

Caracterização de óleo de grainha de uva de distintas castas cultivadas sob as mesmas condições edafo-climáticas

Marina Fonseca Mota

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadores: Professora Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira-Dias Vicente
Doutora Joana Mendes Madeira Rodrigues

Júri:

Presidente: Professora Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Professora Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira-Dias Vicente, Professora Associada com Agregação, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Professora Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório, Professora Adjunta Convidada, Escola Superior de Tecnologia do Instituto Politécnico de Setúbal

Aos meus Avós,
Aos meus Pais,
E aos meus Irmãos,
Que são tudo para mim.

Agradecimentos

O presente trabalho foi desenvolvido com o apoio e colaboração de várias pessoas às quais expresso os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Suzana Ferreira-Dias, a minha orientadora, pela oportunidade de desenvolver este projeto com todo o seu empenho, disponibilidade e amabilidade, por todo o conhecimento que me transmitiu, pela confiança da sua parte e por me fazer sentir que tudo é possível com trabalho e dedicação.

À minha co-orientadora, Doutora Joana Mendes Madeira Rodrigues, por estar sempre presente em cada etapa, pela disponibilidade e carinho com que me acompanhou no trabalho laboratorial.

Ao Doutor José Antão pela conceção e dinamização deste projeto de aproveitamento das grainhas de uva das diversas castas.

Ao Engenheiro José Eduardo Eira Dias, Coordenador do Pólo de Dois Portos do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, pelo fornecimento das amostras de grainha de uva.

À Engenheira Paula Vasconcelos e a toda a equipa do Laboratório de Estudos Técnicos do ISA (LET), pela recolha manual das grainhas dos bagos de uva utilizados neste estudo e pela prontidão no esclarecimento de qualquer dúvida.

Aos Professores Jorge Gominho e Isabel Miranda por me permitirem a realização de algumas partes do estudo no Departamento de Engenharia Florestal do ISA, bem como por toda a disponibilidade.

À Professora Fernanda Valente, do Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas, por todo o apoio na análise estatística.

Ao Professor Jorge Ricardo da Silva, pelo esclarecimento e disponibilidade em esclarecer todas as questões relacionadas com a componente vinícola.

À D. Joaquina que durante o processo de extração do óleo de grainha de uva tanto me ensinou e apoiou.

À Diana e ao Daniel, que em todo o trabalho desenvolvido no Edifício Ferreira-Lapa, foram incansáveis, tanto na transmissão de conhecimentos como no apoio à realização de todas as análises laboratoriais inerentes ao presente estudo.

Aos meus companheiros de laboratório Ilkay Elmaci e César Pasarán (estudantes de mobilidade internacional), cujo apoio na parte laboratorial foi crucial, pois sem eles tudo seria mais moroso e, com certeza, os dias passados no laboratório não teriam sido tão alegres.

À Antonela Pekica que, por casualidade, acabou por se tornar um grande apoio neste percurso.

Aos meus amigos, em especial, Ana Sofia, Joana Martins, Isabel Godinho, Diogo Raposo, Maria Leonor Botelho, Cláudia Cunha e Inês Monteiro, que sempre me transmitiram força, confiança e tranquilidade, para que, passo a passo, fosse atingindo cada objetivo.

Agradeço aos meus pais, aos meus irmãos Mirna e Daniel, e à minha prima Carolina, para quem palavras não são suficientes para expressar o meu eterno agradecimento por tudo.

A todos que de alguma forma estiveram envolvidos neste trabalho, muito obrigada!

Resumo

A cultura de vinha (*Vitis vinifera* L.) é uma das mais importantes em todo o mundo. Estima-se que em Portugal são geradas anualmente cerca de 47000 toneladas de grainhas de uva. Este resíduo contém óleo comestível rico em ácido linoleico (ácido gordo essencial), proteínas e compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, que importa valorizar.

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar o rendimento em óleo, a sua qualidade (acidez e produtos de oxidação) e composição em ácidos gordos do óleo extraído de grainhas de castas nacionais e internacionais. Estas castas foram cultivadas sob as mesmas condições edafo-climáticas e culturais, no Pólo de Dois Portos do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. Das 29 castas estudadas, 21 delas têm origem em Portugal, sendo 5 tintas (Touriga Nacional, Castelão, Trincadeira, Alfrocheiro, Aragonês (Tempranillo, Tinta Roriz)) e 19 brancas (Trincadeira das Pratas, Síria (Roupeiro Branco), Terrantez, Galego Dourado, Vital, Cerceal Branco, Avesso, Arinto, Malvasia Colares, Gouveio, Azal, Antão Vaz, Rabigato, Rabo de Ovelha, Cercial, Fernão Pires, Verdelho e Tália). Como castas de origem estrangeira, estudaram-se as castas francesas Chardonnay (branca), Cabernet Sauvignon (tinta) e Syrah (tinta), as castas italianas Sangiovese (tinta) e Tália (branca) e as castas espanholas Malvasia Rei ou Seminário (branca) e Perrum (branca).

O teor máximo em óleo ($18 \pm 0,62\%$ b.s.) foi observado na casta Azal e o teor mínimo na Malvasia Rei ($5 \pm 0,15\%$ b.s.). O perfil de ácidos gordos é semelhante em todas as amostras. O ácido gordo maioritário foi o ácido linoleico, que variou de $69 \pm 0,75\%$ (Arinto e Syrah) a $75 \pm 0,3\%$ (Malvasia Rei e Aragonês), seguido pelo ácido oleico que variou de $13 \pm 0,07\%$ (Terrantez e Aragonês) a $19 \pm 0,6\%$ (Syrah). Verificou-se que os óleos das castas mais ricas em óleo são os que em geral apresentam menores teores de ácido linoleico e maiores teores de ácido oleico.

Palavras-chave: composição em ácidos gordos, extração química, óleo de grainha de uva, resíduo vinícola, *Vitis vinifera* L.

Abstract

Vine crop (*Vitis vinifera* L.) is one of the most important crops in the World. In Portugal, about 47,000 tons/year of grape seeds are discarded. This residue contains an edible oil rich in linoleic acid (essential fatty acid), proteins and phenolic compounds with antioxidant properties, which is important to valorise.

In this study, the oil yield, oil quality (acidity and oxidation products) and fatty acid composition of the oil extracted from national and international grape varieties were evaluated. These grapes were installed under the same edapho-climatic conditions and submitted to the same agricultural practices, at the “Pólo de Dois Portos” of the “Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária”. Twenty nine varieties were studied, 22 of them with Portuguese origin, being 5 of them red (Touriga Nacional, Castelão, Trincadeira, Alfrocheiro, e Aragonês (Tempranillo, Tinta Roriz)) and 19 white (Trincadeira das Pratas, Síria (Roupeiro Branco), Terrantez, Galego Dourado, Vital, Cerceal Branco, Avesso, Arinto, Malvasia Colares, Gouveio, Azal, Antão Vaz, Rabigato, Rabo de Ovelha, Cercial, Fernão Pires, Verdelho and Tália). The following varieties with foreign origin were studied: French varieties Chardonnay (white), Cabernet Sauvignon (red) and Syrah (red), Italian variety Sangiovese (red) and Spanish varieties Malvasia Rei or Seminário (white) and Perrum (white).

The highest oil content ($18 \pm 0.62\%$ d.w.) was observed for the Azal variety and the minimum was observed for Malvasia Rei ($5 \pm 0.15\%$ d.w.). The fatty acid profile was similar for all the samples. Linoleic acid was the major fatty acid, which varied from $69 \pm 0.75\%$ (Arinto and Syrah) to $75 \pm 0.3\%$ (Malvasia Rei and Aragonês), followed by oleic acid which varied from $13 \pm 0.07\%$ (Terrantez and Aragonês) to $19 \pm 0.6\%$ (Syrah). The grape varieties containing higher oil yields, presented higher amounts of oleic acid and lower amounts of linoleic acid in the oils.

Key-words: chemical extraction, fatty acid composition, grapeseed oil, winery waste, *Vitis vinifera* L.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de abreviaturas	x
Índice de tabelas	xi
Índice de figuras.....	xii
1. Enquadramento do tema e objetivos	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Introdução	3
2.2. Definições, classificações e propriedades físico-químicas dos lípidos.....	4
2.3. Grainha de uva.....	8
2.3.1. Humidade.....	9
2.3.2. Rendimento.....	9
2.3.3. Extração.....	10
2.4. Caracterização do óleo	11
2.4.1. Composição em ácidos gordos	13
2.4.2. Acidez	13
2.4.3. Compostos de oxidação.....	13
2.4.4. Cor.....	14
3. Materiais e métodos	16
3.1. Matéria-prima	16
3.2. Determinação do teor de humidade das amostras	16
3.3. Método de extração.....	18
3.3.1. Otimização do processo.....	20
3.3.2. Determinação do teor de óleo pelo método de Soxhlet	20
3.4. Determinação da acidez do óleo	21
3.5. Determinação do índice espectrofotométrico	22

3.6.	Determinação do perfil de ácidos gordos do óleo.....	24
3.7.	Determinação da cor e características cromáticas	27
3.8.	Tratamento estatístico dos resultados	28
4.	Resultados e discussão.....	30
4.1.	Teor de humidade	30
4.2.	Rendimento em óleo	31
4.2.1.	Otimização do tempo de extração	31
4.2.2.	Rendimento de extração pelo método de Soxhlet	32
4.3.	Acidez	33
4.4.	Índice espectrofotométrico	34
4.5.	Perfil de ácidos gordos.....	37
4.6.	Cor e características cromáticas	41
5.	Tratamento estatístico dos resultados	45
5.1.	Análise de variância (ANOVA)	45
5.2.	Análise em Componentes Principais e classificação hierárquica.....	48
	Conclusões e perspetivas futuras.....	54
	Referências bibliográficas	56

Lista de abreviaturas

Abs – absorvância

ACP – Análise em Componentes Principais

AG – ácidos gordos

AGL – Ácidos Gordos Livres

b. s. – base seca

C.I.E. – *Commission Internationale de L'Eclairage* – Comissão Internacional de Iluminação

CAS - *Chemical Abstracts Service*

CP – Componentes Principais

FAME - Fatty Acid Methyl Esters – Ésteres metílicos de ácidos gordos

FDA - *Food and Drug Administration*

FID - *Flame Ionization Detection* – detetor de ionização de chama

INE – Instituto Nacional de Estatística

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

LDL - Low-density lipoprotein – lipoproteína de baixa densidade

MUFA – *Monounsaturated fatty acids* - Ácidos gordos monoinsaturados

NP – Norma Portuguesa

OGU – Óleo de grainha de uva

PUFA - *Polyunsaturated fatty acids* - Ácidos gordos polinsaturados

R^2 – Coeficiente de determinação

SFA – *Saturated fatty acids* - saturados

TAG – Triacilgliceróis

V.a. – Variável aleatória

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição dos subprodutos, em kg/hL.....	3
Tabela 2 - Métodos de extração de óleo de grainha de uva e respetivo rendimento em óleo.	10
Tabela 3 - Listagem das castas analisadas e respetivas codificação, abreviatura, casta e proveniência.....	17
Tabela 4 - Condições de operação da cromatografia gasosa.....	26
Tabela 5 – Teor de humidade das grainhas das distintas castas com desvio padrão (em percentagem).....	30
Tabela 6 – Absorvância relativa à presença de produtos primários (K_{232}) e secundários (K_{270}) de oxidação, do óleo das diferentes castas.....	36
Tabela 7 – Composição em ácidos gordos maioritários do óleo de grainha de uva das distintas castas.....	37
Tabela 8 – Parâmetros de cor e características cromáticas do óleo de grainha de uva das diferentes castas.....	42
Tabela 9 – Quadro-resumo ANOVA a um fator, das v.a. estudadas.....	45
Tabela 10 - Quadro-resumo da Estatística de Kruskal-Wallis.....	48
Tabela 11 – Valores próprios das componentes principais e estatísticas relacionadas da Matriz 1.....	49
Tabela 12 – Valores próprios e estatísticas relacionadas das componentes principais da Matriz 2.....	51

Índice de figuras

Figura 1 – Rendimento de extração de óleo ao longo do tempo de extração, em aparelho de Soxhlet, para a casta Vinhão.	32
Figura 2 - Rendimento em óleo, em percentagem, das grainhas das distintas castas.	32
Figura 3 - Acidez (% AGL) das diferentes castas.	34
Figura 4 – Reta de regressão linear, da quantidade de ácido linoleico vs. ácido oleico (em percentagem), respetiva equação e coeficiente de correlação.	38
Figura 5 – Biossíntese de ácidos gordos em plantas.	39
Figura 6 – Variação dos teores de ácidos gordos insaturados C18:1 e C18:2 com os teores de ácidos gordos saturados C16:0 e C18:0.	40
Figura 7 – Diagrama de cromaticidade x, y do sistema C.I.E. (Adaptado da Norma Portuguesa 937 de 1987).	43
Figura 8 – Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e <i>qq-plot</i> (à direita), da v.a. rendimento.	46
Figura 9 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e <i>qq-plot</i> (à direita), da v.a. ácido linoleico.	46
Figura 10 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e <i>qq-plot</i> (à direita), da v.a. ácido oleico.	46
Figura 11 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e <i>qq-plot</i> (à direita), da v.a. acidez.	47
Figura 12 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e <i>qq-plot</i> (à direita), da v.a. absorvância a 232 nm.	47
Figura 13 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e <i>qq-plot</i> (à direita), da v.a. absorvância a 270 nm.	47
Figura 14 – (À esquerda) Projeção de variáveis no plano (Fator 1 vs. Fator 2) para Análise dos Componentes Principais para o óleo de grainha de uva, com recurso às características: Rendimento (Rend); Composição em ácidos gordos (AG); Acidez e Absorvância a 232 nm (K_{232}) e a 270 nm (K_{270}). (À direita) Projeção das amostras no plano Fator 1 vs. Fator 2.	50
Figura 15 – (À esquerda) Projeção de variáveis no plano (Fator 1 vs. Fator 3) para Análise dos Componentes Principais para o óleo de grainha de uva, com recurso às características: Rendimento (Rend); Composição em ácidos gordos (AG); Acidez e Absorvância a 232 nm (K_{232}) e a 270 nm (K_{270}). (À direita) Projeção das amostras no plano Fator 1 vs. Fator 3.	50
Figura 16 - (À esquerda) Projeção de variáveis no plano (Fator 1 vs. Fator 2) para Análise dos Componentes Principais para o óleo de grainha de uva, com recurso às características:	

Rendimento (Rend) e Composição em ácidos gordos (AG). (À direita) Projeção das amostras no plano Fator 1 vs. Fator 2. 52

Figura 17 - (À esquerda) Projeção de variáveis no plano (Fator 1 vs. Fator 3) para Análise dos Componentes Principais para o óleo de grainha de uva, com recurso às características: Rendimento (Rend) e Composição em ácidos gordos (AG). (À direita) Projeção das amostras no plano Fator 1 vs. Fator 3. 52

Figura 18 – Dendogramas da Matriz 1 (amostras descritas por todas as variáveis consideradas) e da Matriz 2 (amostras descritas pelas variáveis rendimento e composição em ácidos gordos). 53

1. Enquadramento do tema e objetivos

A gestão dos subprodutos da indústria agro-alimentar representa um problema na eliminação de resíduos (Ezejiófor *et al.*, 2014), devido à produção excessiva e aproveitamento limitado por parte da indústria (Fiori *et al.*, 2014). Porém, pela sua composição em compostos bioativos como os carotenoides, fenóis, vitaminas, ou fitoesteróis, alguns dos quais com propriedades desejáveis para a saúde. Estes resíduos apresentam potencial para a suplementação alimentar animal e humana e/ou para produção de bioenergia (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996; Kohno *et al.*, 2004; Lenucci *et al.*, 2013), o que aumenta o interesse comercial da maioria dos resíduos da indústria, a par da sustentabilidade ambiental e económica (González-Paramás *et al.*, 2004; Vági *et al.*, 2007).

