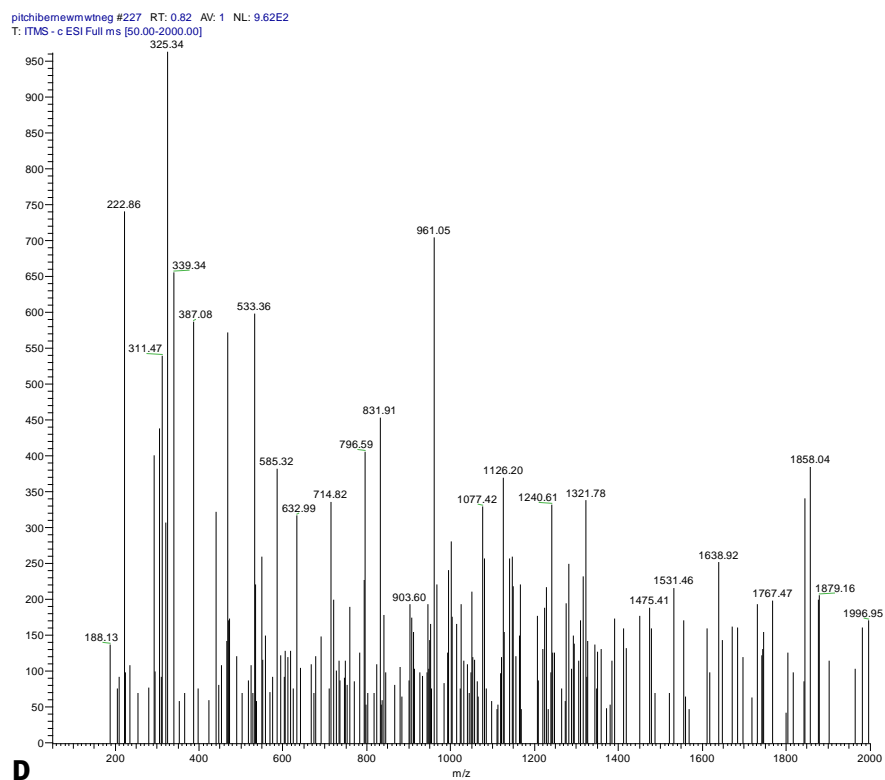
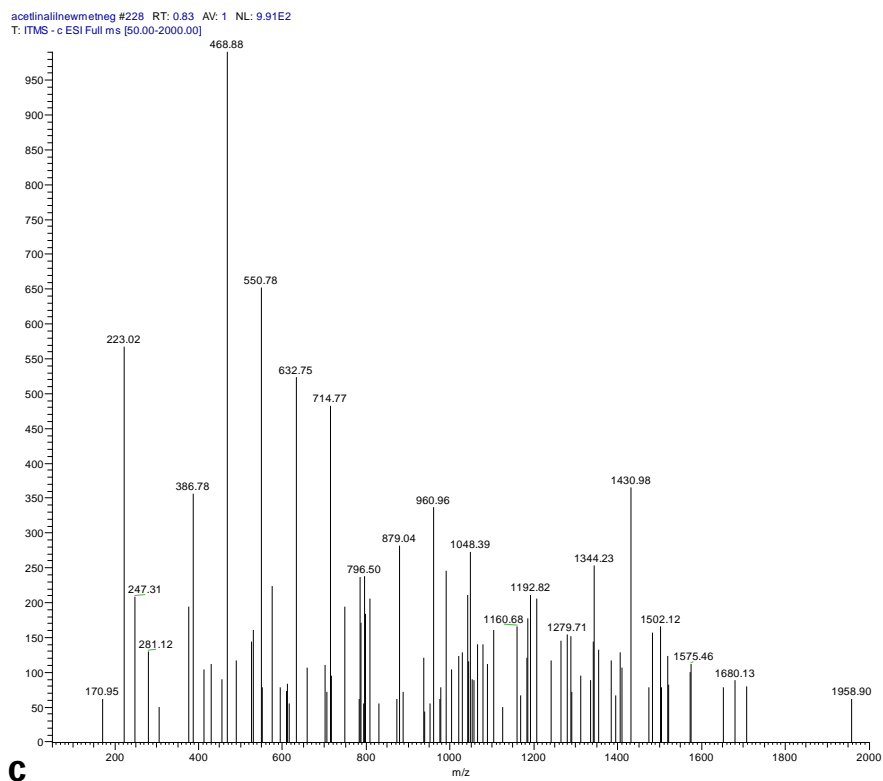
**Figura 101:** Gráfico resultante do ensaio do ponto de turvação realizado para a amostra *pitch* ibérica. As curvas a amarelo, rosa e verde correspondem à variação da turvação, em %, temperatura, em °C, e velocidade de agitação, em rpm, respectivamente, ao longo do tempo.



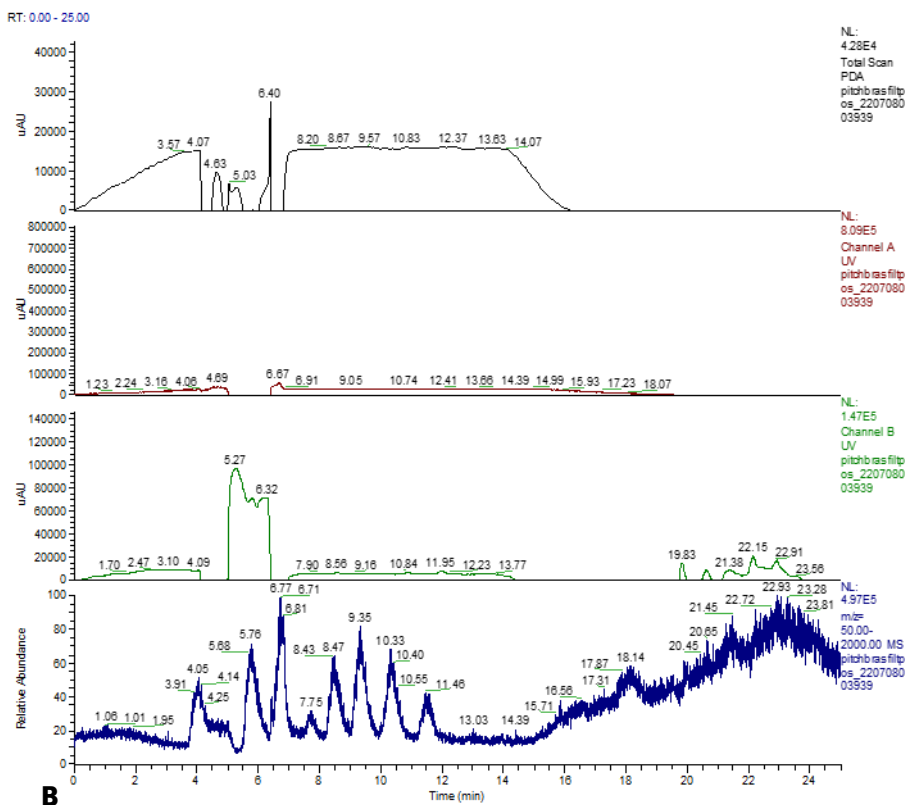
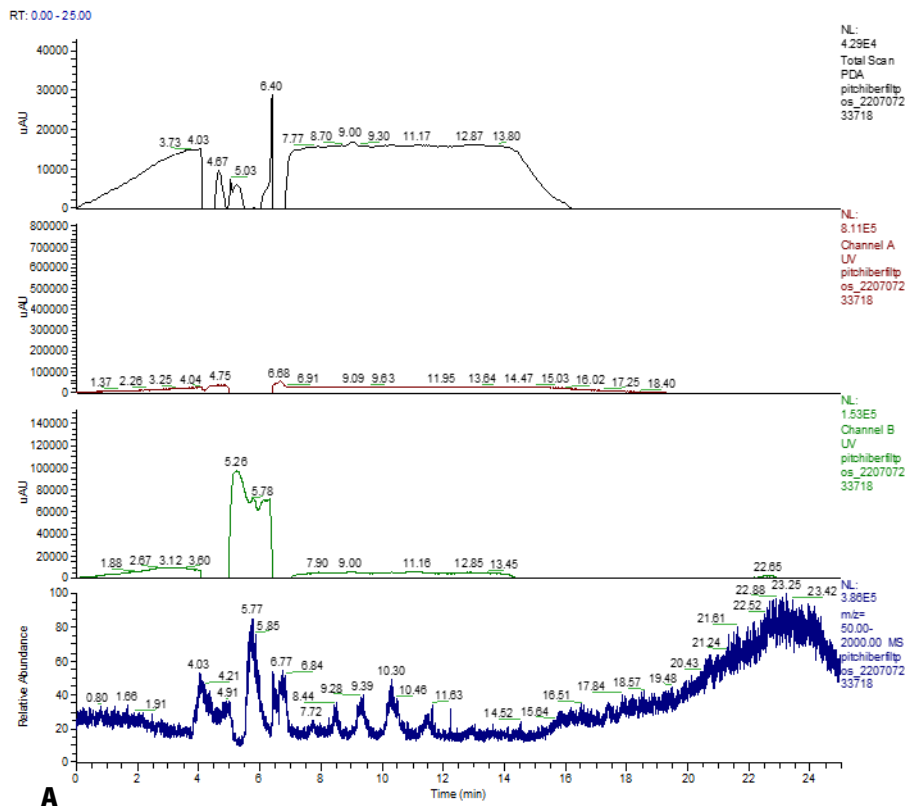
**Figura 102:** Gráfico resultante do ensaio do ponto de turvação realizado para a amostra *pitch* brasileira. As curvas a amarelo, rosa e verde correspondem à variação da turvação, em %, temperatura, em °C, e velocidade de agitação, em rpm, respectivamente, ao longo do tempo.