A cultura de vinha (*Vitis vinifera L.*) é uma das mais importantes em todo o mundo. De acordo com os últimos dados estatísticos da FAO, em 2016 a produção de uva a nível mundial foi de 77 438 929 t, por uma área de cultivo de 7 096 741 ha. Em Portugal, o país do mundo com maior percentagem de área ocupada por vinha (IOV, 2014), 178 986 ha da área de cultivo destinaram-se à produção de uva (818 871 t), dos quais, 603 327 t direcionados ao setor vitícola. (FAO, 2014).

A nível mundial, mais de 3 milhões de toneladas de grainhas de uva são descartadas e em Portugal cerca de 47 000 ton (Fernandes *et al.*, 2013). De acordo com Fernández *et al.*, (2010), geralmente mais de 20% da produção de uva na atividade vinícola, torna-se resíduo, que deve ser progressivamente visado de aproveitamento e, de valorização económica. O bagaço de uva, é o resíduo mais abundante da indústria vinícola, constituído pelas peles e grainhas da uva (Monrad *et al.*, 2010; Spigno *et al.*, 2017; Syed *et al.*, 2017), a partir das quais é possível extrair substâncias como proteínas, elementos com propriedades antioxidantes, como os taninos e outros compostos fenólicos, e o óleo de grainha de uva (Bracht *et al.*, 2015), cujo teor varia de 8 a 20%, dependendo da variedade de uva (Ahmadi & Siahshar, 2011; Baydar & Akkurt, 2001; Campos *et al.*, 2008; Göktürk *et al.*, 2007; Luque-Rodríguez *et al.*, 2005; Martinello *et al.*, 2007; Sabir *et al.*, 2012).

“Óleo de grainha de uva”, é um óleo alimentar obtido da semente de *Vitis vinifera L.*, e destaca-se pela sua composição, em que apresenta um elevado teor em ácido linoleico, ácido gordo essencial (entre 58 a 78%), um conteúdo em ácido oleico de 12 a 28% e pobre em ácidos gordos saturados, que varia entre 6 a 11% para o ácido palmítico e 3 a 7% para o ácido esteárico (CODEX STAN 210 - 1999). A estrutura dos óleos vegetais é um fator de grande interesse, por apresentar frequentemente triglicéridos constituídos maioritariamente por ácido oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3), esteárico (C18:0) e palmítico

(C16:0)(Clark *et al.*, 2017). A composição em ácidos gordos do OGU é uma das principais características que tornam pertinente a utilização deste óleo na alimentação, com benefícios para a saúde. Para além da referida utilização, apresenta interesse para as indústrias química e farmacêutica (Bracht *et al.*, 2015). Como óleo vegetal, é também reconhecida a aplicação como matéria-prima para polímeros, por serem viáveis ambientalmente, renováveis anualmente e pela elevada pureza (Mythili *et al.*, 2014).

As preocupações existentes relativamente à proteção do ambiente e aos diversos impactos da atividade agrícola levam a que o aproveitamento da grainha de uva pela indústria de extração de óleos vegetais seja uma opção cada vez mais racional.

Por tais factos, o direcionamento de resíduos da vinificação e o conhecimento da sua contribuição e composição constitui uma solução para a redução do impacto ambiental que lhe está inerente e uma fonte de expressão económica, tornando o setor vitivinícola sustentável.

Segundo Spigno *et al.*, 2017, existem em Portugal, dois projetos de valorização e gestão de resíduos do processamento de uva, nomeadamente o *WINESENSE* e o *SUSTAVINO*.

O presente estudo tem como objetivo geral a caracterização de grainhas de uva de 29 castas, - sete internacionais e vinte e duas portuguesas – através da análise do seu teor em óleo, respetiva qualidade e composição em ácidos gordos. Todas as amostras foram gentilmente cedidas pelo Pólo de Dois Portos do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária e provêm de uvas de ensaios aí conduzidos sob idênticas condições edafo-climáticas. Este trabalho é pioneiro no estudo de grainhas de uva de castas portuguesas e pretende avaliar quais as castas mais promissoras com vista à extração industrial de óleo, compostos de importância, e rendimento em óleo, fator preponderante para a análise da viabilidade de uma extrapolação para a escala industrial.

O método utilizado para obtenção do óleo foi o de extração por solvente de Soxhlet, o qual foi otimizado. Do óleo extraído pretende-se determinar a sua composição em ácidos gordos maioritários, a cor/características cromáticas e os parâmetros de qualidade associados: acidez e índice espectrofotométrico, ou seja, produtos de oxidação primária e secundária.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Introdução

A Indústria Alimentar tem vindo a posicionar-se como a principal atividade da produção industrial nacional, representando 14,9% da produção total da Indústria Transformadora (INE, 2017). Destaca-se o aumento do valor das vendas de 45 milhões de euros na atividade da “produção de óleos e gorduras animais e vegetais”, observado em 2015, face a 2014. A produção de “óleos refinados e suas frações, não quimicamente modificados (soja, azeite, girassol, óleos alimentares e outros)” totalizou em 2015, 350 893 ton, das quais 126 376 ton foram vendidas, o que se traduziu num valor de vendas de 95 358 000 de euros (INE, 2017).

No ano de 2016 a previsão da produção nacional de vinho era de 6009 000 hL, equivalente a 2% da produção mundial (IVV, 2018), cujo valor efetivamente observado, segundo o INE, foi de 5840 000 hL (INE, 2017).

A principal razão para que os resíduos da atividade vinícola sejam extremamente poluentes é o seu alto conteúdo em matéria orgânica, havendo necessidade de um tratamento prévio à sua descarga no meio ambiente. O que torna extremamente importante a recuperação e reutilização das grainhas de uva (González-Centeno *et al.*, 2010).

Segundo Spigno *et al.*, (2017), algumas adegas estão providas da sua própria planta de tratamento de águas, enquanto outras contratam os serviços municipais para o efeito. A indústria vinícola conta com um caminho ainda a percorrer na compreensão e minimização dos riscos ambientais que a atividade traduz.

Apresentam-se na Tabela 1, os principais subprodutos resultantes da vinificação, segundo Costa e Belchior (1972), que referem que na produção de 100 litros de vinho branco são obtidos 31,17 kg de subprodutos, e 25 kg para o mesmo volume de vinho tinto.

Tabela 1 - Composição dos subprodutos, em kg/hL (Costa e Belchior, 1972).

	Vinho branco	Vinho tinto	Média
Engaço	4	3	3,5
Bagaço	17	13,5	14,5
Grainha	4	4	4
Borras	6	4,4	4,6

2.2. Definições, classificações e propriedades físico-químicas dos lípidos

A definição de “lípidos” não é exata. A definição apresentada por Christie (1982) refere os lípidos como “uma grande variedade de produtos naturais incluindo ácidos gordos e os seus derivados, esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliares, os quais têm em comum a solubilidade instantânea em solventes orgânicos como éter dietílico, hexano, benzeno, clorofórmio ou metanol”. Outras definições acrescentam ainda que se trata de um grupo heterogêneo de substâncias insolúveis em água e estão presentes ou são derivados de organismos vivos (Akoh, 2002). Algumas dificuldades têm surgido relativamente às definições baseadas na solubilidade dos lípidos, alguns compostos que são considerados lípidos, como os ácidos gordos de cadeia muito curta, são completamente miscíveis com água e solventes polares.

Segundo a FAO (2018), os lípidos têm uma nomenclatura associada ao grupo de compostos gordos solúveis encontrados nos tecidos de plantas e animais, e são amplamente classificados como gorduras, fosfolípidos, esfingomielinas, ceras e esteróis, cujas definições são:

- **Gorduras** são os ácidos gordos esterificados de glicerol e o armazenamento primário de energia dos animais.
- **Fosfolípidos** são os ésteres de ácidos gordos e o ácido fosfatídico, sendo os principais constituintes lipídicos das membranas celulares permitindo que as superfícies das membranas sejam hidrofóbicas ou hidrofílicas, dependendo da composição dos meios intra e extracelular.
- **Esfingomielinas** são os ácidos gordos ésteres da esfingosina, estão presentes no cérebro e em compostos do tecido nervoso.
- **Ceras** são ácidos gordos esterificados de alcoóis de cadeia longa, podendo ser metabolizados para energia.
- Os **esteróis** são alcoóis policíclicos de cadeia longa e fazem parte de diversos sistemas hormonais.

A Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA) alterou a definição de “lípidos” baseada na perspectiva de solubilidade para “ácidos gordos totais expressos em triacilgliceróis” (Akoh, 2002).

Nutricionalmente, os lípidos são de extrema importância por constituírem uma fonte de energia, cerca de 9 kcal/g. Numa abordagem tecnológica, têm ação ao nível da textura de alimentos, palatabilidade e promovem a sensação de saciedade.

Uma possível classificação dos lípidos é baseada nas propriedades físicas (consistência e forma em que se apresentam), à temperatura ambiente (20 °C) – em que, os óleos são líquidos e as gorduras são sólidas ou pastosas; na respetiva polaridade – lípidos polares ou apolares; no carácter essencial para os humanos – ácidos gordos essenciais ou não essenciais, ou, na sua estrutura (simples ou complexos).

Relativamente à classificação por polaridade, os lípidos neutros incluem os ácidos gordos, alcoóis, glicéridos e esteróis, enquanto que, os polares incluem os glicerofosfolípidos e os gliceroglicolípidos. Esta classificação poderá ser arbitrária, pois alguns ácidos gordos de cadeia curta são muito polares. Deste modo, a classificação por estrutura é preferível (Akoh, 2002).

A classificação por estrutura agrupa os lípidos em três classes: simples, conjugados ou derivados. Os lípidos derivados incluem os ácidos gordos e os alcoóis, que são unidades estruturais para os lípidos simples e complexos. Em termos gerais, os lípidos simples podem ser hidrolizados em dois componentes, normalmente num ácido e alcoól, estes incluem os acilglicéridos, esteróis e os seus ésteres, e ésteres de ceras. Os lípidos complexos incluem os glicerofosfolípidos (fosfolípidos), gliceroglicolípidos (glicolípidos) e os esfingolípidos. A sua hidrólise resulta em três ou mais compostos distintos (Akoh, 2002).

Os ácidos gordos saturados, como o metanoico, etanoico e propanoico são pouco comuns em gorduras naturais e são frequentemente omitidas das definições de lípidos. Todavia, são encontrados não esterificados em diversos produtos alimentares (Akoh, 2002). Os ácidos gordos saturados são frequentemente relacionados com o aumento do risco de doenças cardiovasculares, ainda que, não exista qualquer estudo científico que prove até à data, que todas as gorduras que tenham ácidos gordos saturados propulsionem este tipo de doenças, pois as respostas do colesterol metabólico e sérico aos ácidos gordos saturados são distintas (Mitchell *et al.*, 1989).

Relativamente aos ácidos gordos insaturados, o grau de insaturação de uma gordura é diretamente proporcional à sua degradação oxidativa. O ácido gordo monoinsaturado mais comum é o ácido oleico (C18:1), porém mais de 100 ácidos gordos monoinsaturados foram identificados na natureza, sendo a dupla-ligação localizada mais frequentemente na posição $\Delta 9$. Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são descritos de acordo com a interconversão que o seu metabolismo permite. O perfil essencial dos ácidos gordos $\omega 6$ é conhecido desde os finais do Séc. XX (Akoh, 2002). Uma deficiência em $\omega 6$

poderá provocar um crescimento débil, perdas de água a nível da epiderme, dificuldades de cicatrização e reprodução. Nem todos os PUFA são essenciais. As plantas são capazes de produzir, pela síntese *de novo* e interconverter as famílias de ácidos gordos ω_6 e ω_3 através de desaturases específicas nas posições $\Delta 12$ e $\Delta 15$. Os animais têm enzimas desaturases $\Delta 5$, $\Delta 6$ e $\Delta 9$ e são incapazes de produzir os ácidos gordos ω_3 e ω_6 pela síntese *de novo* (Akoh, 2002). O ácido gordo ω_6 mais comum na alimentação humana é o ácido linoleico (18:2). Os PUFA têm incidência na redução de doenças cardiovasculares e cancro e por isso são componentes recomendáveis na dieta humana (Yi *et al.*, 2009).

Os acilgliceróis são os constituintes maioritários nos óleos e gorduras de interesse comercial. O glicerol pode ser esterificado em um, dois ou três ácidos gordos, podendo cada ácido gordo estar localizado em diferentes carbonos do glicerol, e consoante o número de ácidos gordos possuem a terminologia de monoacilglicerol, diacilglicerol e triacilglicerol (Akoh, 2002).

As ceras são ésteres de ácidos gordos e de alcoóis de cadeia longa. As ceras simples são ésteres de ácidos gordos de cadeia média, como 16:0, 18:0, 18:1 ω_9 , e de alcoóis alifáticos de cadeia longa. Estas são encontradas na superfície de animais, plantas e insetos, com funções de prevenção da perda de água. As ceras complexas são formadas a partir de dióis ou alcoóis ácidos. Nos alimentos, a sua aplicação surge como aditivo e inclui, a título de exemplo, a cera de abelhas (Akoh, 2002).

A classe de esteróides de compostos orgânicos inclui esteróis de importância na química dos lípidos. Os esteróis são uma subcategoria dos esteróides, que exclui as hormonas esteróides e os ácidos biliares. Os esteróis podem ser derivados de plantas (fitoesteróis) ou de animais (zooesteróis), encontrando-se amplamente distribuídos e de importância nas membranas celulares (Akoh, 2002).

Os fosfolípidos são compostos por glicerol, ácidos gordos, fosfato, e usualmente uma base orgânica ou um composto poli-hidróxido (Akoh, 2002).

Os ácidos gordos *trans* incluem qualquer ácido gordo insaturado que contenha a ligação dupla na geometria da configuração *E* (*trans*). A nomenclatura difere apenas da conformação *cis* na configuração da dupla ligação. As três principais origens dos ácidos gordos *trans* na dieta humana são a bacteriana, óleos desodorizados e óleos parcialmente hidrogenados, cuja origem representa a proveniência preponderante dos ácidos gordos *trans* na dieta. A hidrogenação é utilizada para promover a estabilidade oxidativa em óleos e produzir gorduras com propriedades plásticas a partir de óleos. Quando o processo de hidrogenação é parcial origina-se uma mistura de isómeros geométricos e posicionais. Os

isômeros geométricos dos ácidos gordos essenciais linoleico e linolénico foram reportados, pela primeira vez, em óleo de sementes de colza (Akoh, 2002).

As vitaminas lipossolúveis são as vitaminas A, D, E e K. A vitamina A existe na dieta em diversas formas, em que a mais bioativa é a forma *trans* do retinol. As formas *cis* são criadas por isomerização induzida por luz. A vitamina A pode ser tóxica quando ingerida em níveis que excedem a dose diária recomendada. A vitamina D tem os respetivos componentes biologicamente ativos apenas nas formas D₂ e D₃. Os compostos de vitamina E incluem os tocoferóis e os tocotrienóis, em que estes últimos têm um sistema de trieno conjugado de ligação dupla na cadeia lateral fitil, enquanto que os tocoferóis não. A vitamina K₁ é encontrada em folhas verdes e a vitamina K₂ é sintetizada por bactérias intestinais. A deficiência em vitamina K é rara devido à síntese na microflora intestinal (Akoh, 2002).