## C.2) Análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS



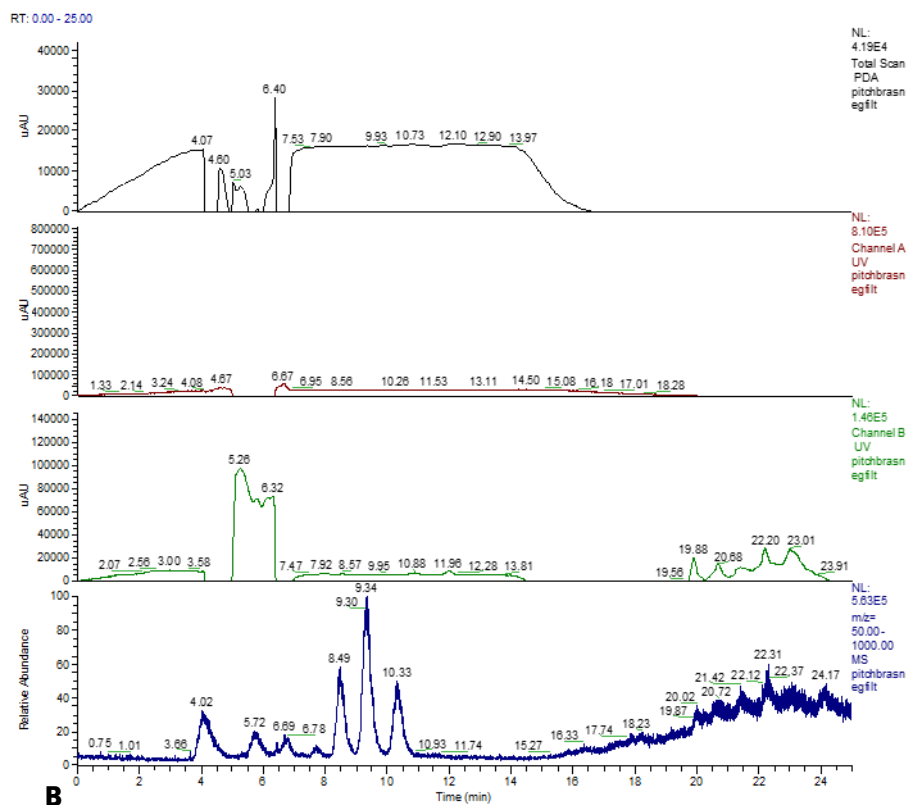
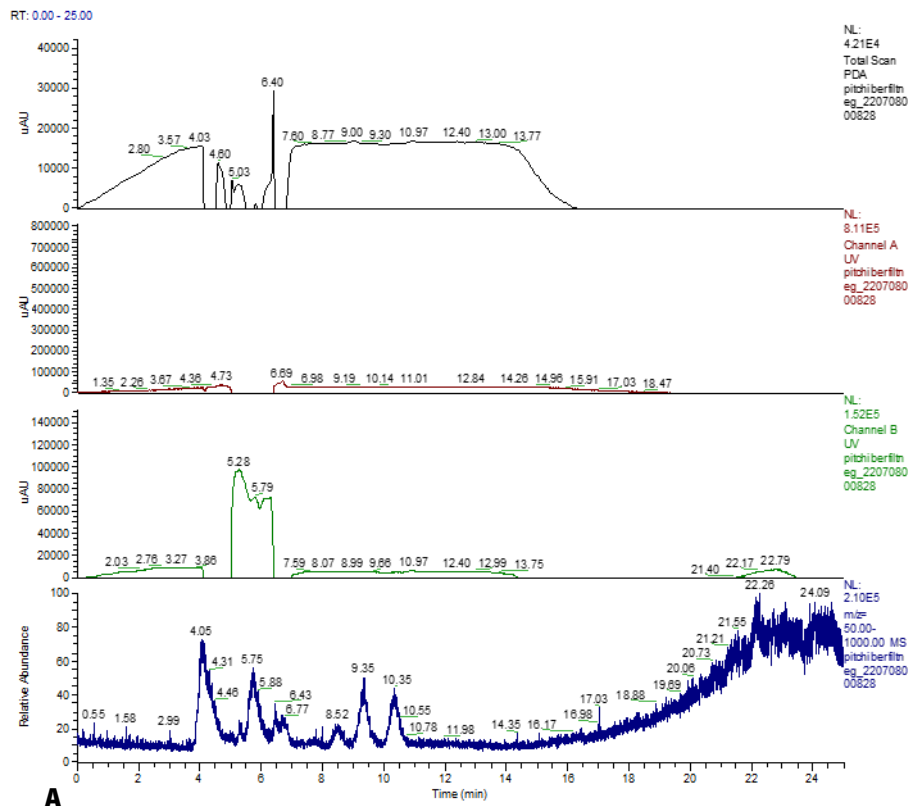


**Figura 103:** Espectros de massa no modo positivo correspondentes a um tempo de retenção de 15,2 min da A) solução do padrão ácido oleico e B) solução 80:20 de metanol e éter etílico da amostra brasileira e no modo negativo correspondentes a um tempo de retenção de 0,8 min da C) solução do padrão acetato de linalilo e D) solução 80:20 de metanol e éter etílico da amostra ibérica.