2.3. Grainha de uva

As grainhas de uva representam a fração do fruto com concentrações mais altas de moléculas bioativas, o que duplica a perda por parte da indústria alimentar, do lucro da sua reutilização e valorização, bem como o custo do tratamento de resíduos (Durante *et al.*, 2017), que poderá, dependendo da casta e do método de processamento, contabilizar entre 8 a 20 % da descarga total (Dwyer *et al.*, 2014; Maier *et al.*, 2009; Schieber *et al.*, 2001). Considerando que as grainhas de uva são frequentemente descartadas do processo vinícola, a extração e venda dos respetivos óleo e extrato pode promover uma gestão eficiente deste resíduo da atividade (Da Porto *et al.*, 2013).

As grainhas de uva representam cerca de 5% da massa do fruto (Choi & Lee, 2009; Maier *et al.*, 2009) e relativamente ao bagaço de uva, a sua fração é em média 17 % da massa húmida e aproximadamente 45 % da massa seca (Fernandes *et al.*, 2013; Maier *et al.*, 2009; Oomah, Liang *et al.*, Mazza, 1998). Para Spigno *et al.* (2017), a grainha de uva é normalmente constituída por elevados teores de fibra, proteínas e lípidos. Segundo Garcia-Jares *et al.* (2015), a respetiva composição (m/m) é 40 % de fibra, 16% de óleo, 11 % de proteína, 7 % de compostos polifenólicos e outras substâncias como glúcidos e minerais.

Diversas referências reportam a aplicação das sementes de grainha de uva para recuperação do óleo e utilização como fibra antioxidante em alimentos (Aghamirzaei *et al.*, 2015; Correddu *et al.*, 2015; Gül *et al.*, 2013; Hajati *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Mironeasa *et al.*, 2016; Özvural & Vural, 2014). Stajić *et al.*, (2014) estudaram a utilização de óleo de grainha de uva na melhoria da qualidade de salsichas secas fermentadas.

Outra via de aproveitamento da grainha de uva inclui, como já citado, a obtenção de compostos fenólicos a partir do extrato, como o ácido gálico, a catequina e a epicatequina, e uma ampla gama de procianidinas (Maier *et al.*, 2009), associados ao potencial bioativo das uvas, pela sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerinogénica e antibacteriana (Bagchi *et al.*, 2000; Choi & Lee, 2009; Gris *et al.*, 2011; Spigno *et al.*, 2017; Stevenson & Hurst, 2007; Syed *et al.*, 2017). São também referenciadas propriedades de prevenção de doenças cardiovasculares (Leifert & Abeywardena, 2008; Teissedre *et al.*, 1996).

2.3.1. Humidade

O teor de humidade demonstra ser o fator que mais influência exerce no rendimento em óleo de sementes oleaginosas, pelo efeito na eficiência da extração do solvente (Singh & Bargale, 2000; Singh *et al.*, 2002). A secagem das sementes facilita e aumenta o rendimento do processo de extração na medida em que o contacto entre o solvente e o soluto a ser extratado é promovido (Fernández *et al.*, 2010; Tango *et al.*, 2004).

Existem referências que indiciam a influência no método de extração de óleo de Soxhlet, do teor de humidade e do tipo de solvente utilizado, com a salvaguarda de que as diferentes sementes oleaginosas poderão apresentar comportamentos distintos relativamente aos procedimentos empregues (Fornasari *et al.*, 2017).

Menezes (2015) estudou o processo de extração de óleo de grainha de uva, no qual observou que o maior rendimento foi obtido nas condições de secagem das grainhas a 80 °C e extratadas por 16 h.

Segundo Singh *et al.*, (2002), o maior rendimento em óleo bruto obtido a partir de uma semente oleaginosa, foi com um teor de humidade entre 8 a 8,5 %, com extração por prensa mecânica.

A informação relativamente ao teor de humidade das sementes associadas à extração pelo método de Soxhlet ainda é escassa (Fornasari *et al.*, 2017).

A determinação da humidade de óleos vegetais destinados ao consumo humano deve ser realizado de acordo com a ISO 662: 1998 (Codex STAN 210 - 1999).

2.3.2. Rendimento

O rendimento em óleo depende de uma variedade de fatores, desde o tipo de semente e condições agronómicas, ao tipo de solvente e à técnica de extração aplicada (Agostini *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2013; Luca Fiori *et al.*, 2014; Savoire *et al.*, 2013).

Fiori *et al.*, (2014) reportam que a casta utilizada tem maior influência no rendimento que o método de extração selecionado, com base em resultados estatisticamente significativos.

Na literatura existe uma variedade de estudos que indicam valores de rendimento e métodos de extração de OGU de diferentes castas (Tabela 2):

Tabela 2 - Métodos de extração de OGU e respetivo rendimento em óleo.

Rendimento (%)	Método de extração	Referência
3,95 – 12,4%	Soxhlet	Fernandes <i>et al.</i> (2013)
11,6 – 19,6 %	Soxhlet	Göktürk <i>et al.</i> (2007)
10,8 – 13,72 %	Soxhlet	Santos <i>et al.</i> (2011)
11,5%	Supercrítica (SC) - CO ₂	(Passos <i>et al.</i> , 2009)
14%	Soxhlet assistido por ultrasom	(Bonfigli <i>et al.</i> , 2013)
10,1 – 16,6 %	(SC) - CO ₂ e <i>n</i> -hexano, respetivamente	Luca Fiori <i>et al.</i> (2014)

De acordo com Temenuzhka *et al.* (2016), o rendimento em óleo das grainhas de uva considera-se baixo, em comparação com outras sementes oleaginosas.

2.3.3. Extração

O solvente para uma extração deve ser escolhido de acordo com as características químicas e físicas da matriz e com atenção relativamente à segurança ambiental e humana da sua utilização (Brum *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010).

A extração por solvente (*n*-hexano ou éter de petróleo) é o método clássico de extração de OGU por atingir maior rendimento em óleo (99,3%) que o método mecânico de prensagem (75–85%) (Ofori-Boateng *et al.*, 2012), que é limitado tecnologicamente devido ao baixo teor em óleo da grainha de uva (Crews *et al.*, 2006; Fiori *et al.*, 2010; Luque-García *et al.*, 2004; Luque-Rodríguez *et al.*, 2005; Matthäus, 2008; Molero Gómez *et al.*, 1996).

Os solventes éter de petróleo, metanol e *n*-hexano apresentam resultados satisfatórios para a extração de lípidos de amostras sólidas (Manirakiza *et al.*, 2001). Porém, o hexano é um solvente não-polar, e por isso, menos eficaz na extração de lípidos (polares) que outros solventes mais polares (Fornasari *et al.*, 2017). Adicionalmente, de acordo com Heleno *et al.*, (2016), a extração de compostos como o ergosterol e polifenóis (não-polares) com etanol (polar) como solvente é eficiente devido às características de polaridade.

O método de extração de Soxhlet fundamenta-se no contacto permanente das matrizes do solvente e da amostra por evaporação e condensação, promovendo a transferência dos componentes solúveis de um material inerte para o solvente (Fornasari *et al.*, 2017). Deste modo, o referido método de extração é adequado para óleos, uma vez que, enquanto a amostra permanece imersa no solvente, este permanece em sifonamento cíclico. Assim, o solvente é renovado constantemente, o que aumenta o gradiente de concentração do óleo entre o solvente e a amostra (Fornasari *et al.*, 2017). Uma desvantagem deste método é a quantidade elevada de tempo para a conclusão do processo

de extração (Luque-Rodríguez *et al.*, 2005). O rendimento deste método está sujeito à perda de óleo durante o processo de redução de dimensões (Fornasari *et al.*, 2017).

A prensagem seguida de extração por solvente (*n*-hexano) é o método de extração mais amplamente utilizado em sementes oleaginosas e também da grainha de uva. E que contribui aproximadamente com 50 % da produção mundial de óleo vegetal (Bhosle & Subramanian, 2005; Eikani & Fereshteh, 2009).

São referidos na literatura, os seguintes métodos alternativos de extração de óleo ao método por solvente:

- O óleo extraído para fins comerciais pode ser obtido por métodos físicos, como a prensagem hidráulica (Pardo *et al.*, 2009), apesar do rendimento em óleo ser inferior (55 a 95 % de acordo com a matéria-prima) garante uma qualidade superior do óleo, pelas temperaturas envolvidas serem inferiores e por não haver resíduos de solvente no óleo (Lutterodt *et al.*, 2011; Singh & Bargale, 2000);
- Solvente sobreaquecido, que combina a temperatura e a pressão com solventes líquidos para uma extração mais eficiente de óleos vegetais comestíveis e de analitos de distintas matrizes (Eikani & Fereshteh, 2009);
- Supercrítica com CO₂, que pode apresentar uma alternativa pelo rendimento em óleo alcançado, comparável à extração por solvente. Pelo solvente utilizado, o CO₂, que é não-tóxico, não-inflamável, não-poluente, mais barato, e por não permanecerem resíduos no óleo. Porém, o custo de investimento é elevado em comparação com outros métodos de extração (Fiori *et al.*, 2014).

Outros fatores para além do método de extração podem influenciar o rendimento em óleo de sementes oleaginosas, como a variedade e as práticas agrícolas.

2.4. Caracterização do óleo

Diversos valores têm sido reportados relativamente ao teor em óleo das grainhas de uva. Vários referem que este varia entre 8 e 20% em matéria seca, dependendo da casta e das condições agroclimáticas (Ahmadi & Siahsar, 2011; Baydar & Akkurt, 2001; Campos *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2017; Göktürk *et al.*, 2007; Luque-Rodríguez *et al.*, 2005; Martinello *et al.*, 2007; Sabir *et al.*, 2012). Uma gama mais reduzida de valores para o conteúdo em óleo foi reportada por Rombaut *et al.* (2015), de 13 a 15 % em matéria seca. De acordo com Fernández *et al.* (2010), as grainhas de uva contêm cerca de 10-20 % de óleo, o qual é normalmente extraído com solvente e refinado antes da sua utilização para remover

matérias indesejadas, de forma a minimizar perdas de óleo e sem afetar possíveis componentes de interesse, como os tocoferóis.

Izzo & Muratore (1993) referem que o conteúdo lipídico de uvas de castas tintas é superior ao de uvas de castas brancas.

A característica de principal do OGU é a sua composição em ácidos gordos, pelo seu benéfico valor nutricional devido à riqueza em ácidos gordos insaturados (superior aos óleos de girassol, cártamo e milho) (Baydar & Akkurt, 2001; Cao & Ito, 2003), especialmente em ácido linoleico (18:2), 72–76%, m/m (Fernández *et al.*, 2010; Maier *et al.*, 2009; Martinello *et al.*, 2007), ácido gordo essencial para o metabolismo humano devido à ausência de enzimas responsáveis pela sua biossíntese (Hanganu *et al.*, 2012). Seguido do ácido oleico (18:1) 10–20%, m/m e, dos ácidos gordos esteárico (18:0) e palmítico (C16:0), presentes em quantidades inferiores (Crews *et al.*, 2006; Domínguez *et al.*, 2017; Lutterodt *et al.*, 2011).

O ácido linoleico é um PUFA pertencente ao grupo ómega-6 com importantes funções no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso e de funções fisiológicas nos humanos, nomeadamente na prevenção da doença cardiovascular (Lachman *et al.*, 2015; Wijendran & Hayes, 2004). O ácido oleico é um MUFA ómega-9 importante na nutrição humana, que apoia na redução dos níveis do colesterol *LDL* e do índice glicémico (Rubio *et al.*, 2009).

O OGU é indicado para a fritura de alimentos, devido ao seu elevado “*smoking point*” (190 a 230 °C), para molhos e temperos, ou para produzir detergentes, sabões e cosméticos pelas suas propriedades hidratantes para a pele (loções corporais, produtos capilares, bálsamos labiais, entre outros), associadas aos ácidos gordos saturados esteárico e palmítico (Bail *et al.*, 2008; Da Porto *et al.*, 2013; Domínguez *et al.*, 2017).

O óleo de grainha de uva em estado bruto é vendido a refinarias para produzir óleo refinado.

A produção de óleo de grainha de uva tem maior representatividade em Itália, França e Espanha e a procura deste óleo vegetal tem aumentado no resto da Europa (Crews *et al.*, 2006; Kamel *et al.*, 1985).

O líder mundial na produção de OGU é a empresa Italiana Tampieri SpA, com uma produção anual de óleo de 10 000 ton, a partir de 70 000 ton de grainhas de uva prensadas, previamente separadas do bagaço de uva destilado (Spigno *et al.*, 2017).

2.4.1. Composição em ácidos gordos

Os valores reportados relativamente ao conteúdo em óleo de grainha de uva são praticamente constantes, independentemente da variedade e método de extração (Beveridge *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2013; Lutterodt *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2012; Sabir *et al.*, 2012).

A composição em ácidos gordos do óleo de grainha de uva apresenta, relativamente ao conteúdo, a sequência: PUFA, MUFA E SFA, por ordem decrescente (Beveridge *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2013; Labuschagne & Hugo, 2010; Lachman *et al.*, 2015; Luque-Rodríguez *et al.*, 2005; Lutterodt *et al.*, 2011; Matthäus, 2008; Pardo *et al.*, 2009; Tangolar *et al.*, 2009). Segundo Tangolar *et al.* (2009), a composição em ácidos gordos maioritários, determinada por cromatografia gasosa, distribui-se em ácido linoleico (C18:2), ácido oleico (C18:1), palmítico (C16:0) e esterárico (C18:0), representando 67,2 %, 22,1 %, 7,0 % e 3,0 %, respetivamente (Řezanka & Řezanková, 1999). Note-se que, Crews *et al.* (2006) demonstraram diferentes proporções de ácidos gordos de OGU de França, Itália e Espanha.

A norma designada pelo (Codex STAN 210 – 1999) para a determinação da composição em ácidos gordos por cromatografia gás-líquido é a ISO 5508: 1990.

2.4.2. Acidez

A acidez dos óleos é provocada pela presença de ácidos gordos livres (FFA), como resultado da hidrólise dos triacilgliceróis, por ação química ou enzimática, e catalisada pela temperatura. A hidrólise e a oxidação são as principais reações degradativas que ocorrem durante o armazenamento dos óleos.

O Codex STAN 210 – 1999 estabelece o limite de 0,6 mg KOH/g de óleo, para a acidez do óleo de grainha de uva (refinado), apto a consumo humano. A respetiva determinação encontra-se estandardizada na ISO 660: 1996.

2.4.3. Compostos de oxidação

Os lípidos presentes nos alimentos, quando em contacto com o oxigénio, degradam-se a diferentes taxas, o que resulta em alterações sensoriais e nutricionais. A oxidação dos

lípidos insaturados é a principal responsável pela degradação lipídica e produção do *flavour* a ranço, o que diminui o respetivo valor nutricional e económico, e consequentemente representa um problema de segurança e qualidade alimentar (Lutterodt *et al.*, 2011).

A reação de oxidação lipídica abrange duas etapas principais: o período de indução em que se formam hidroperóxidos (com ligações-duplas trans conjugadas) e o período de oxidação final em que os hidroperóxidos se dividem em compostos orgânicos aromáticos de cadeia curta (maioritariamente aldeídos, cetonas, alcoóis e ácidos gordos livres de cadeia curta), responsáveis pela rancidez (Sherwin, 1978).

A composição em ácidos gordos e a presença de componentes antioxidantes, como os tocoferóis e os esteróis, influenciam a estabilidade oxidativa de um óleo (Rodrigues *et al.*, 2013).

Apesar das reações de degradação oxidativa e hidrolítica serem diferentes, estas parecem interagir entre si e contribuir para a redução do tempo de prateleira do óleo. Frega *et al.* (1999) reportam esta interação em óleo de grainha de uva refinado.

2.4.4. Cor

A caracterização dos óleos vegetais através da cor e características cromáticas é um dos parâmetros essenciais na avaliação da qualidade dos óleos (Giacomelli *et al.*, 2006), como indicador de possíveis fraudes ou adulterações, é também relevante no controlo do custo do processo de refinação, na perceção do aspeto e da qualidade do produto final (Giacomelli *et al.*, 2006). Como também na determinação da pureza, da estabilidade e da degradação no armazenamento (Criado *et al.*, 2004).

Alguns fatores podem contribuir para a elevada pigmentação de alguns óleos vegetais, como danos causados na colheita, armazenamento e manuseamento impróprios durante o processamento (Giacomelli *et al.*, 2006).

De acordo com o Codex STAN 210 – 1999, a cor do óleo deverá ser característica do produto designado.

A Norma Portuguesa 937/1987 fixa o processo para a determinação de cor e características cromáticas dos óleos comestíveis pelo método triestimular da Comissão Internacional de Iluminação (Commission Internationale de L'éclairage, C.I.E.).

O método triestimular permite uma melhor discriminação dos parâmetros de vermelho, amarelo e azul, que são normalmente utilizados na indústria dos óleos, pelo que, o uso dos sistemas CIE-1976 ($L^*a^*b^*$) ou CIELAB tem sido aceite na maioria das indústrias (Ceballos *et al.*, 2003).

Em suma, o aproveitamento do óleo de grainha de uva surge como uma possibilidade de valorização do resíduo da atividade vinícola portuguesa e de aumento do rendimento dos produtores. E ainda, permite inovar no que toca à alimentação humana e apresentar uma solução para a questão ambiental inerente (Fernandes *et al.*, 2013; Göktürk *et al.*, 2006).

3. Materiais e métodos

3.1. Matéria-prima

As grainhas de uva de todas as castas foram obtidas de ensaios experimentais realizados sob as mesmas condições edafo-climáticas da zona demarcada de Torres Vedras e fornecidas pelo INIAV (Pólo Dois Portos). As grainhas foram retiradas manualmente dos bagos de uva, limpas para remoção de resíduos do processamento vinícola e armazenadas a -18 °C até análise, pesadas (massa total de cada amostra) e identificadas por uma codificação numérica e respetiva abreviatura aplicável nos diversos procedimentos.

Foram rececionadas grainhas de uva de 29 castas distintas, que foram utilizadas nos ensaios do presente estudo (Tabela 3).

3.2. Determinação do teor de humidade das amostras

O cálculo do rendimento em óleo, em base seca, das grainhas de uva das distintas castas de requer o conhecimento do respetivo teor de humidade.

O método de determinação do teor de humidade é fundamentado pelo aquecimento da amostra sob condições estabelecidas, para eliminação da água, em que a diferença de massa é utilizada para o cálculo do teor de humidade (Nielsen, 2007).

O procedimento aplica-se a uma análise em triplicado.

A metodologia e aparato necessário à sua determinação apresentam-se descritos subsequentemente.

Material

- Grainhas de uva das distintas castas previamente descongeladas e secas à temperatura ambiente
- Placa de *Petri*, com respetiva tampa (previamente secas, a 100 °C, durante 3 h)
- Espátula de aço inoxidável
- Exsicador
- Luvas de plástico

Tabela 3 - Listagem das castas analisadas e respetivas codificação, abreviatura, casta e proveniência (Instituto da Vinha e do Vinho, 2017; Vine to Wine, 2018).

Código	Abreviatura	Nome	Casta	Proveniência
5	TN	Touriga Nacional	Tinta	Região Demarcada do Douro
6	CAST	Castelão	Tinta	IGP Lisboa, Tejo, Península de Setúbal e Alentejano.
7	TP	Trincadeira das Pratas	Branca	Ribatejo
8	S	Síria (Roupeiro Branco)	Branca	Alentejo
9	TERR	Terrantez	Branca	Madeira
10	MR	Malvasia Rei (Seminário)	Branca	Jerez, Espanha
11	GD	Galego Dourado	Branca	Carcavelos
13	VIT	Vital	Branca	Estremadura
14	TRI	Trincadeira	Tinta	DOP Douro, Porto e Trás-os-Montes e ainda IGP Beiras, Lisboa, Tejo, Península de Setúbal, Alentejano e Algarve, cultivando-se também na Austrália.
16	SY	Syrah	Tinta	França
18	T	Tália	Branca	Ribatejo
19	CB	Cerceal Branco	Branca	Beiras
20	P	Perrum	Branca	Espanha
21	CH	Chardonnay	Branca	França
22	A	Avesso	Branca	Baião
23	V	Verdelho	Branca	Madeira e Açores
24	SG	Sangiovese	Tinta	Itália
26	CS	Cabernet Sauvignon	Tinta	França
27	ALF	Alfrocheiro	Tinta	Diversas regiões do país com especial destaque na DOP Dão
28	ARI	Arinto	Branca	Em todo o país
31	FP	Fernão Pires	Branca	Ribatejo
32	MC	Malvasia Colares	Branca	DOC Colares
33	G	Gouveio	Branca	Douro
36	AZ	Azal	Branca	Amarante, Basto, Vale do Sousa
37	ANV	Antão Vaz	Branca	Alentejo
38	R	Rabigato	Branca	Trás dos Montes
41	RO	Rabo de Ovelha	Branca	Em todo o país, especialmente Ribatejo, Alentejo e Estremadura.
43	ARAG	Aragonez (Tempranillo, Tinta Roriz)	Tinta	Diversas regiões com especial destaque para as DOP Douro, Porto e Trás-os-Montes.
47	CER	Cercial	Branca	Bairrada

Equipamento

- Balança analítica, *KERN* ABJ-NM/ABS-N 220-4NM (sensibilidade = 0,1 mg)
- Estufa de laboratório, modelo ED 23, *Binder* USA (faixa de temperatura: 5 °C - 300 °C; capacidade 20 L)
- Exsicador

Procedimento

- 1) Pesou-se com exatidão o conjunto placa/tampa vazio devidamente identificado.
- 2) Colocou-se aproximadamente 3 g de amostra nessa mesma placa e registou-se o peso exato da placa tapada.
- 3) As placas foram colocadas na estufa (entreabertas) a 100 °C, durante 24 horas.
- 4) Transferiram-se as placas da estufa para o exsicador para que arrefecessem por cerca de 3 horas, até ao momento da pesagem das amostras.
- 5) Calculou-se a percentagem de humidade (m/m), pelos seguintes pontos:
 - a. $m(\text{placa} + \text{amostra húmida}) - m(\text{placa vazia}) = m(\text{amostra húmida})$
 - b. $m(\text{placa} + \text{amostra seca}) - m(\text{placa} + \text{amostra húmida}) = m(\text{água})$
 - c. $\text{Humidade}_{\text{base húmida}} (\%) = \frac{m(\text{água})}{m(\text{amostra húmida})} \times 100$ (1), em que m significa massa em gramas.

A determinação da humidade em base seca foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Humidade}_{(\text{base seca}, \%)} = \frac{m_{\text{água}} \times 100}{\text{massa de matéria seca}} \quad (2).$$

3.3. Método de extração

O óleo da amostra é extraído de modo semi-contínuo com o solvente orgânico, éter de petróleo. Este é aquecido e volatilizado, até condensar e gotejar sobre a amostra, embebendo-a. Em intervalos de aproximadamente 15 minutos, o solvente é sifonado, garantindo a limpeza deste e um volume constante no decorrer do processo.

O rendimento é medido pela massa de óleo extraída, sendo necessário à sua correção, o conteúdo de humidade da referente amostra.

Inicialmente realizou-se um ensaio de extração de óleo por solvente durante 8 horas para estabelecer o tempo adequado para extração do óleo. Os ensaios foram realizados em duplicado com grainhas da casta Vinhão.

Reagentes

- Éter de petróleo, CAS: 64742-49-0

Material

- Grainhas de uva das distintas castas previamente descongeladas e secas à temperatura ambiente
- Placas de Petri, previamente secas em estufa, a 100 °C, durante 24h e taradas
- Balões de ebulição, de 250 mL
- Cartuchos de extração de celulose
- Exsicador
- Proveta, de 500 mL
- Moinho, Moulinex LUXE, aço inoxidável, capacidade 85 g
- Luvas de plástico
- Espátula aço inoxidável
- Copo, com capacidade mínima de 15 g
- Funil
- Pipeta de *Pasteur*

Equipamento

- Balança semi-analítica, *Denver Instrument Company* TC-403 (sensibilidade = 0,001 g)
- Balança analítica, *KERN* ABJ-NM/ABS-N 220-4NM (sensibilidade = 0,1 mg)
- Extratores de Soxhlet, acoplados a: manta de aquecimento *Nahita*, Modelo 655, coluna de refrigeração *Julabo*, Modelo FL1203 e condensador
- Estufa de laboratório, modelo ED 23, *Binder* USA (faixa de temperatura: 5 °C - 300 °C; capacidade 20 L)

3.3.1. Otimização do processo

Procedimento

- 1) Pesaram-se as amostras de cada casta (c. a. 10 g).
- 2) Em seguida, as grainhas de uva foram trituradas num moinho de facas doméstico, e colocou-se aproximadamente 3 g de amostra em cada cartucho, identificado a lápis com os algarismos 1 e 2, correspondentes ao duplicado para cada hora.
- 3) Os cartuchos foram cobertos com 3 círculos de papel de filtro e algodão, seguidamente colocados individualmente num extrator de Soxhlet.
- 4) Colocaram-se 170 mL de éter de petróleo em cada balão de ebulição e realizou-se um ensaio de extração durante 8 horas, à temperatura de ebulição do solvente $\approx 60\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5) O excedente de solvente foi recuperado por evaporação do mesmo, previamente à respetiva reposição.
- 6) Após o decorrer de cada hora de extração, o conteúdo de solvente que se encontrava no balão foi transferido para uma placa de *Petri*. O volume de solvente é seguidamente repostado para que se reiniciasse o processo.
- 7) Para evaporação do solvente remanescente, as placas permaneceram na *hotte*, e em continuação, secas na estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 24h. De seguida, estas foram arrefecidas no exsiccador e pesadas.
- 8) Calculou-se o rendimento de extração, em base seca (em percentagem), correspondente a cada amostra de acordo com a Equação 3:

$$\frac{\text{Rendimento em óleo (\%,b.s.)} \times 100}{100 - \text{Humidade (\%)}} \quad (3).$$

3.3.2. Determinação do teor de óleo pelo método de Soxhlet

O procedimento de extração aplica-se a uma análise em triplicado, utilizando o método anteriormente descrito e considerando um tempo de extração de 5 horas, uma massa de amostra triturada de 23,5 g/cartucho e um volume de éter de petróleo de 235 mL.

3.4. Determinação da acidez do óleo

A presença de ácidos gordos livres num óleo é indicador de atividade de lipases e outras reações hidrolíticas (Akoh, 2002). O método clássico de determinação da acidez através do índice de acidez é definido como a quantidade em miligramas de KOH necessária para neutralizar os ácidos gordos livres em 1 g de amostra, ou da acidez, como a % de AGL expressos no ácido gordo maioritário nesse óleo (Akoh, 2002).

O teor de ácidos gordos livres é um parâmetro de qualidade do óleo que reflete a quantidade de ácidos gordos resultantes da hidrólise dos triacilgliceróis. No presente estudo, o grau de acidez é expresso em função do ácido linoleico e define-se a percentagem de ácidos gordos livres expressos no ácido gordo maioritário.

O método empregue é a titulação da amostra de óleo dissolvida em etanol e éter dietílico, com uma solução padrão de hidróxido de sódio (0,1 N) até ao ponto de viragem da fenolftaleína, usada como indicador.

O cálculo da acidez é efetuado utilizando o volume e a normalidade do hidróxido de sódio consumido, juntamente com a massa da amostra.

O seguinte procedimento aplica-se a uma análise em duplicado.

Reagentes

- Etanol a 96% (v/v), CAS: 64-17-5
 - Éter dietílico, CAS: 60-29-7
 - Fenolftaleína 1%, CAS: 77-09-8
 - Solução padrão 0,1N de hidróxido de sódio
- ❖ Preparação da solução dissolvente de etanol:éter dietílico, (1:1 v/v): para um balão de 1000 mL mediu-se 500 mL de etanol ao qual se adicionou 500 mL de éter dietílico.

Material

- Amostras de óleo de grainha de uva das distintas castas
- Pipetas de *Pasteur*
- Balão de *Erlenmeyer*, de 1000 mL

- Proveta, de 50 mL
- Bureta

Equipamento

- Balança analítica, *KERN* ABJ-NM/ABS-N 220-4NM (sensibilidade = 0,1 mg)

Procedimento

- 1) Em balões de *Erlenmeyer* de 100 mL pesou-se aproximadamente 1 g de cada amostra de óleo, com registo do valor exato.
- 2) Adicionou-se ao óleo 50 mL da solução de etanol+éter dietílico.
- 3) A solução padrão de NaOH (0,1 N) já se encontrava previamente colocada numa bureta, tendo sido apenas necessário registar o respetivo valor lido na bureta.
- 4) À solução de etanol+éter dietílico adicionaram-se 3 gotas de fenolftaleína e agitou-se. Em seguida e mantendo-se a agitação, titulou-se gota a gota com a solução de NaOH até ao surgimento de uma coloração cor de rosa persistente por 20-30 segundos. Registou-se o valor da leitura.
- 5) O cálculo da acidez de cada uma das amostras seguiu a equação (4):

$$Acidez (\%) = \frac{V \times N \times 280,4}{m} \times 100 \quad (4).$$

Em que:

A acidez, ou seja, a percentagem de ácidos gordos livres é expressa em função do ácido linoleico (g/100 g);

V é o volume de titulante, NaOH (em mL);

N é a normalidade do titulante, NaOH;

280,4 representa o peso molecular do ácido gordo dominante, neste caso, o linoleico (g/mol);

m corresponde à massa da amostra (g).

3.5. Determinação do índice espectrofotométrico

A análise por espectrofotometria de ultravioleta constitui um procedimento que permite obter informação relativamente ao estado de oxidação do óleo, ou seja, avaliar um parâmetro de qualidade.

Os lípidos são muito suscetíveis à autoxidação devido ao seu grau de insaturação. A autoxidação ocorre por propulsão do mecanismo de radicais livres que produz hidroperóxidos, os produtos primários de oxidação, que vão originar aldeídos, cetonas, alcoóis e hidrocarbonetos de cadeia curta (produtos secundários de oxidação). A presença dos últimos influencia a qualidade global de um lípido (Akoh, 2002).

Estas alterações podem ocorrer quando os lípidos se encontram expostos a determinadas condições (presença de oxigênio), durante o processamento ou armazenamento, das quais a principal consequência é a alteração do cheiro original, surgindo frequentemente o cheiro característico a ranço, constituindo uma provável fonte de rejeição (Ventura, 2014).

O espectro ultravioleta e visível dos compostos orgânicos é atribuído a excitações ou transições elétricas (Akoh, 2002). Constitui uma técnica para identificar, quantificar e caracterizar os analitos presentes nos óleos (Freitas, 2007).

A leitura de absorvância nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm está relacionada com a presença de produtos primários de oxidação (hidroperóxidos) e de produtos secundários de oxidação (AGL de cadeia curta, aldeídos, cetonas).