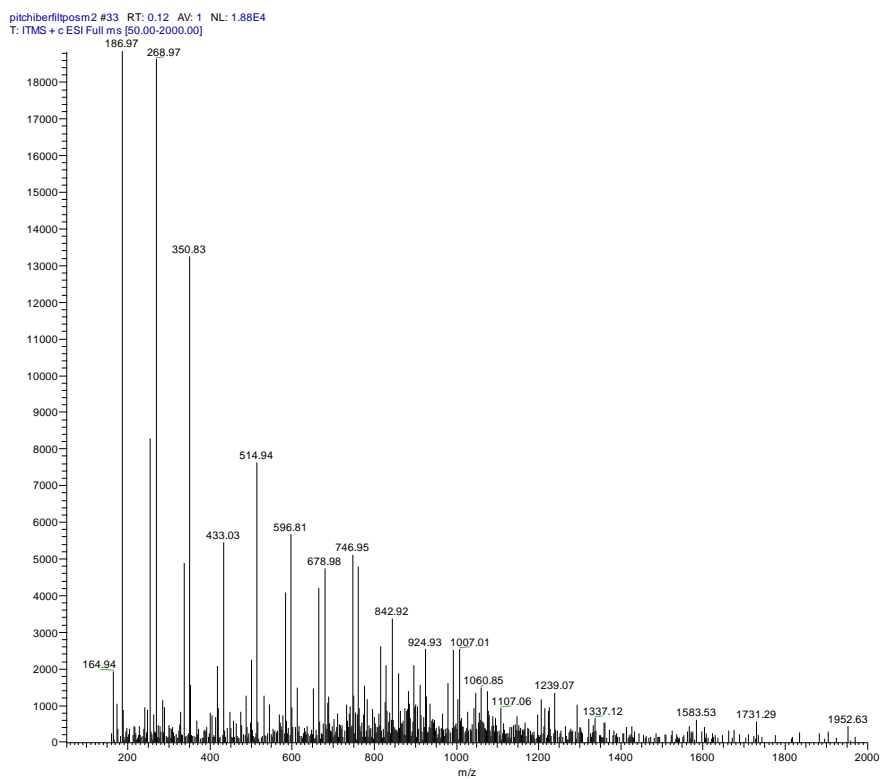


**Figura 104:** Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo positivo das soluções filtradas da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira. Os picos que surgem entre 8 e 12 min são provenientes de impurezas nas soluções filtradas das amostras.

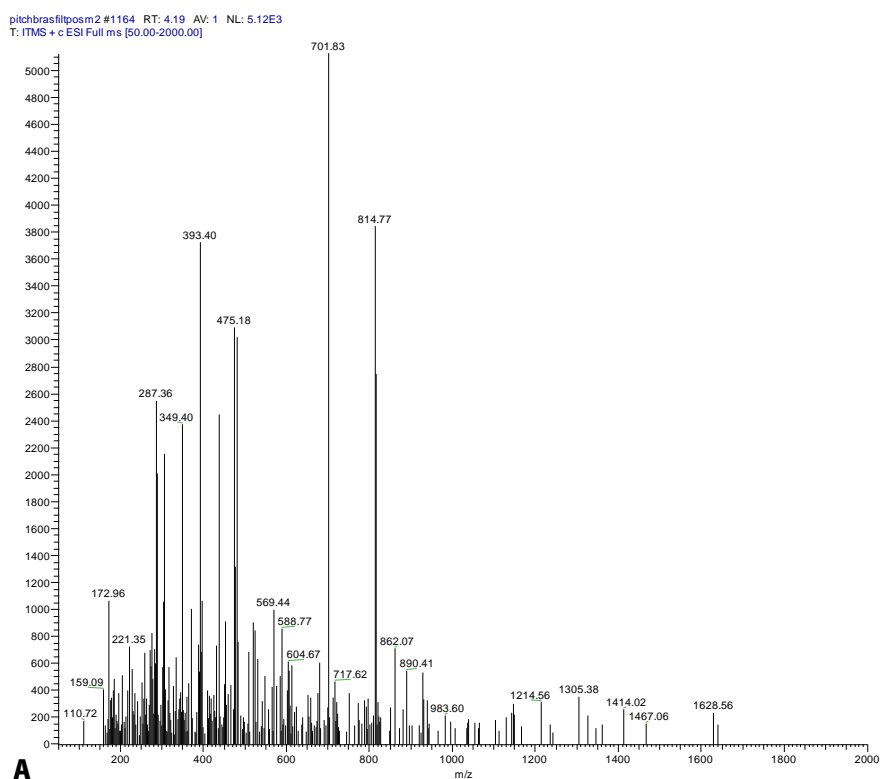


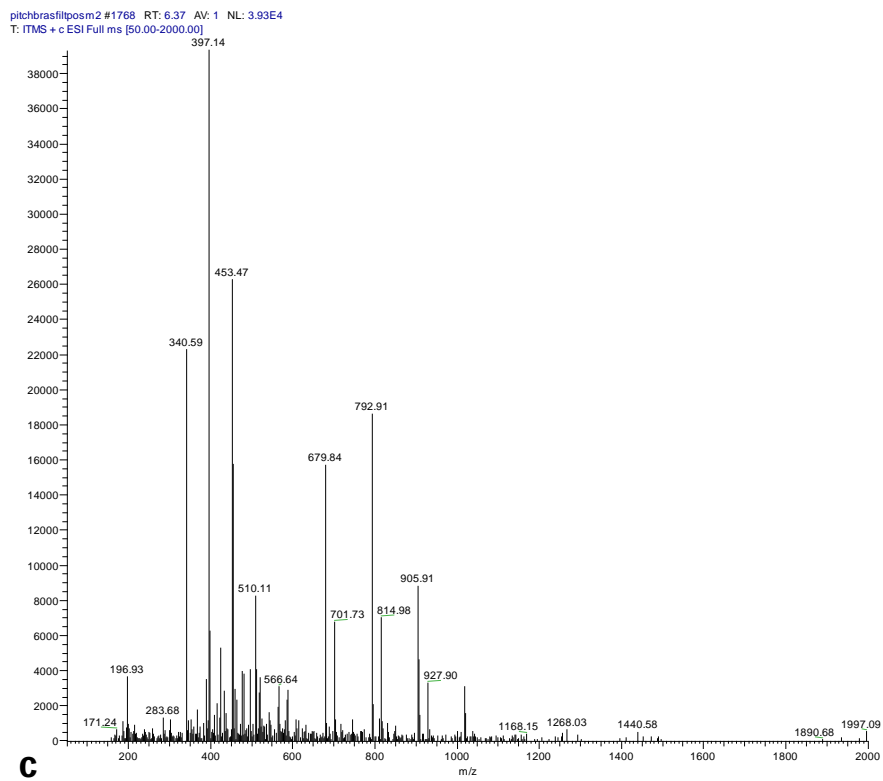
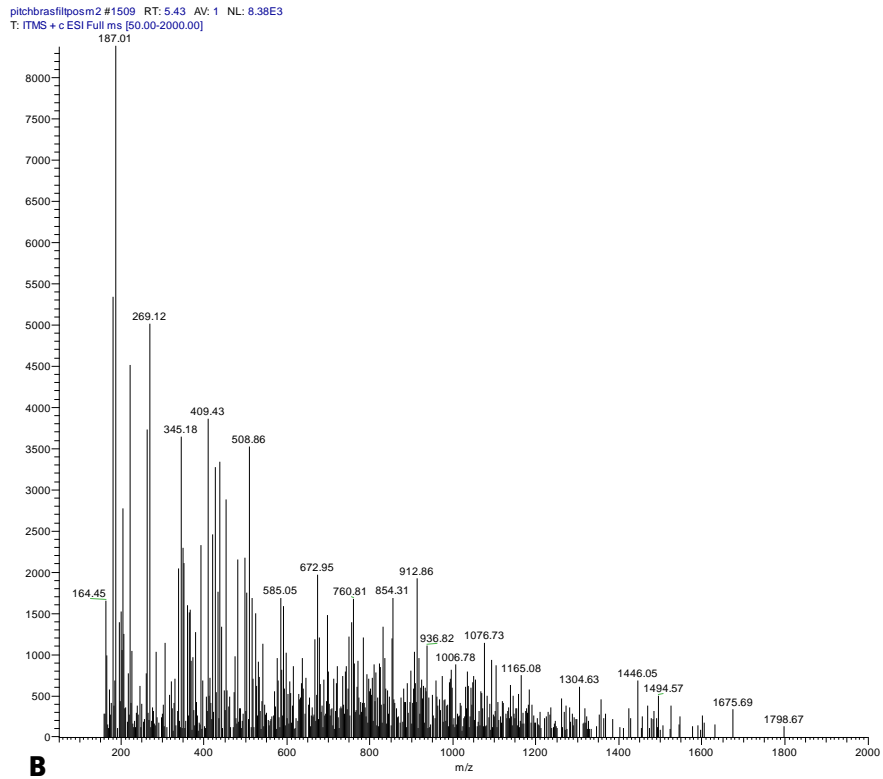


**Figura 105:** Cromatogramas obtidos das análises de HPLC-MS no modo negativo das soluções filtradas da A) amostra ibérica e B) amostra brasileira. Os picos que surgem entre 8 e 12 min são provenientes de impurezas nas soluções filtradas das amostras.