Reagentes

- 2,2,4-trimetilpentano, CAS: 540-84-1
- Éter de petróleo, CAS: 64742-49-0 (para limpeza da célula entre leituras)

Material

- Amostras de óleo de grainha de uva das distintas castas
- Balão volumétrico, 10 mL
- Pipeta de *Pasteur*
- Célula de quartzo, espessura 1 mm
- Esguicho de laboratório

Equipamento

- Balança analítica, *KERN* ABJ-NM/ABS-N 220-4NM (sensibilidade = 0,1 mg)
- Espectrofotômetro UV/Vis – *UNICAM*

Procedimento

- 1) Pipetou-se aproximadamente 0,1 g de cada amostra de óleo para um balão volumétrico de 10 mL e pesou-se o valor exato da toma.
- 2) Preez-se o restante volume do mesmo balão com 2,2,4-trimetilpentano e agitou-se.
- 3) Ajustou-se a absorvância a zero com o padrão/branco, o 2,2,4-trimetilpentano, colocando o mesmo nas respectivas ranhuras das células “*Sample*” e “*Reference*” do espectrofotómetro.
- 4) Procedeu-se à leitura de absorvância para os comprimentos de onda de 232, 268, 270 e 272 nm. Note-se que do maior valor de absorvância lido nos três últimos comprimentos de onda referidos (268, 270 e 272 nm), obtém-se a leitura associada aos 270 nm, a utilizar nos cálculos ulteriores.
- 5) Entre as leituras das distintas amostras, a célula foi limpa interiormente de resíduos de óleo com éter de petróleo e exteriormente nas faces em que incide o feixe de luz com papel absorvente, garantindo que esta não se encontrava suja ou com dedadas.
- 6) Para correção do valor de absorvância para uma solução de 1% de óleo, recorreu-se aos registos da massa correspondente a cada amostra para conversão da mesma para o valor real, cujo cálculo se apresenta na equação (5),

$$Abs_{real} = \frac{0,1 \times Abs_z}{m} \quad (5).$$

Em que Abs_z corresponde ao valor de absorvância obtido pela leitura do espectrofotómetro e m à respetiva massa de óleo utilizada na medição.

- 7) Os valores de absorvância são expressos por convenção em termos de extinção específica, cujo coeficiente se designa por k .

3.6. Determinação do perfil de ácidos gordos do óleo

A análise da composição de extratos de lípidos poderá requerer a separação de misturas complexas em componentes puros. Esta análise de compostos químicos, como os ácidos gordos, envolve a um nível primário métodos cromatográficos e espectroscópicos. A primeira abordagem consiste na separação dos lípidos nos seus diversos componentes quanto à polaridade, ou pode seguir-se, a análise de triacilgliceróis, esteróis, glicolípidos.

A técnica mais comum de cromatografia utilizada na análise de lípidos é a cromatografia gasosa. A qual envolve a separação dos componentes da mistura lipídica no estado de vapor entre a fase móvel gasosa e a fase líquida volátil não estacionária dispersa num suporte inerte.

O método de metilação rápida foi empregue para preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos e a cromatografia gasosa na determinação qualitativa e quantitativa do perfil dos ácidos gordos do óleo de grainha de uva. Para aumentar a volatilidade dos ácidos gordos, estes são derivatizados, como requisito para a respetiva análise. Os ácidos gordos *FAME (Fatty Acid Methyl Esters)* são preparados através de diferentes técnicas de transmetilação e posteriormente separados em colunas de cromatografia gasosa, e detetados por detetor de ionização de chama, *FID (Flame Ionization Detection)*. A fase gasosa é normalmente composta por azoto ou hélio. A identificação dos picos cromatográficos é baseada na comparação dos seus tempos de retenção com amostras padrão.

O seguinte procedimento aplica-se a uma análise em duplicado.

Reagentes

- *n*-Heptano, CAS: 142-82-5
- Metanol, CAS: 67-56-1
- Hidróxido de potássio, CAS: 1310-58-3
- ❖ Preparar uma solução de KOH 0,2 N, dissolvendo 11,2 g de KOH 0,02N em 100 mL de MeOH, com recurso ao magnete e à placa de agitação de laboratório.

Material

- Amostras de óleo de grainha de uva das distintas castas
- Tubos de plástico para centrífuga, com suporte
- Pipeta 10 mL
- Pompete
- Micropipeta, regulada para 0,5 mL e respetivas pontas
- Pipeta de *Pasteur*
- *Vials*

- Balão volumétrico de 100 mL
- Espátula
- Magnete
- Agitador magnético de laboratório
- Computador com *software* para aquisição e análise de dados, *Galaxie - VARIAN*

Equipamento

- Balança semi-analítica, *Denver Instrument Company TC-403* (sensibilidade = 0,001 g)
- Centrífuga *HERMLE Labortechnik*
- Unidade de cromatografia gasosa, ajustada às seguintes condições (Tabela 4):

Tabela 4 - Condições de operação da cromatografia gasosa

Instrumento	Cromatógrafo de gases <i>Varian 450-GC</i>
Coluna capilar	Supelco - 2380
comprimento	60 m
Diâmetro interno	0,2 µm
Df (espessura da fase estacionária)	0,25 µm
Gás portador	Hélio
Gás auxiliar	Hidrogénio
Injeção da amostra	1 µL
<i>Split</i>	1:1
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura do detetor	260 °C
Programa de temperatura	
Temperatura inicial do forno	165 °C
Tempo inicial	2,00 min
Velocidade de aquecimento	10 °C/min
Temperatura final	250 °C
Tempo final	62 min

Procedimento

I. Preparação dos ésteres metílicos – Método de metilação rápida

- 1) Pipetou-se 0,5 mL de óleo de grainha de uva e 0,5 mL da solução de metilato de K para um tubo de centrífuga.
- 2) Ao tubo anterior, adicionou-se com uma pipeta 10 mL de *n*-heptano.
- 3) Agitou-se por 1 minuto para dissolução do lípido.
- 4) Centrifugou-se o mesmo tubo por 15 minutos a 8000 rpm

- 5) Com recurso a uma pipeta de *Pasteur*, retirou-se a camada superior de heptano

II. Injeção das amostras no cromatógrafo gasoso

- 6) Injetou-se 1 μL da amostra no cromatógrafo
- 7) Para limpeza da coluna, antes da análise das amostras, injetou-se heptano e iniciou-se no computador o programa idêntico ao utilizado para as amostras.
- 8) Aquando da injeção manual, a seguinte foi enxaguada três vezes com heptano e com a amostra preparada no ponto I., pela ordem referida. Em continuação, injetou-se 1 μL de amostra presente no *vial* e primiu-se o botão de “início”.
- 9) Obteve-se deste modo o cromatograma dos ácidos gordos constituintes dos óleos das distintas castas analisadas.

3.7. Determinação da cor e características cromáticas

Esta análise foi realizada seguindo as diretrizes da Norma Portuguesa (NP 937) para gorduras e óleos comestíveis, com o objetivo de determinar espectrofotometricamente a cor do óleo, ou seja, as suas características cromáticas.

O método baseia-se na leitura de transmitâncias do óleo nos comprimentos de onda de 445, 495, 560 e 625 nm, relativamente ao tetracloreto de carbono, seguido do cálculo dos atributos necessários à definição da cor do óleo.

A colorimetria permite avaliar a cor de um produto alimentar de forma objetiva, dado ser considerado todo o espectro visível, o que permite obter o respetivo perfil real (Gariso, 2011). Segundo a *Commission Internationale de L'éclairage* (CIE), cor é um aspeto da perceção visual de um objeto distinto que um observador distingue mediante o tamanho, forma, textura, posição e brilho, dependendo os mesmos da posição espectral da luz incidente e também da geometria da ótica de visualização (Gariso, 2011).

Reagentes

- Tetracloreto de carbono para espectrofotometria

Material

- Amostras de óleo de grainha de uva das distintas castas

- Célula de quartzo, espessura de 1 cm
- Esguicho de laboratório
- Software informático – Vision Software
- Seringas para filtração
- Filtros de seringa 0,45 µm
- Papel absorvente

Equipamento

- Espectrofotômetro UV/Vis – *UNICAM*

Procedimento

- 1) Com recurso a seringas munidas de filtros de seringa, filtraram-se as amostras de óleo.
- 2) No espectrofotômetro ajustou-se a leitura de transmitância aos comprimentos de onda de 445, 495, 560, 595 e 625 nm utilizando o tetracloreto de carbono como líquido de referência.
- 3) Para cada leitura de absorvância transferiu-se o óleo filtrado para a célula de quartzo (enchendo até um volume que fosse possível o feixe de luz atravessar o óleo).
- 4) Entre as leituras das distintas amostras, a célula foi limpa interiormente de resíduos de óleo com éter de petróleo e exteriormente nas faces em que incide o feixe de luz com papel absorvente, garantindo que esta não se encontrava suja.
- 5) De acordo com a NP 937 calculam-se as coordenadas cromáticas, a transparência e a pureza.

3.8. Tratamento estatístico dos resultados

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado com recurso a ferramentas estatísticas como o *Software R*, para análise de variância das diversas características, e o *STATISTICA* da *StatSoft*, USA, versão 6, para a realização da análise em componentes principais e classificação hierárquica.

3.8.1. Análise de Variância

O tratamento estatístico dos resultados experimentais por análise de variância foi aplicado com o intuito de avaliar a influência de cada um dos parâmetros estudados do óleo

de grainha de uva das distintas castas: rendimento de extração, perfil de ácidos gordos, cor e características cromáticas, acidez e índice espectrofotométrico por absorvância no UV. A análise a cada variável aleatória (v.a.) independente foi efetuada através do modelo ANOVA a 1 fator (não equilibrado – diferente número de fatores em cada nível), com o grau de significância de $\alpha = 0,05$. O *software* estatístico utilizado foi o R – versão 3.4.2.

3.8.2. Análise de dados multivariada

A Análise em Componentes Principais (PCA) e a classificação hierárquica (Clustering) foram empregues na análise multivariada para a caracterização das amostras de óleo das distintas castas.

A identificação de grupos de amostras semelhantes nem sempre é simples através da Análise em Componentes Principais, pois as projeções são observadas num plano reduzido. Utilizou-se como medida de distância, a distância Euclidiana (coeficiente de similaridade entre amostras), e como método de ligação, o método de ligação simples (coeficiente de comparação) (Mirkin, 1997; Rencher, 2002).

4. Resultados e discussão

4.1. Teor de humidade

O teor de humidade das sementes foi um dos parâmetros físico-químicos analisados, por se tratar de um fator necessário no cálculo do rendimento em óleo das grainhas de uva, em base seca, e por ser um propulsor da decomposição do produto com efeito nas suas características.

Após a secagem das grainhas das distintas castas até massa constante, calcularam-se as respetivas percentagens de humidade (b. s.), apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Teor de humidade das grainhas das distintas castas com desvio padrão (em percentagem).

Cód.	Casta	Teor de humidade (%)
5	Touriga Nacional	22,6 ± 0,20
6	Castelão	15,0 ± 0,30
7	Trincadeira das patas	8,5 ± 0,03
8	Síria	10,0 ± 0,02
9	Terrantez	19,8 ± 1,20
10	Malvasia Rei (seminário)	14,0 ± 1,00
11	Galego Dourado	9,1 ± 0,03
13	Vital	20,0 ± 0,20
14	Trincadeira	10,3 ± 0,10
16	Syrah	9,6 ± 0,05
18	Tália	9,5 ± 0,04
19	Cerceal Branco	8,8 ± 0,09
20	Perrum	9,4 ± 0,03
21	Chardonnay	15,6 ± 0,30
22	Avesso	7,4 ± 0,02
23	Verdelho	9,8 ± 0,02
24	Sangiovese	10,9 ± 0,07
26	Cabernet Sauvignon	12,2 ± 0,03
27	Alfiocheiro	11,9 ± 0,08
28	Arinto	11,0 ± 0,50
31	Fernão Pires	7,5 ± 0,01
32	Malvasia Colares	14,5 ± 0,05
33	Gouveio	12,2 ± 0,00
36	Azal	17,7 ± 0,06
37	Antão Vaz	8,8 ± 0,10
38	Rabigato	11,4 ± 0,08
41	Rabo de Ovelha	18,7 ± 0,20
43	Aragonez	24,6 ± 0,30
47	Cercial	10,1 ± 0,20

O teor mínimo em água determinado nas sementes de uva corresponde à casta Avesso, com $7,4 \pm 0,02\%$ de humidade, e o máximo à variedade Aragonez que apresenta um teor de $24,6 \pm 0,30\%$. A média associada ao referido ensaio é de $12,9 \pm 4,6 \%$, indicador de dispersão por uma ampla gama de valores de humidade para as distintas castas.

O intervalo de resultados obtido inclui os valores determinados para este parâmetro por outros autores. Oomah *et al.* (1998) determinou o teor humidade de grainhas de uva da casta Merlot, como $12,6 \pm 0,1 \%$, Temenuzhka *et al.* (2016) reportou valores entre $6,2 \%$ e $8,2 \%$ para grainhas de castas búlgaras.

Tango *et al.*, (2004) refere que um prévio processo de secagem das grainhas não influencia o teor em óleo.

As diferentes humidades devem-se ao facto das grainhas estarem congeladas e haver possibilidade de terem absorvido água durante o período de armazenamento e a descongelação.

4.2. Rendimento em óleo

4.2.1. Otimização do tempo de extração

A Figura 1 apresenta a extração de óleo em aparelho de Soxhlet ao longo de 8h. Verifica-se que após 5 h de extração, a percentagem de óleo extraído, cerca de 8% (b.s.), torna-se praticamente constante. O ligeiro aumento da 5^a para a 6^a hora encontra-se possivelmente relacionado com o facto dos cartuchos de extração terem pernoitado submersos no solvente.

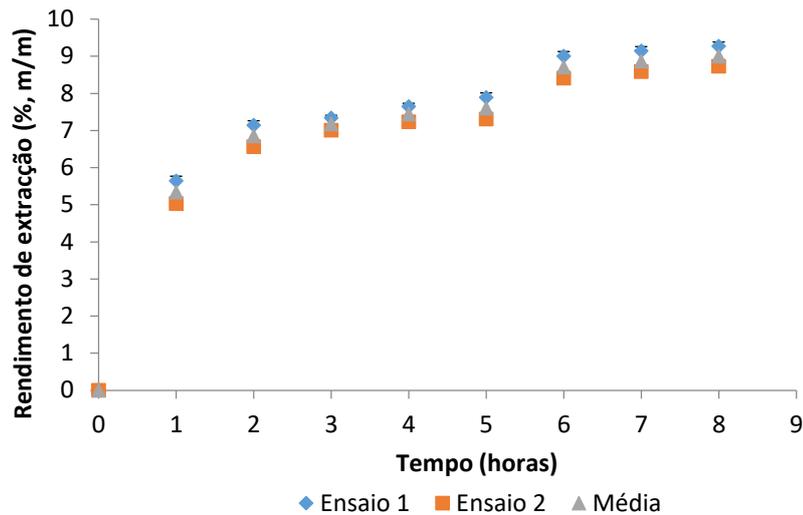


Figura 1 – Rendimento de extração de óleo ao longo do tempo de extração, em aparelho de Soxhlet, para a casta Vinhão.

Um processo de otimização do tempo de extração de óleo de grainha de uva, pelo método de Soxhlet, foi estudado por Fernández *et al.*, (2010), no qual o rendimento máximo em óleo foi obtido em 2 - 3h e o tempo de extração escolhido de 6 h.

4.2.2. Rendimento de extração pelo método de Soxhlet

O rendimento de extração é expresso como o rácio entre a quantidade de óleo extraído e a quantidade de grainha de uva (em base seca), colocada no extrator de Soxhlet.

A Figura 2 apresenta os valores de rendimento em óleo das grainhas das diferentes castas (b.s.), cultivadas sob as mesmas condições edafo-climáticas.

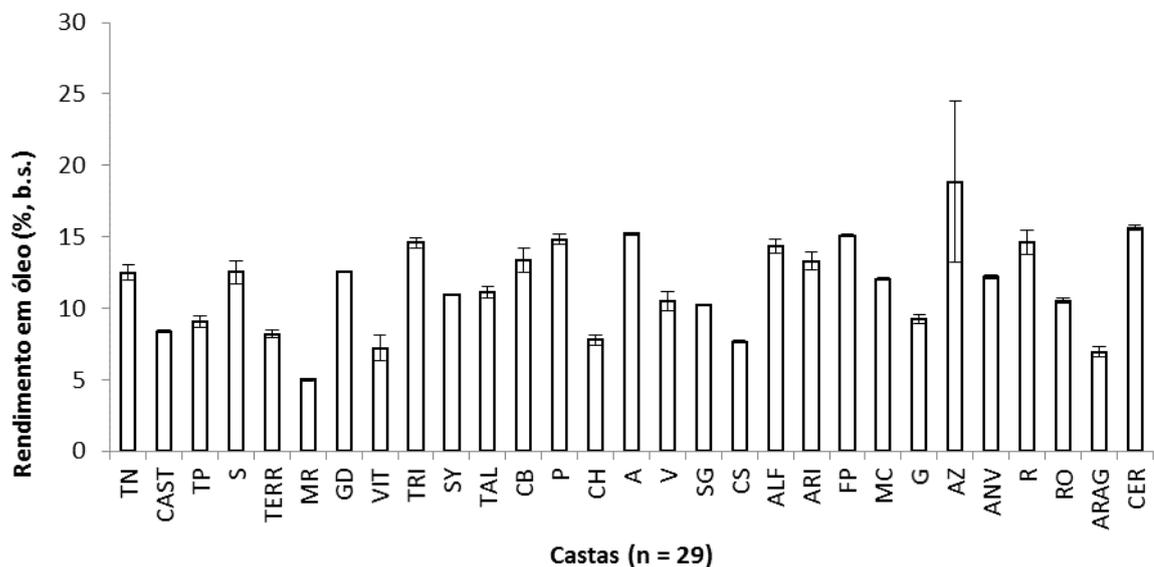


Figura 2 - Rendimento em óleo, em percentagem, das grainhas das distintas castas (Barras de erro com desvio padrão. Os códigos das amostras encontram-se na Tabela 5).

Por análise dos resultados verifica-se que, das castas analisadas e nas condições empregues, o rendimento de extração de óleo varia entre $5,00 \pm 0,15$ a $18,84 \pm 0,62$ %, em que os valores extremos são relativos às castas Malvasia Rei e Azal, respetivamente.

Lachman *et al.*, (2015) avaliaram o rendimento em óleo de grainhas de uva de diferentes castas. Os valores variaram entre $3,91 \pm 0,04$ % para a casta Zenit e $17,32 \pm 0,11$ % para a casta Chardonnay, também avaliada no presente estudo e cujo rendimento em óleo foi de $7,8 \pm 0,05$ %. Apesar de se tratar da mesma casta, os fatores agro-culturais também exercem um efeito significativo no rendimento em óleo (Fernandes *et al.*, 2013; Fiori *et al.*, 2014). Valores em concordância com os obtidos, como $14,6 \pm 0,1$ % para a casta Merlot são reportados por Oomah *et al.*, (1998). Beveridge *et al.*, (2005) referem um conteúdo máximo em óleo, extraído com éter de petróleo, de 11,17 % para a casta Cabernet Sauvignon, no presente estudo o valor obtido para a respetiva casta foi de 7,65 %. Fernández *et al.*, (2010) estudaram o processo de extração de óleo de grainha de uva com diferentes solventes no qual se obteve um valor de rendimento de 11,2 % para óleo extraído com éter de petróleo. Temenuzhka *et al.* (2016) determinaram um rendimento máximo de $16,5 \pm 0,7$ % em óleo de grainhas de uva de castas búlgaras.

O teor em óleo das grainhas é influenciado pela casta a que pertencem, à semelhança do reportado por Lachman *et al.*, (2015).

4.3. Acidez

A acidez de um óleo pode ser vista como uma variável relacionada com a qualidade da matéria-prima e as condições de conservação. Esta foi determinada pelo método clássico de volumetria ácido-base, cujos resultados estão dispostos na Figura 3.

Em relação à acidez, as distintas castas apresentam diferenças notórias, variando entre 0,3% para a casta Síria e 8,7% para a Vital.

A acidez livre de uma gordura resulta da hidrólise parcial dos triglicéridos, reação essa que é catalisada na presença da luz e calor, o que poderá ter sido um fator influenciador dos resultados obtidos para este parâmetro de qualidade, sendo sugerido que o mesmo não ultrapasse os 0,6 mg KOH/g de óleo, para óleos vegetais com destino a consumo humano (CODEX STAN 210 - 1999).

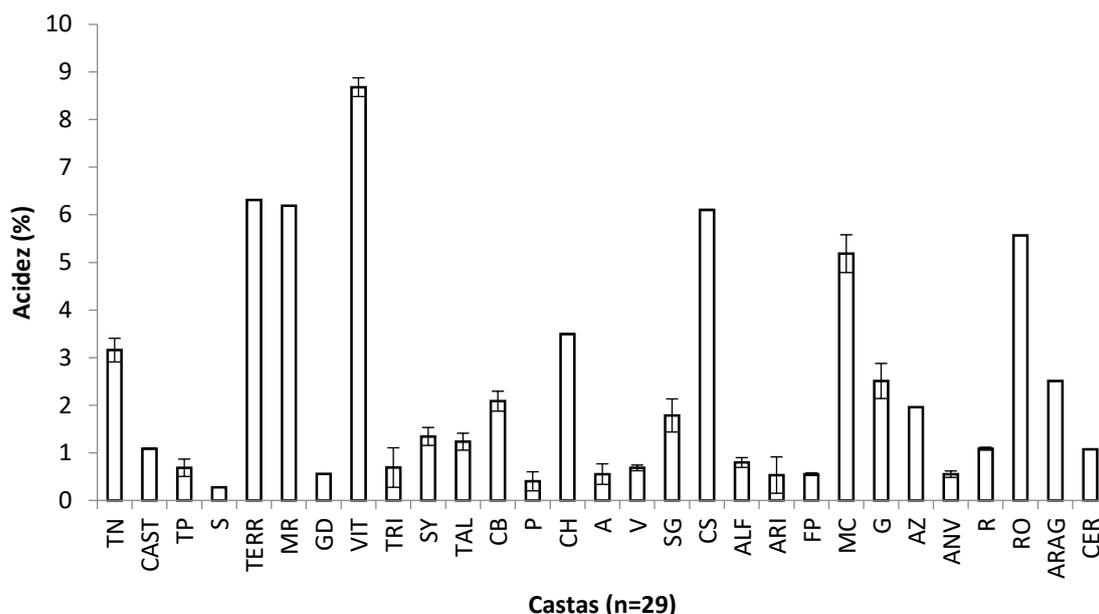


Figura 3 - Acidez (% AGL) das diferentes castas (barras de erro com desvio padrão).

Frega *et al.*, (1999) referem um valor de acidez de 0,20 % (expresso em ácido oleico) para óleo de grainha de uva refinado.

Consequentemente, a acidez é um parâmetro utilizado para a avaliação do nível de degradação e qualidade do óleo, pode-se afirmar que as amostras de óleo deverão passar por algum tipo de tratamento (refinação) antes de sua comercialização.

4.4. Índice espectrofotométrico

A leitura de absorvância no UV é um parâmetro de qualidade cuja técnica foi empregue na detecção de produtos primários e secundários de oxidação. Os produtos primários são respetivos à absorção por dienos conjugados (hidroperóxidos) ao comprimento de onda de 232 nm e os produtos secundários relativos a trienos conjugados (ácidos gordos livres de cadeia curta, aldeídos e cetonas) a 270 nm, responsáveis pelo cheiro a ranço, constituindo assim um indicador de oxidação térmica do óleo.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos dos parâmetros K_{232} e K_{270} do óleo de grainha de uva das diferentes castas. Verifica-se que os valores de K_{232} obtidos para as distintas amostras de óleo não registam diferenças significativas, ou seja, todas as amostras exibiram o mesmo nível de hidroperóxidos conjugados, salvo as castas Castelão,

Antão Vaz, Rabo de Ovelha e Cercial. Este parâmetro varia desde valores muito próximos de zero, 0,03 para a casta Perrum a 2,66, para a casta Rabo de Ovelha, com uma média de $0,40 \pm 0,79$.

Os resultados verificados para o parâmetro K_{270} indicam uma pequena oscilação dos valores obtidos, exceto para as castas Castelão, Antão Vaz, Rabo de Ovelha e Cercial. O valor mínimo corresponde à casta Touriga Nacional (0,06) e o máximo à Rabo de Ovelha, 0,67. A média é de $0,20 \pm 0,18$.

O óleo da casta Touriga Nacional apresentou indícios de ser o menos afetado pelo processo oxidativo, por outro lado, o óleo mais oxidado foi o da casta Rabo de Ovelha.

Deste modo, é possível concluir que as amostras de óleo de grainha de uva das castas utilizadas neste estudo, demonstraram níveis baixos de produtos de oxidação.

Oomah *et al.*, (1998) avaliaram os valores de dienos e trienos presentes no óleo de grainha de uva bruto, os quais foram 0,428 e 0,015, respetivamente. O que difere dos valores obtidos no presente estudo, em que, a maioria das amostras apresentaram o K_{270} superior a K_{232} , isto é, a reação já se encontrava no período final.

O mesmo estudo, de Oomah *et al.*, (1998), refere que o óleo de grainha de uva comercial apresentou o maior nível de trienos conjugados, indicador de um óleo que foi sujeito ao processo de refinação.

Tabela 6 – Absorvância relativa à presença de produtos primários (K_{232}) e secundários (K_{270}) de oxidação, do óleo das diferentes castas.

Código	Casta (abreviatura)	* K_{232}	* K_{270}
5	TN	0,04	0,06
6	CAST	2,08	0,50
7	TP	0,06	0,09
8	S	0,11	0,16
9	TERR	0,09	0,10
10	MR	0,14	0,12
11	GD	0,06	0,09
13	VIT	0,16	0,22
14	TRI	0,07	0,24
16	SY	0,08	0,11
18	TAL	0,07	0,13
19	CB	0,10	0,12
20	P	0,03	0,16
21	CH	0,10	0,07
22	A	0,07	0,09
23	V	0,06	0,09
24	SG	0,07	0,12
26	CS	0,14	0,16
27	ALF	0,06	0,08
28	ARI	0,08	0,12
31	FP	0,06	0,07
32	MC	0,05	0,09
33	G	0,21	0,31
36	AZ	0,06	0,08
37	ANV	2,40	0,63
38	R	0,10	0,06
41	RO	2,66	0,67
43	ARAG	0,11	0,18
47	CER	2,16	0,50
Mínimo		0,03	0,06
Máximo		2,66	0,67

*Valores correspondentes a um ensaio por amostra de óleo.

4.5. Perfil de ácidos gordos

A identificação dos picos cromatográficos foi efetuada comparando o tempo de retenção dos picos da amostra com o padrão Supelco Fame Mix C8-C24.

Foi assumido que a fração correspondente a um determinado ácido gordo é a razão entre a respetiva área do pico e a área total dos picos, em percentagem.

O perfil de ácidos gordos do óleo de diferentes castas encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição em ácidos gordos maioritários do óleo de grainha de uva das distintas castas.

Código	Casta (abreviatura)	Composição em ácidos gordos (%)*			
		Ácido Palmítico (C16:0)	Ácido Esteárico (C18:0)	Ácido Oleico (C18:1)	Ácido Linoleico (C18:2)
5	TN	8,26±0,09	3,77±0,23	16,75±0,26	71,21±0,12
6	CAST	7,15±0,38	3,48±0,00	16,13±0,06	73,24±0,32
7	TP	7,83±0,18	3,44±0,34	14,35±0,66	74,38±0,13
8	S	8,25±0,08	4,72±0,01	13,50±0,18	73,53±0,27
9	TERR	9,06±0,07	4,82±0,12	12,72±0,07	73,40±0,26
10	MR	7,25±0,10	3,33±0,80	14,12±0,40	75,30±0,30
11	GD	6,97±0,69	3,17±0,11	16,03±0,01	73,83±0,58
13	VIT	8,54±0,13	0,71±0,00	16,60±0,10	74,15±0,02
14	TRI	8,33±0,18	4,27±0,27	14,55±0,46	72,85±0,54
16	SY	9,78±0,78	2,08±2,12	19,03±0,60	69,10±0,75
18	TAL	8,56±0,15	3,71±0,34	16,88±0,43	70,85±0,24
19	CB	8,05±0,22	3,80±0,11	15,58±0,45	72,57±0,56
20	P	8,69±0,01	4,91±0,57	15,29±0,83	71,11±1,40
21	CH	8,56±0,06	1,96±1,84	17,38±0,06	72,09±1,84
22	A	7,10±0,11	3,23±0,73	16,04±0,74	73,62±1,58
23	V	7,87±0,13	5,41±0,08	13,91±0,33	72,81±0,38
24	SG	8,80±0,02	3,59±0,02	15,41±0,04	72,20±0,03
26	CS	9,50±0,32	4,86±0,37	15,82±0,40	69,82±0,45
27	ALF	7,20±0,06	3,90±0,04	15,21±0,29	73,70±0,27
28	ARI	8,23±0,51	4,48±0,51	17,58±1,70	69,72±2,72
31	FP	7,01±0,69	4,70±0,05	14,99±0,22	73,30±0,96
32	MC	9,22±0,06	3,18±0,23	15,29±0,39	72,32±0,11
33	G	7,89±0,14	3,66±0,78	15,27±0,79	73,18±0,13
36	AZ	7,07±0,15	2,90±0,43	18,70±0,55	71,34±0,03
37	ANV	7,87±0,65	4,47±0,37	15,16±0,62	72,49±0,41
38	R	7,60±0,00	3,70±0,01	15,69±0,11	73,01±0,10
41	RO	7,28±0,03	6,28±0,06	14,53±0,70	71,91±0,72
43	ARAG	8,54±0,41	3,48±0,06	12,86±0,41	75,12±0,76
47	CER	8,04±0,60	3,03±0,44	16,03±0,73	72,89±1,77
Mínimo		6,97	0,71	12,72	69,10
Máximo		9,78	6,28	19,03	75,30

*Média±desvio-padrão

É possível notar através dos resultados obtidos que as distintas castas apresentam um perfil em ácidos gordos semelhante, ou seja, os ácidos gordos que se apresentam maioritariamente foram: o C18:2 e o C18:1, seguidos do C16:0 e C18:0, os predominantes

na composição do óleo de gralha de uva, o que se encontra em concordância com a literatura.

O ácido linoleico é o principal na composição das amostras do óleo de gralha de uva analisadas e Malvasia Rei é a casta que apresenta a maior percentagem do mesmo ($75,3 \pm 0,3 \%$), contrariamente ao seu teor em óleo que, como já referido, é o mais baixo. A casta Syrah é a que apresenta um menor teor deste ácido gordo essencial, com um valor de $69,1 \pm 0,75 \%$.