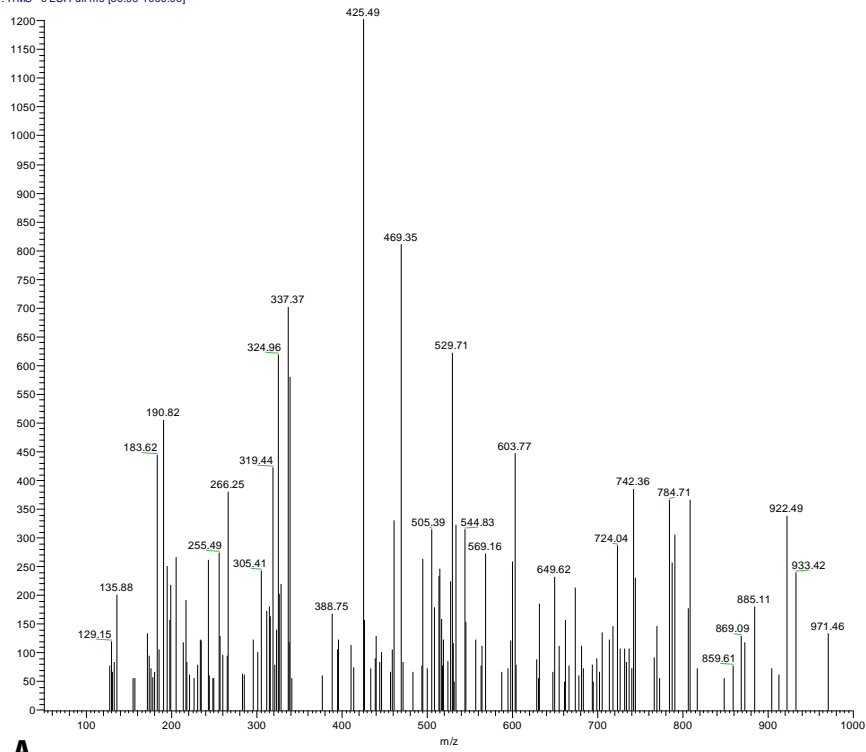
**Figura 106:** Espetros de massa no modo positivo da solução filtrada de amostra ibérica correspondente a um tempo de retenção de 0,12 min.





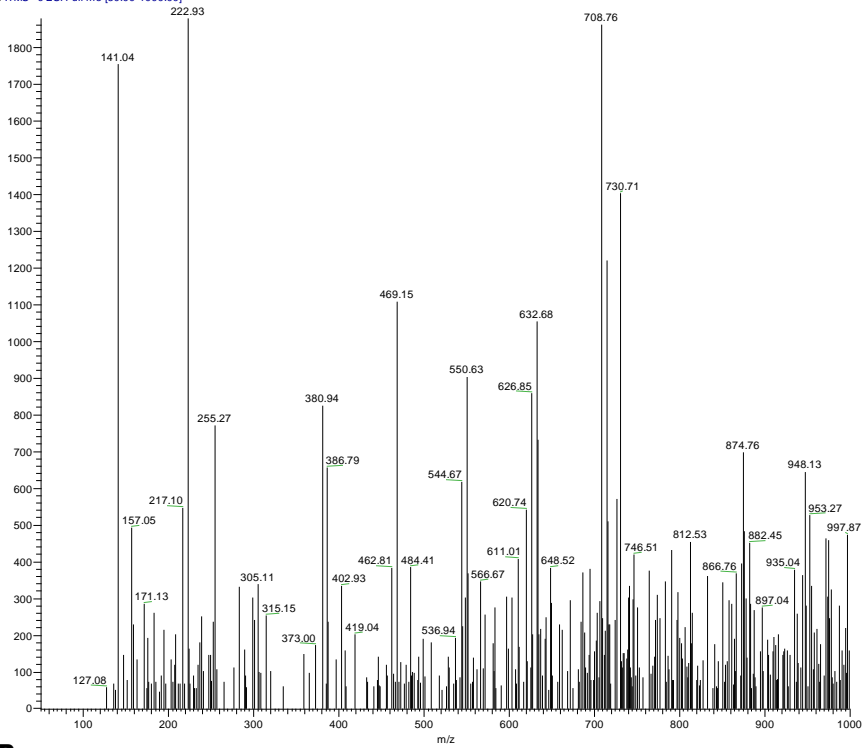
**Figura 107:** Espetros de massa no modo positivo da solução filtrada de amostra brasileira correspondentes a um tempo de retenção de A) 4,19 min, B) 5,43 min e C) 6,37 min.

pitchberfiltnegm2 #1961 RT: 4.97 AV: 1 NL: 1.20E3  
T: ITMS - c ESI Full ms [50.00-1000.00]