Relativamente ao teor em ácido oleico, o segundo maioritário, as castas que apresentaram menor teor deste ácido gordo foram Terrantez e Aragonez, apresentando aproximadamente 13% , cujo valor representa o mínimo numa gama de resultados que varia até $19,0 \pm 0,6 \%$, respetivo ao óleo da casta Syrah.

A Figura 4 representa os teores de C18:1 e C18:2 nos óleos das diferentes castas analisadas. Verifica-se que os óleos com maiores teores de C18:2 apresentam menores valores de C18:1, ou seja, em média, à medida que o teor em ácido linoleico diminui, o teor em ácido oleico aumenta (existência de correlação negativa). Contudo, o valor do coeficiente de determinação ($0,43$), indica que apenas 43% da variabilidade do teor em ácido linoleico é explicada pelo modelo linear apresentado. Porém, Lachman *et al.* (2015) reportam o oposto, pois determinaram uma forte correlação, $R^2 = 0,969$, entre o teor de ácido linoleico e oleico no óleo de gralha de uva estudado.

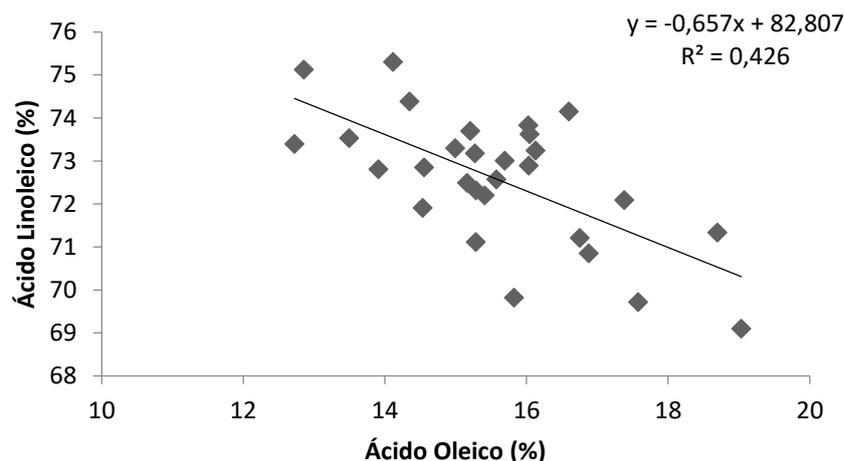


Figura 4 – Retas de regressão linear, da quantidade de ácido linoleico vs. ácido oleico (em percentagem), respetiva equação e coeficiente de correlação.

Com recurso à bibliografia existente respeitante à biossíntese de ácidos gordos, sabe-se que a biossíntese de C18:1 e C18:2 se faz a partir dos ácidos gordos saturados C16 e C18 (Figura 5). Os ácidos palmítico (aprox. 7 a 10%) e esteárico (aprox. 2 a 6%, exceto a casta Vidal) presentes no óleo de grainha de uva relacionam-se, pois com a síntese dos ácidos gordos insaturados, como é o caso dos ácidos oleico e linoleico.

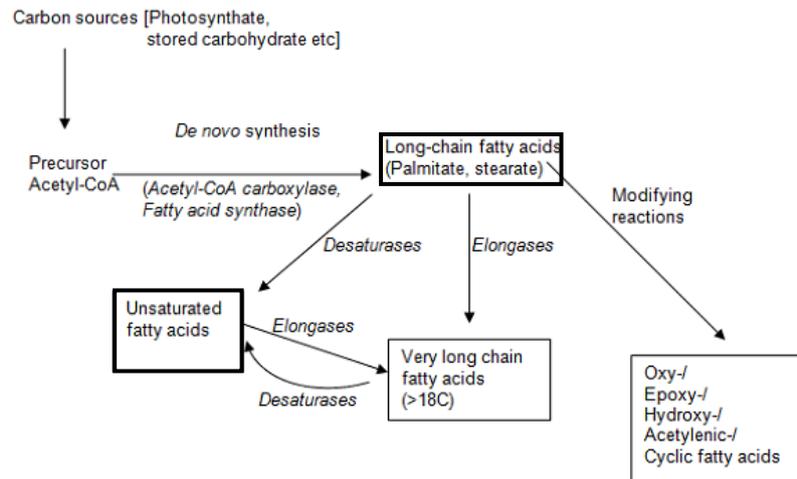


Figura 5 – Biossíntese de ácidos gordos em plantas. (Adaptado de: Harwood, 2017)

Deste modo, pretendeu-se avaliar a correlação linear entre os teores de ácidos gordos insaturados e os ácidos gordos saturados de que provêm. Seguiu-se uma análise da linearidade entre os mesmos (Figura 6). As nuvens de pontos, bem como os coeficientes de determinação conduzem à assunção de linearidade fraca entre as variáveis, com resultados não significativos (coeficientes de correlação próximos de zero).

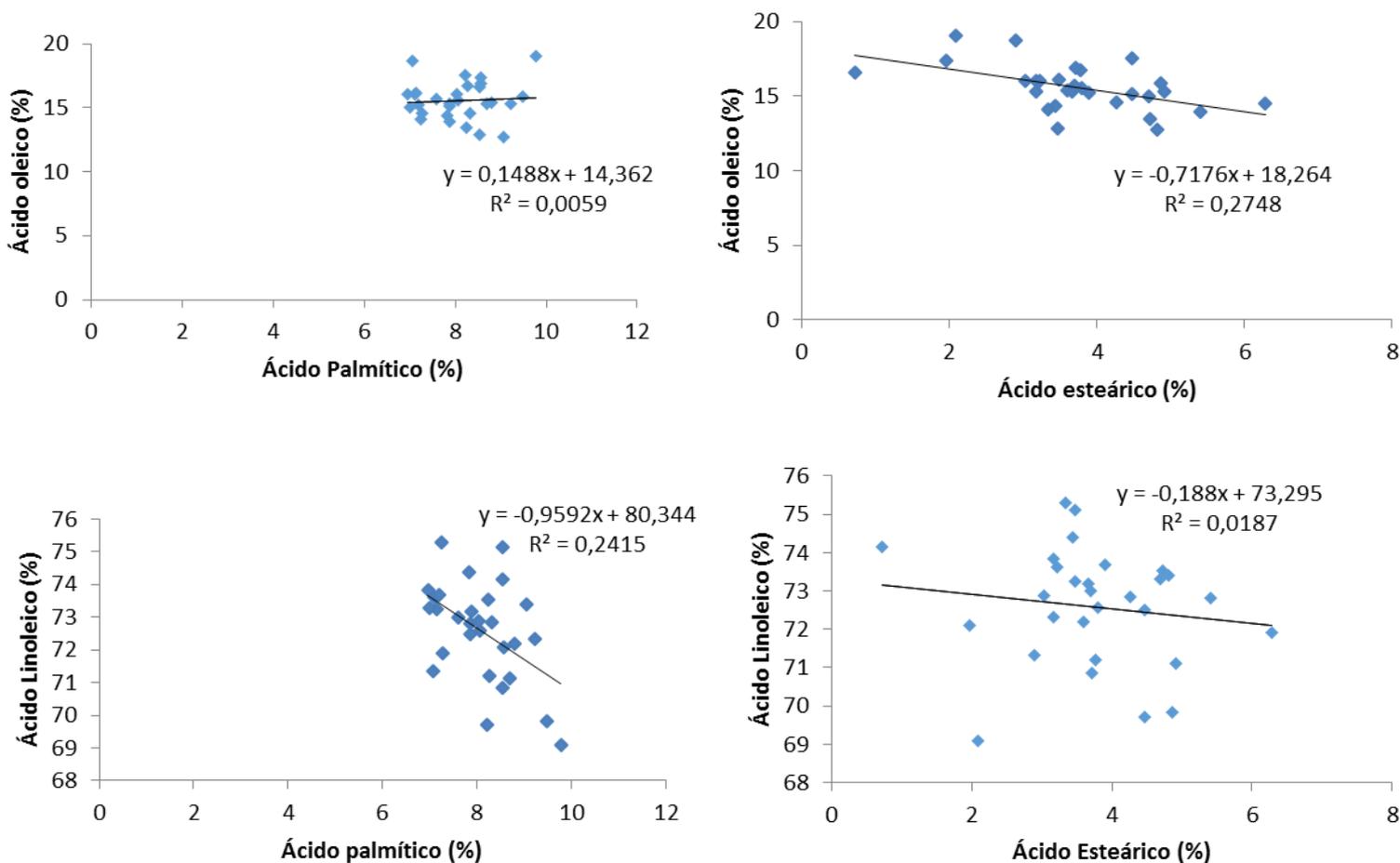


Figura 6 – Variação dos teores de ácidos gordos insaturados C18:1 e C18:2 com os teores de ácidos gordos saturados C16:0 e C18:0.

Comparativamente com outras referências, a composição em ácidos gordos do óleo de grainha de uva do presente estudo, nomeadamente em ácido linoleico (C18:2, 69 – 75%), ácido oleico (13 – 19%), ácido palmítico (C16:0, 7 – 10%) e ácido esteárico (C18:0, 1 – 6%), é concordante com os autores que referem o ácido linoleico como maioritário no óleo de grainha de uva. Lachman *et al.* (2015) apresenta uma fração de ácido linoleico de $73,15 \pm 1,94\%$, de ácido oleico de $13,63 \pm 1,73\%$, de ácido palmítico de $6,81 \pm 0,59\%$ e de esteárico de $4,04 \pm 0,74\%$, para óleo de grainha de uva extraído pelo método de Soxhlet. Fernandes *et al.*, (2013) obtiveram valores de ácido linoleico de 63,0 a 73,1%, para óleo de grainha de uva de castas portuguesas, seguido do ácido oleico, palmítico e esteárico; Tangolar *et al.* (2009) reportaram valores para o ácido linoleico entre 62,5 (Alicante Bouschet) e 69,24% (Muscat); Lutterodt *et al.*, (2011) entre 66,0% (Ruby red) e 75,3% (Concord); Beveridge *et al.*, (2005) de 66,76% (Malbec) a 73,61% (Merlot) e Pardo *et al.*, (2009) entre 60,94% (Tintorera Garnacha) a 69,16% (Petit Verdot).

Fiori *et al.*, (2014) referem valores similares para a composição em ácidos gordos de OGU obtido por extração supercrítica com CO₂: ácido linoleico (70,4 – 74,3%), ácido oleico (13,6 – 16,8%), ácido palmítico (6,53–8,89%), ácido esteárico (2,84 – 4,16%).

Os resultados obtidos suportam a potencialidade do óleo de gralha de uva como um óleo vegetal fonte de ácidos gordos insaturados.

Seria de interesse realizar uma classificação hierárquica (*Custering*) para determinar os valores de PUFA, MUFA e SFA, para comparação com outros trabalhos.

4.6. Cor e características cromáticas

Por espectrofotometria de visível efetuaram-se leituras de transmitância das amostras de óleo de gralha de uva a 445, 495, 560, 595 e 625 nm, cujos resultados obtidos se encontram apresentados na Tabela 8. Estes incluem as coordenadas cromáticas x e y, a transparência/luminosidade (Y%), o comprimento de onda dominante, em nm (λ) e pureza/saturação ($\sigma\%$). Através do diagrama de cromaticidade x, y do sistema C.I.E. (*Comission Internationale de L'Eclairage*) é possível determinar indiretamente a cor das amostras de óleo de gralha de uva analisadas e respectivas características cromáticas.

As coordenadas cromáticas, abcissa x e ordenada y, do óleo de gralha de uva das castas em estudo apresentam valores bastante semelhantes, variando ambas aproximadamente de 0,33 a 0,50. Em termos de valores médios, com recurso à superfície do diagrama de cromaticidade (Figura 7) as coordenadas cromáticas localizam a coloração das amostras na região do amarelo.

O comprimento de onda dominante, segundo a referida norma, é a radiação espectral que predomina na luz transmitida pelo óleo. Todas as amostras de óleo de gralha de uva apresentaram 571 nm como valor resultante desta característica cromática, obtido através da correspondente expressão de cálculo ou como pela reta traçada que cruza os pontos definidos pelas características cromáticas e o iluminante C, (Figura 7), presentes na NP 937 (1987).

Tabela 8 – Parâmetros de cor e características cromáticas do óleo de grainha de uva das diferentes castas.

Código	Casta (abreviatura)	Coordenadas cromáticas		Pureza ($\sigma\%$)	Transparência (Y%)	Comprimento de onda dominante (λ , nm)
		x	y			
5	TN	0,48	0,49	90,66	45,01	571
6	CAST	0,49	0,50	97,66	53,98	571
7	TP	0,50	0,50	99,54	45,61	571
8	S	0,33	0,33	9,11	48,09	571
9	TERR	0,51	0,49	99,38	26,60	571
10	MR	0,50	0,50	99,55	37,87	571
11	GD	0,50	0,49	98,54	60,94	571
13	VIT	0,50	0,50	99,00	21,38	571
14	TRI	0,50	0,50	99,23	40,40	571
16	SY	0,50	0,49	99,46	31,71	571
18	TAL	0,50	0,50	99,38	48,82	571
19	CB	0,50	0,49	99,55	39,55	571
20	P	0,47	0,48	87,09	62,13	571
21	CH	0,50	0,49	99,59	57,05	571
22	A	0,50	0,50	99,42	55,57	571
23	V	0,50	0,50	99,27	50,34	571
24	SG	0,43	0,43	61,84	30,24	571
26	CS	0,50	0,50	99,31	30,35	571
27	ALF	0,45	0,45	74,57	35,78	571
28	ARI	0,51	0,47	97,19	5,84	571
31	FP	0,50	0,50	99,59	65,55	571
32	MC	0,48	0,48	90,47	61,24	571
33	G	0,38	0,38	37,07	0,35	571
36	AZ	0,50	0,49	98,19	59,84	571
37	ANV	0,51	0,49	99,55	60,75	571
38	R	0,33	0,33	7,89	42,73	571
41	RO	0,50	0,49	99,45	35,43	571
43	ARAG	0,50	0,49	99,00	29,03	571
47	CER	0,50	0,50	99,30	44,27	571
	Mínimo	0,3	0,3	7,89	0,35	571
	Máximo	0,51	0,50	99,59	65,55	571