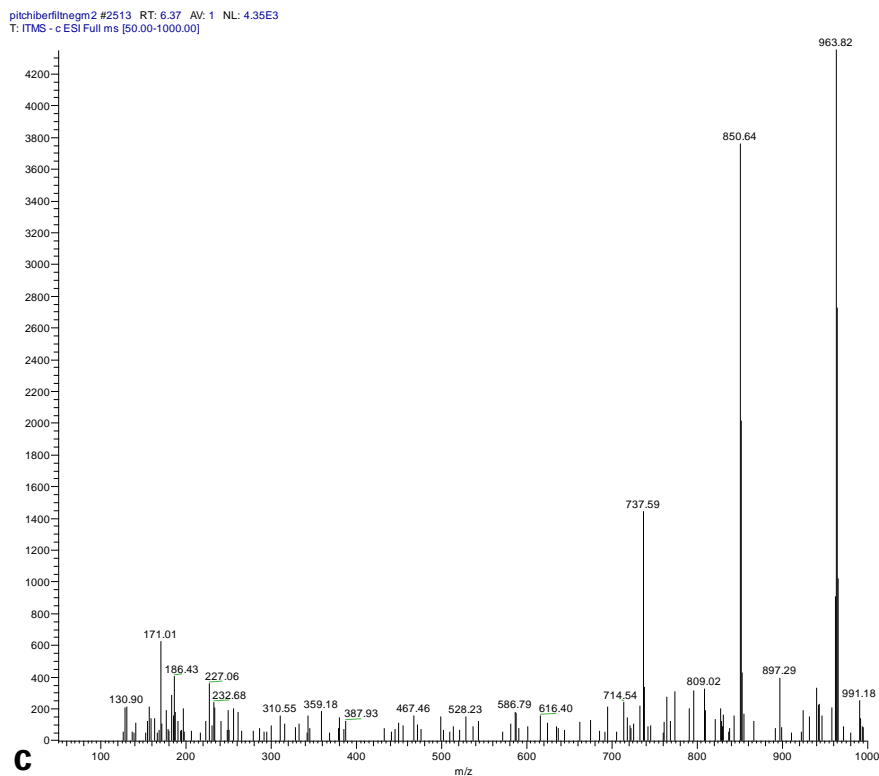


**A**

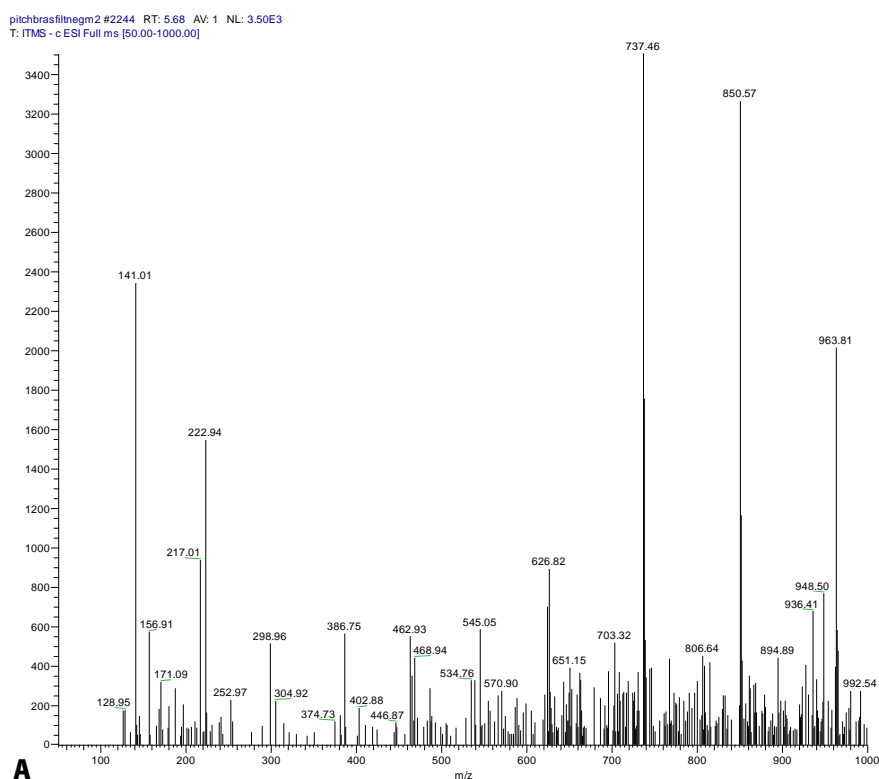
pitchberfiltnegm2 #2170 RT: 5.50 AV: 1 NL: 1.88E3  
T: ITMS - c ESI Full ms [50.00-1000.00]

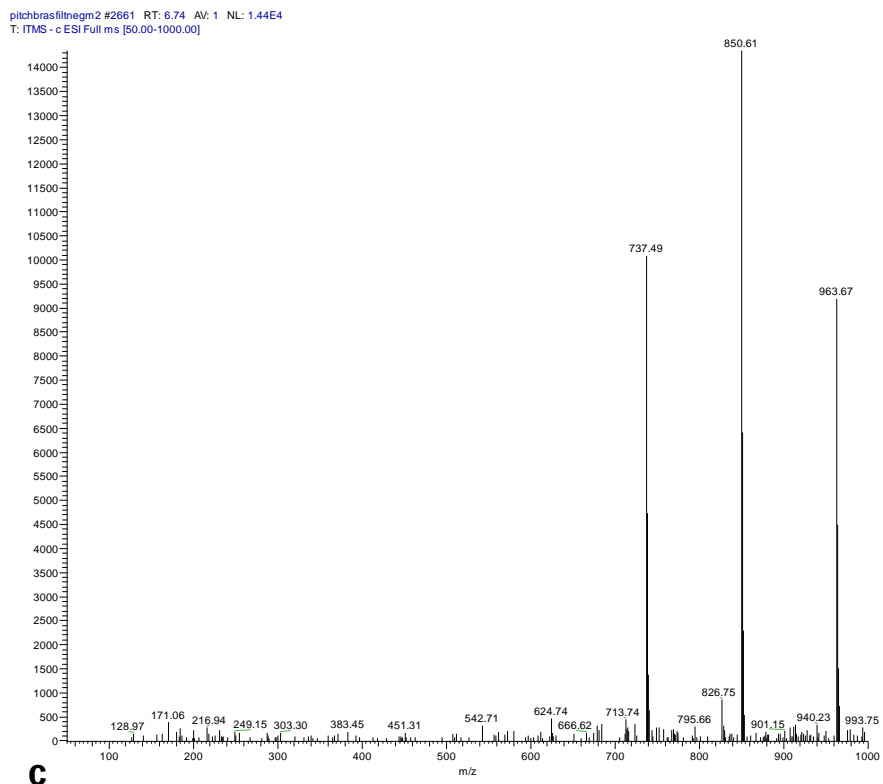
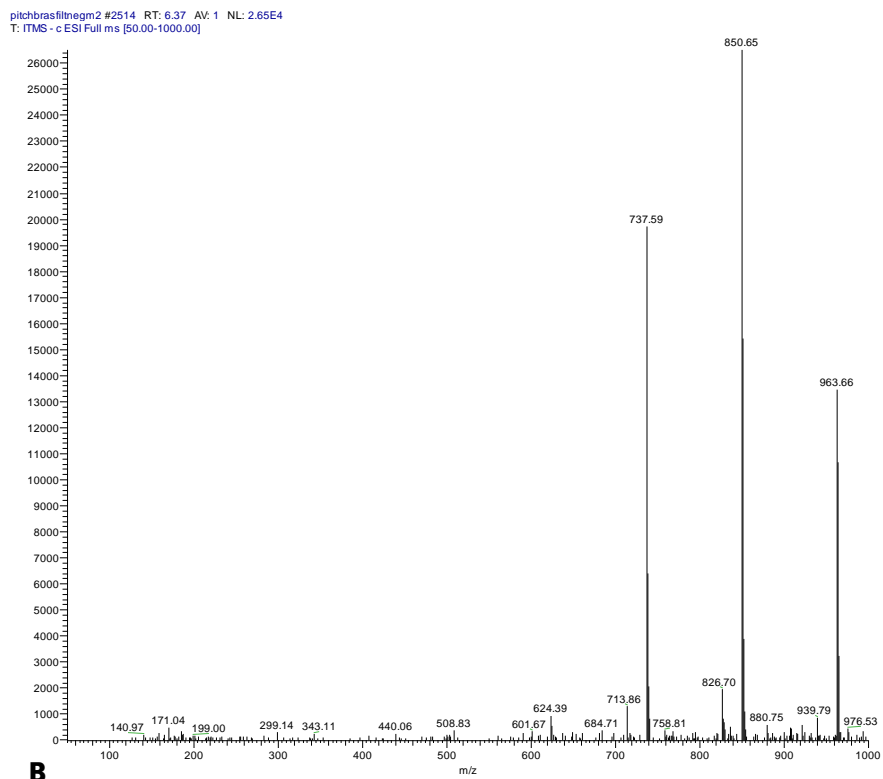


**B**



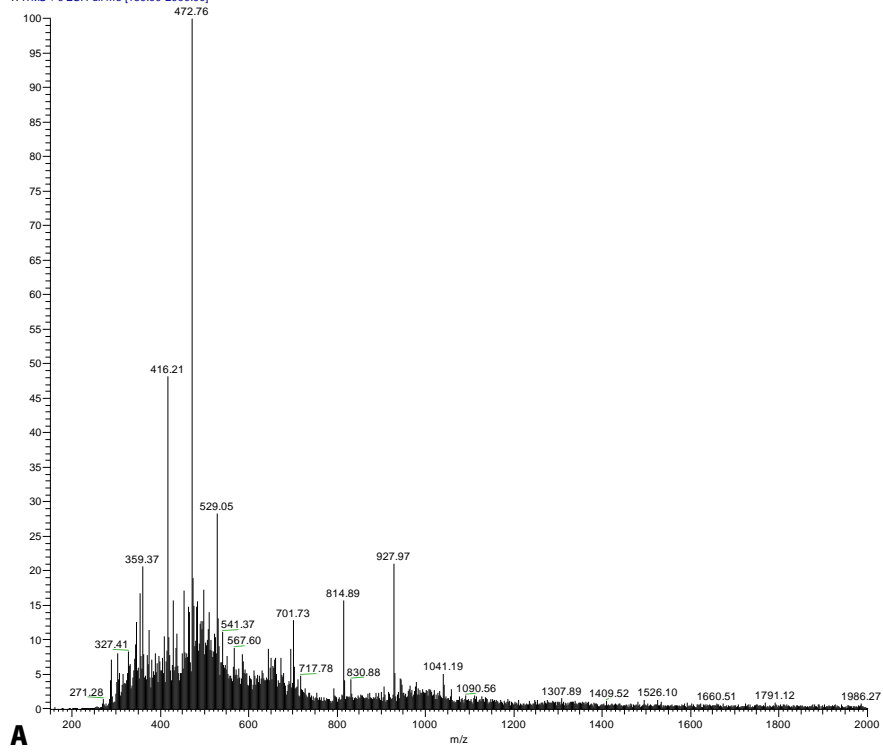
**Figura 108:** Espetros de massa no modo negativo da solução filtrada de amostra ibérica correspondentes a um tempo de retenção de A) 4,97 min, B) 5,50 min e C) 6,37 min.





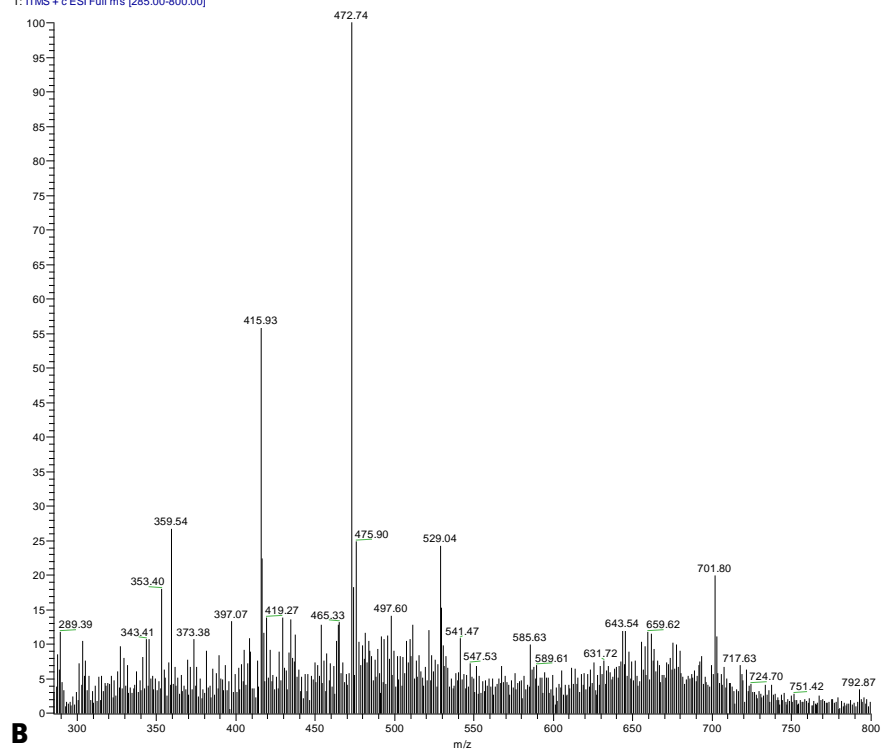
**Figura 109:** Espetros de massa no modo negativo da solução filtrada de amostra brasileira correspondentes a um tempo de retenção de A) 5,68 min, B) 6,37 min e C) 6,74 min.

PITCHIBERFILT\_pos\_220427144030 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.12E4  
T: ITMS + c ESI Full ms [150.00-2000.00]

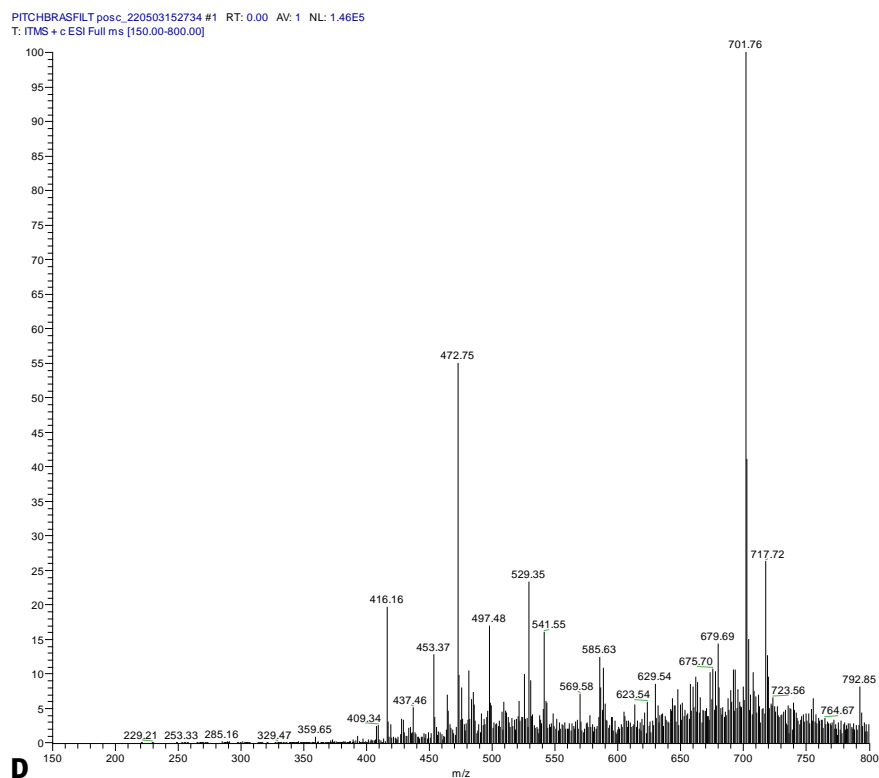
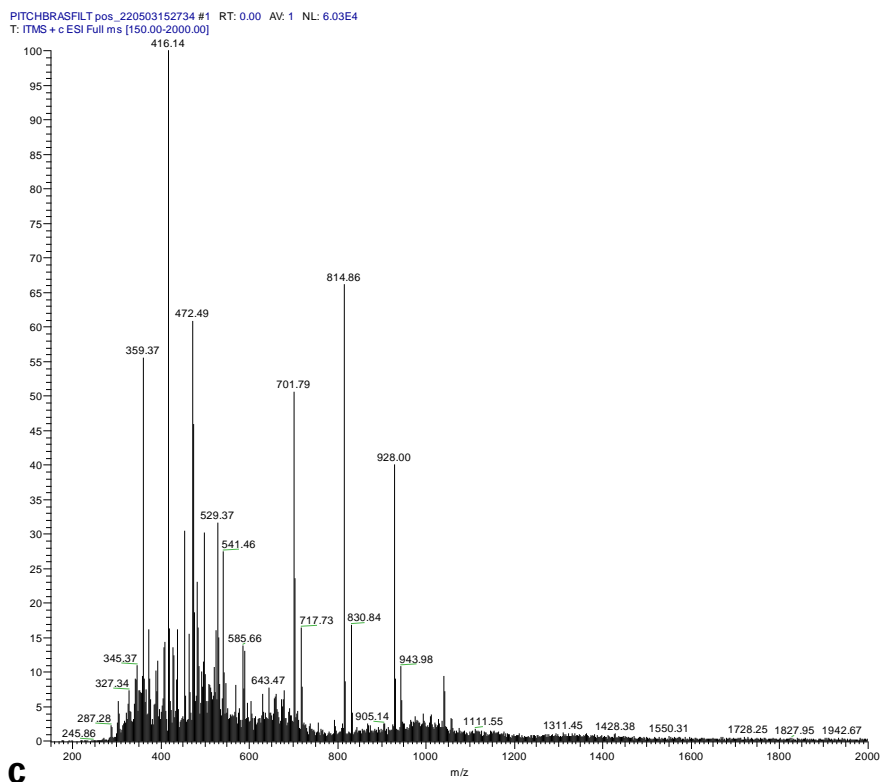


**A**

PITCHIBERFILT\_posb\_220502162647 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.38E5  
T: ITMS + c ESI Full ms [285.00-800.00]



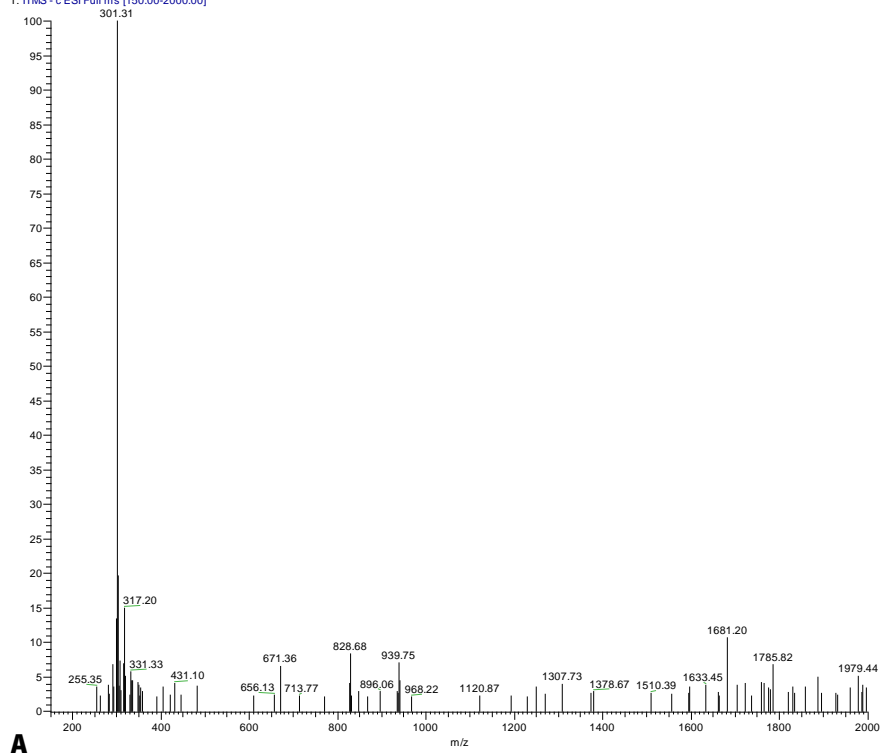
**B**



**Figura 110:** Espectros de massa no modo positivo da A) solução filtrada de amostra ibérica de 150-2000 m/z e B) de 285-800 m/z e da C) solução filtrada de amostra brasileira de 150-2000 m/z e D) de 150-800 m/z.

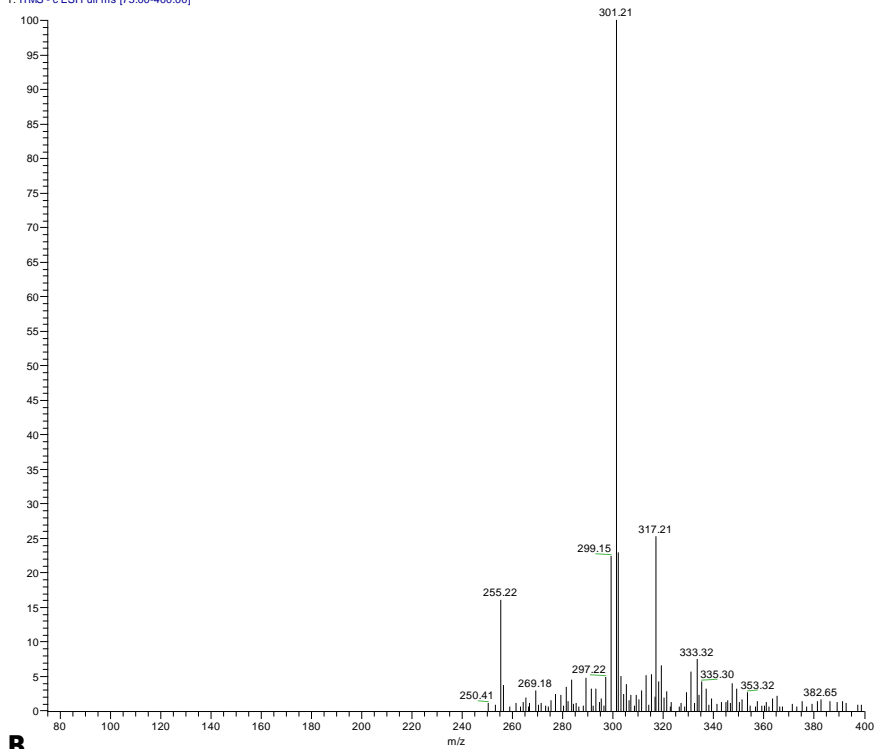


PITCHIBERFILTneg\_220427144030 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.73E2  
T: ITMS - c ESI Full ms [150.00-2000.00]

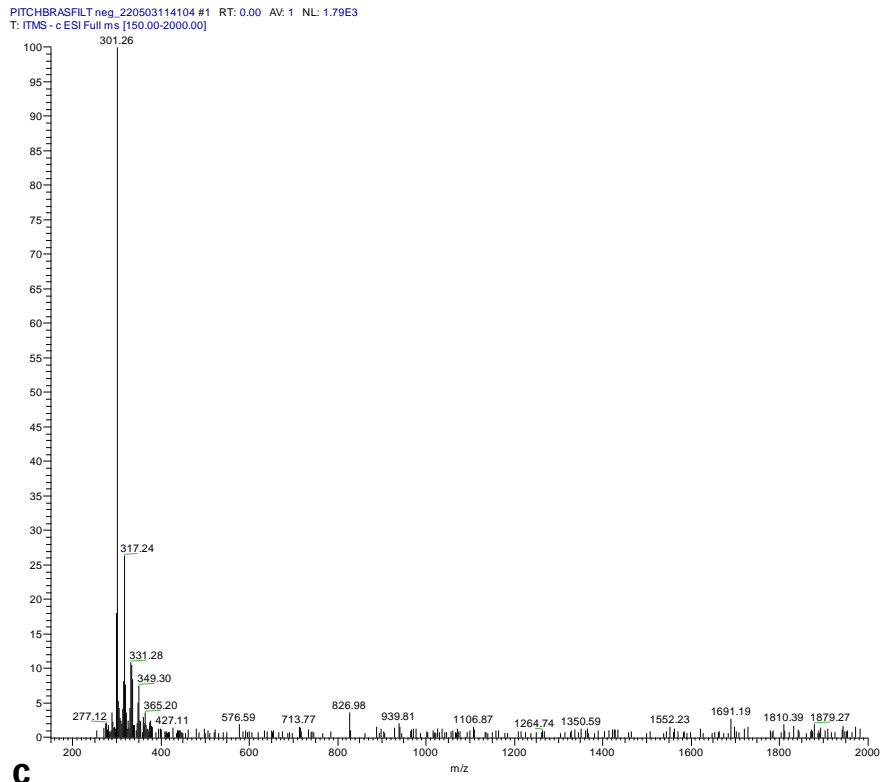


**A**

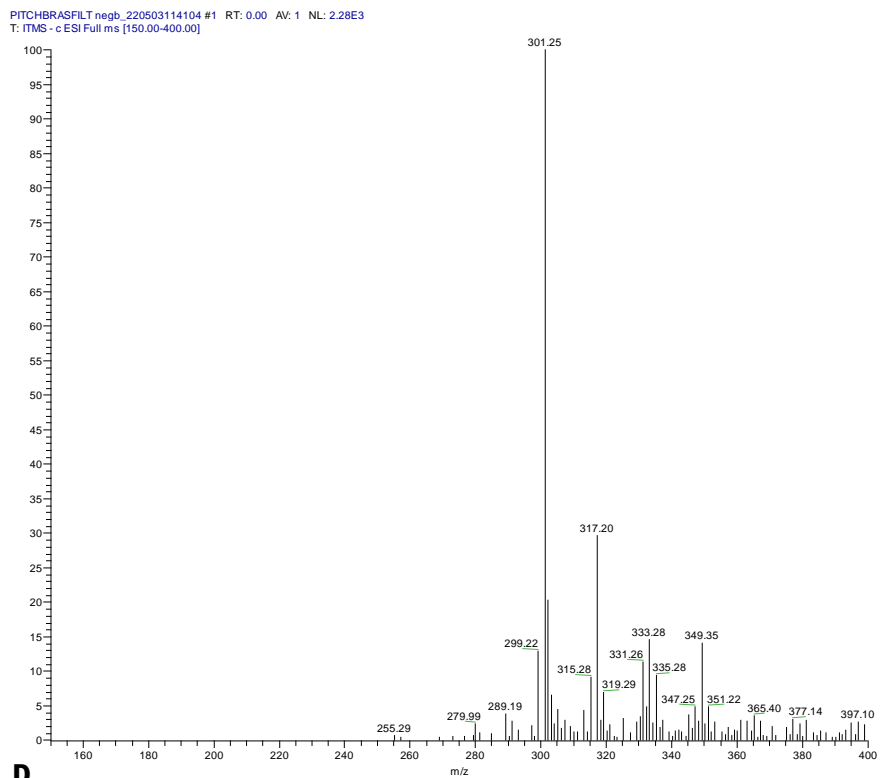
PITCHIBERFILTnegc\_220503114104 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.00E3  
T: ITMS - c ESI Full ms [75.00-400.00]



**B**



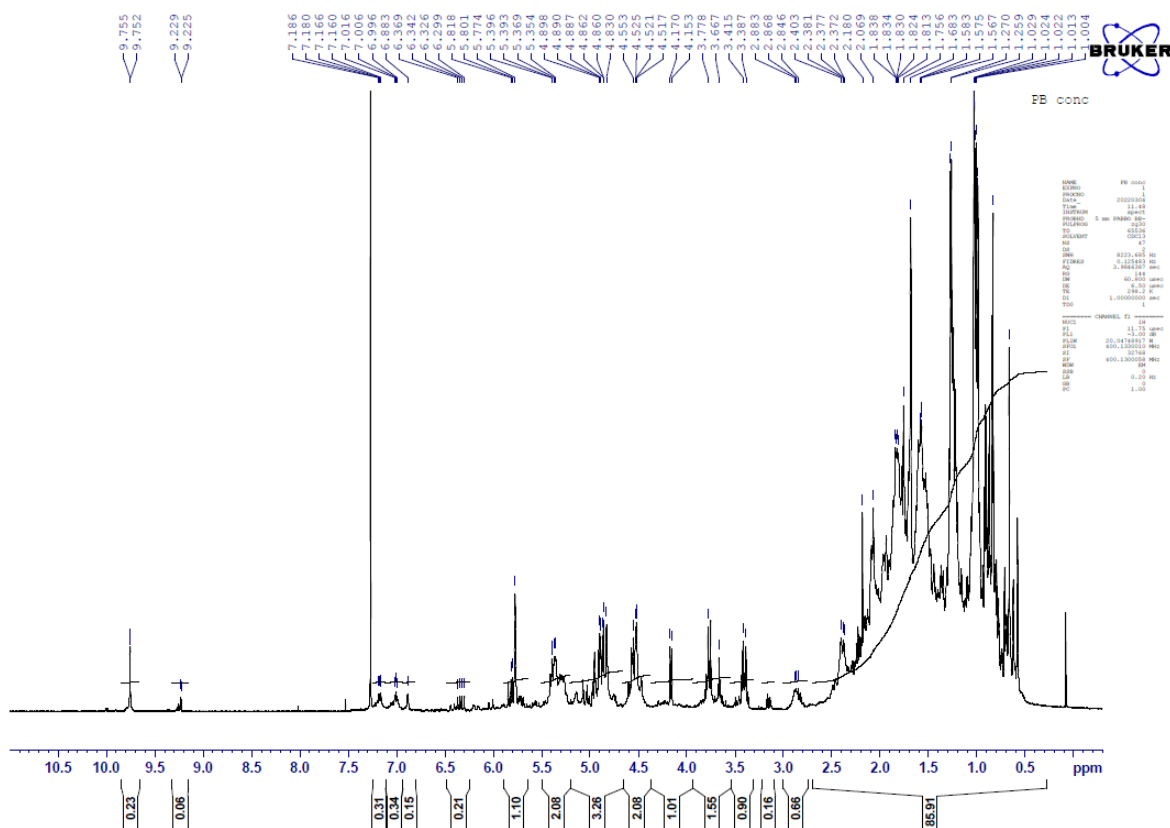
C



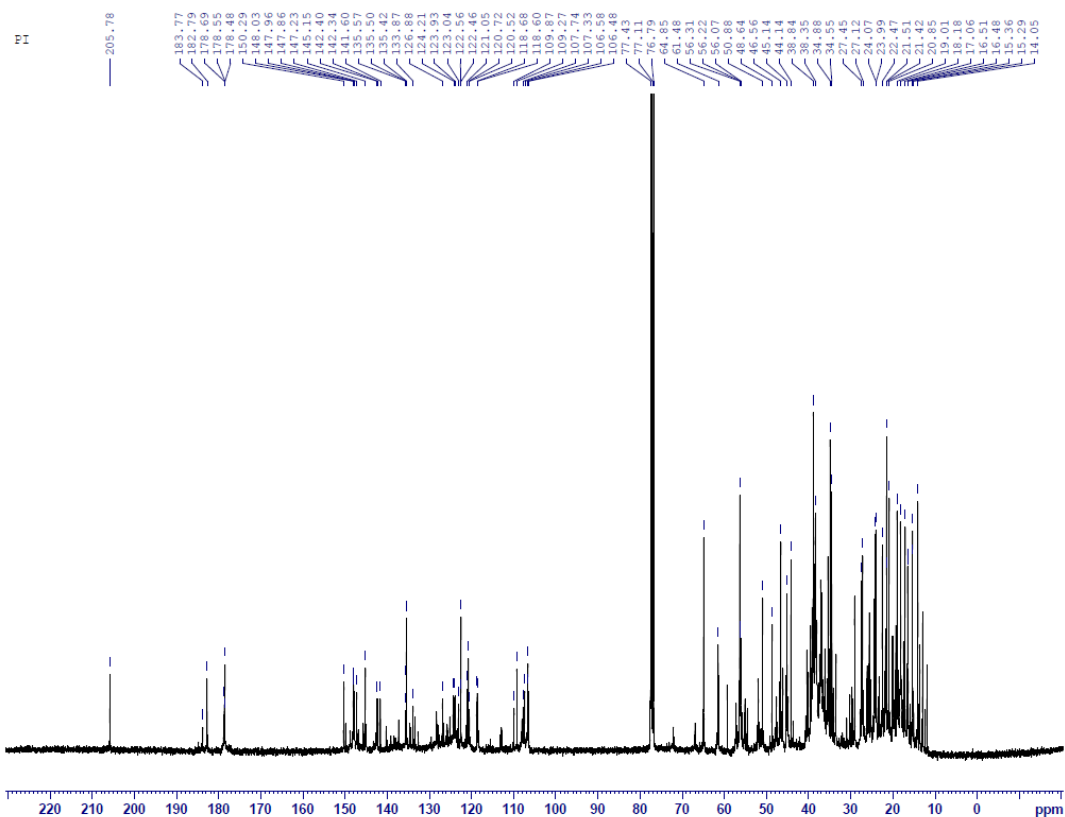
D

**Figura 111:** Espetros de massa no modo negativo da A) solução filtrada de amostra ibérica de 150-2000 m/z e B) de 75-400 m/z e da C) solução filtrada de amostra brasileira de 150-2000 m/z e D) de 150-400 m/z.

### C.3) Análises de RMN



**Figura 112:** Espetro de  $^1\text{H}$ -RMN de 10 mg da amostra brasileira em clorofórmio deuterado.



**Figura 113:** Espetro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 10 mg da amostra ibérica em clorofórmio deuterado.