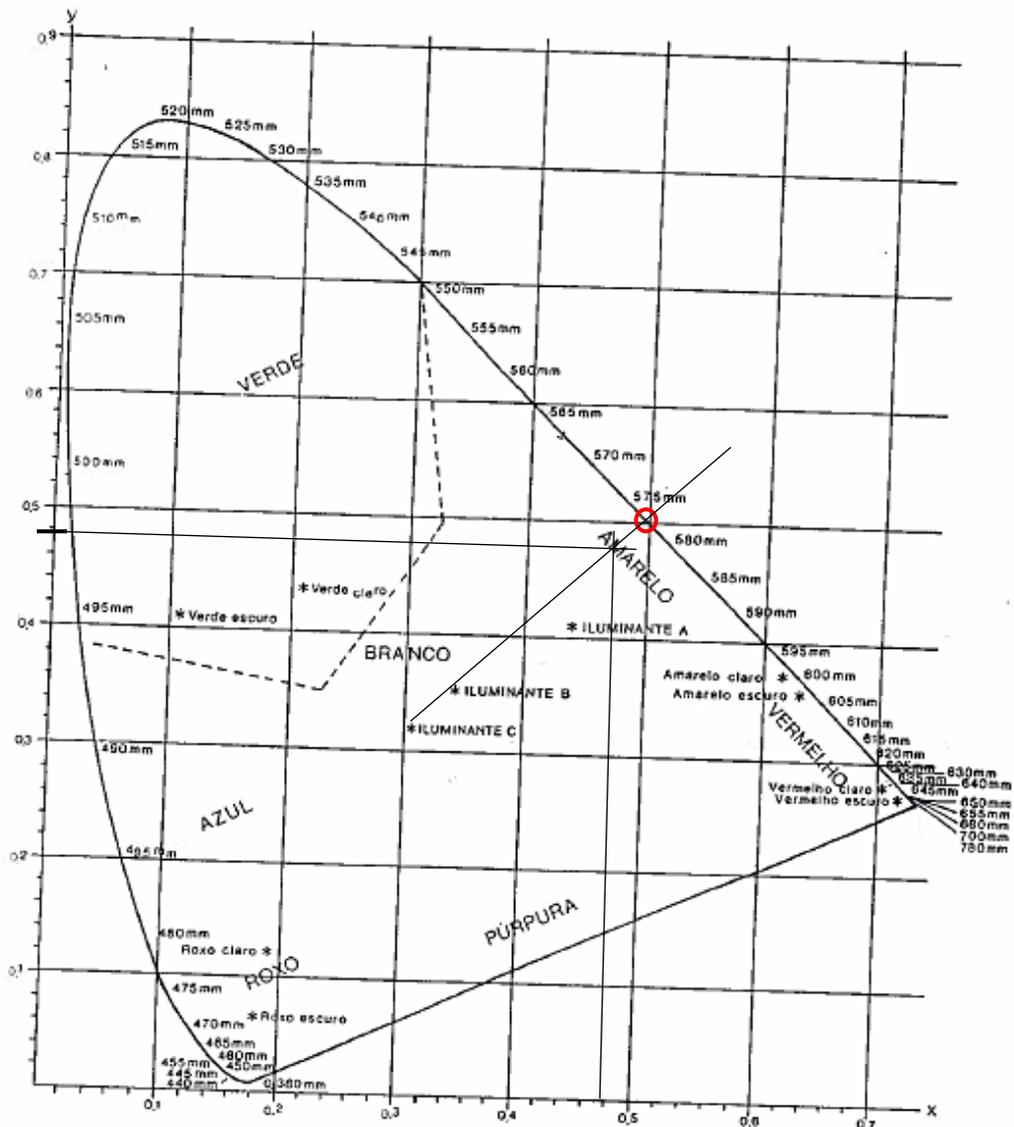


Figura 7 – Diagrama de cromaticidade x, y do sistema C.I.E. (Adaptado da Norma Portuguesa 937 de 1987).

U

Os parâmetros que determinam a cor e as características cromáticas, as que apresentam maior dispersão de resultados são a pureza ($\sigma\%$, percentagem da luz com o comprimento de onda dominante, na luz transmitida pelo óleo) e a transparência ($Y\%$, percentagem da luz incidente transmitida após a passagem pelo óleo), o que se deve ao facto de algumas amostras apresentarem turvação. Apesar de o óleo ter sido filtrado, esta operação de preparação da amostra foi realizada manualmente, o que poderá ser uma fonte de erro considerável nos valores observados e conseqüentemente na disparidade dos mesmos, pelas partículas que se mantiveram em suspensão (Ventura, 2014).

Todavia, quanto à pureza, os valores são muito semelhantes para os óleos obtidos de diferentes castas. Apenas cinco amostras apresentam observações excepcionais (castas Terrantez, Rabigato, Azal, Sangiovese e Alfrocheiro), o que justifica o valor apresentado

como desvio-padrão e que indica que não existe praticamente relação entre a característica cromática de pureza e a casta em questão. Deste modo, maioritariamente as castas apresentam um comportamento semelhante relativamente a este atributo.

Relativamente à transparência, verifica-se uma ampla dispersão dos pontos, não sendo deste modo possível encontrar uma tendência relativamente a este parâmetro.

De notar, que a casta que apresentou o valor mais baixo de transparência, Gouveio, foi também a que visualmente, exibiu a cor verde de tonalidade mais “escura” e um dos valores mais baixos de pureza. Opostamente, a casta em que foram observados os valores mais elevados nas características pureza e transparência foi a Fernão Pires.

Em suma, a avaliação da cor e das características cromáticas pelo método da C.I.E., baseia-se na possibilidade de conhecimento de um parâmetro organolético, que poderá ajudar à caracterização e identificação do óleo de grainha de uva de diferentes castas.

Oomah *et al.*, (1998) analisaram a cor de distintas amostras de óleo de grainha de uva, nomeadamente óleo bruto, e refere que a amostra comercial e a extraída mecanicamente foram as que apresentaram maior luminosidade. Segundo Giacomelli *et al.*, (2006), o OGU tem uma aparência similar à de outros óleos vegetais encontrados no Mercado. (Masan *et al.*, 2016) reportam que o óleo de grainha de uva apresenta uma cor nitidamente amarela e que não encontraram diferenças significativas entre castas ou entre grupos de castas tintas ou brancas.

5. Tratamento estatístico dos resultados

5.1. Análise de variância (ANOVA)

Por observação da Tabela 9, que dispõe num quadro resumo da ANOVA a informação relativa a cada variável aleatória, verifica-se que ao nível de significância adotado, o *p-value* associado a cada uma das v.a. é nitidamente inferior a $\alpha = 0,05$.

Tabela 9 – Quadro-resumo ANOVA a um fator, das v.a. estudadas

Variável		Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Soma dos médios quadrados	Valor da estatística f	<i>p-value</i>
Rendimento	Fator	28	2385	85,18	118	2×10^{-16}
	Resíduos	57	41,1	0,72	-	-
Ácido linoleico	Fator	28	129,72	4,63	5,617	$6,97 \times 10^{-6}$
	Resíduos	29	23,92	0,83	-	-
Ácido oleico	Fator	28	127,05	4,54	15,02	$6,73 \times 10^{-11}$
	Resíduos	29	8,76	0,30	-	-
Acidez	Fator	28	294,89	10,53	282,2	2×10^{-16}
	Resíduos	29	1,08	0,04	-	-
Absorvância (232 nm)	Fator	28	35,05	1,25	340,5	2×10^{-16}
	Resíduos	29	0,11	0,003	-	-
Absorvância (270 nm)	Fator	28	1,65	0,59	88,3	2×10^{-16}
	Resíduos	29	0,0194	0,00067	-	-

De forma a estudar as hipóteses de normalidade e independência das observações, foram elaborados gráficos que permitissem verificar a possibilidade de ocorrerem padrões que violem os respetivos pressupostos, isto é, não deverá existir nenhum padrão identificável, pois é aconselhável que os resíduos se disponham numa banda horizontal em torno de zero.

Quanto às representações gráficas (à esquerda) das Figuras 9 a 13, estas indiciam de um modo geral um padrão em forma de funil, ou seja, zonas de maior ou menor dispersão das observações, indicador de hipótese de violação das variâncias. Simultaneamente, nas representações relativas às absorvâncias a 232 e 270 nm é possível identificar algumas observações destacadas, indício de possíveis observações atípicas.

À direita, os gráficos são referentes ao estudo da normalidade dos erros, cuja disposição, quase na totalidade dos casos apresentados, é a concordante com a distribuição normal – próxima de uma reta, contudo os resíduos mais extremos sugerem algum desvio a essa hipótese. O gráfico da acidez exibe um comportamento distinto das outras, porém é possível considerar que acompanha reta, ainda que os pontos se apresentem mais distantes da mesma.

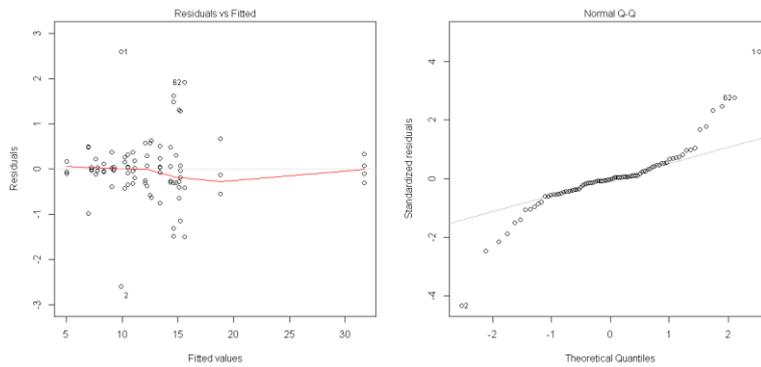


Figura 8 – Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e *qq-plot* (à direita), da v.a. rendimento.

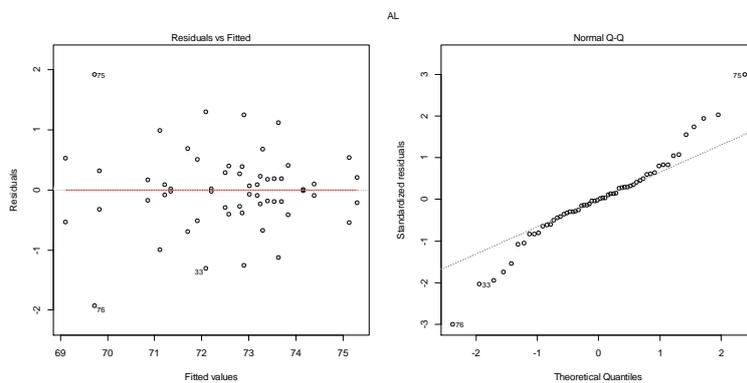


Figura 9 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e *qq-plot* (à direita), da v.a. ácido linoleico.

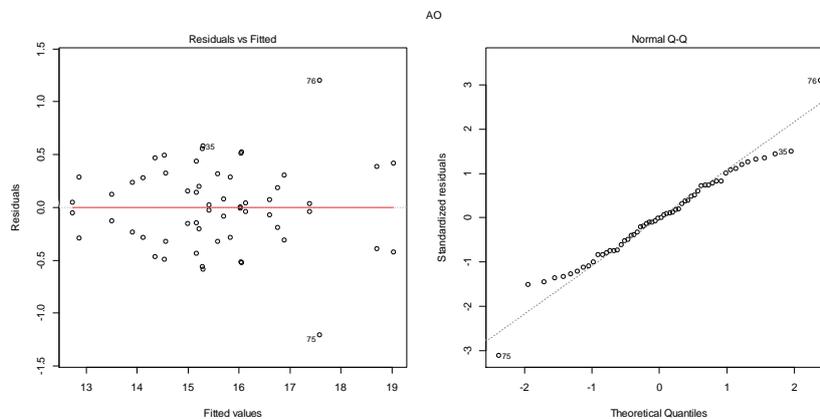


Figura 10 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e *qq-plot* (à direita), da v.a. ácido oleico.

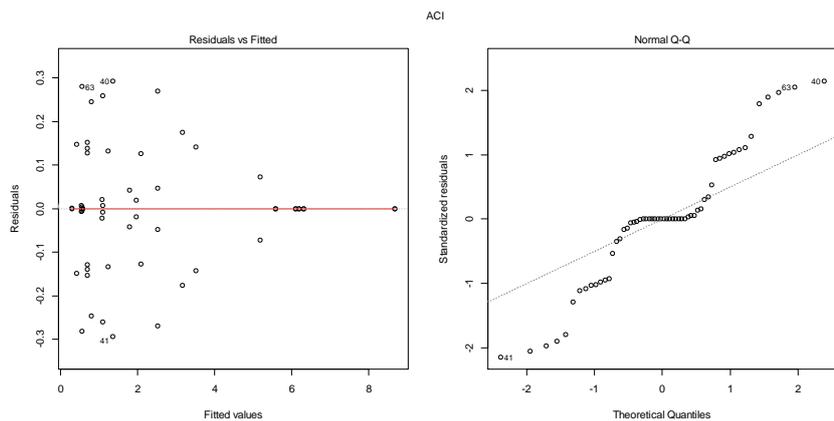


Figura 11 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e *qq-plot* (à direita), da v.a. acidez.

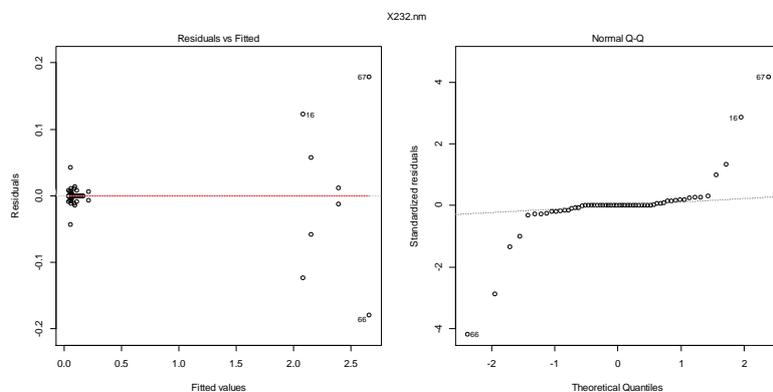


Figura 12 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e *qq-plot* (à direita), da v.a. absorvância a 232 nm.

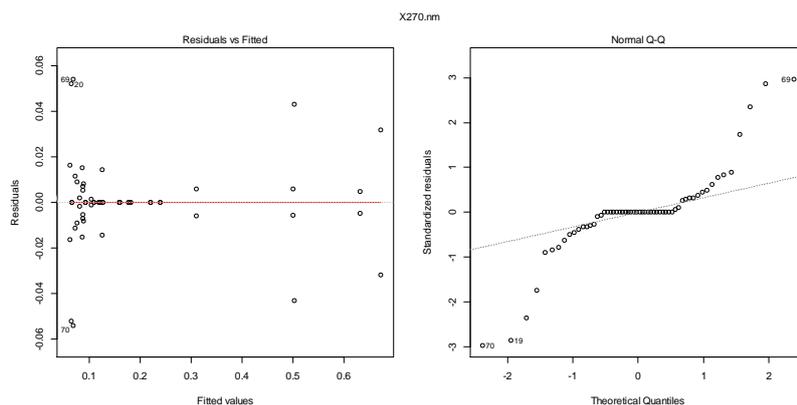


Figura 13 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (à esquerda) e *qq-plot* (à direita), da v.a. absorvância a 270 nm.

Dados os resultados obtidos na análise anterior, na qual as v.a. não passaram os pressupostos de homogeneidade das variâncias e de normalidade da distribuição, optou-se

pela aplicação de um teste estatístico não paramétrico: Estatística de Kruskal-Wallis. Esta permite comparar três ou mais populações e é análoga à ANOVA a um fator, em que se utiliza o teste F, não sendo necessária a premissa da população ser independente e normalmente distribuída. Porém é menos potente (capacidade de rejeitar hipótese nula sendo ela falsa).

Na Tabela 10, onde se apresentam os parâmetros associados à estatística de Kruskal-Wallis, observa-se de igual modo, que há diferenças estatisticamente significativas entre castas ($p\text{-value} < \alpha$), ao nível de significância de 5%.

Tabela 10 - Quadro-resumo da Estatística de Kruskal-Wallis

	Graus de liberdade	Qui-quadrado	$p\text{-value}$
Rendimento	28	81,71	$3,70 \times 10^{-7}$
Ácido linoleico	28	48,603	0,00922
Ácido oleico	28	52,44	0,003412
Acidez	28	55,001	0,0017
Absovância (232 nm)	28	54,318	0,002052
Absorvância (270 nm)	28	52,764	0,003128

Foi possível verificar que, para efetuar um ajustamento adequado do modelo ANOVA seriam necessárias mais repetições e de uma posterior análise multivariada.

5.2. Análise em Componentes Principais e classificação hierárquica

A Análise em Componentes Principais (ACP) foi empregue neste estudo com o propósito de realizar uma análise multivariada através da interpretação da estrutura dos dados, de modo a evidenciar as relações entre as variáveis, entre as amostras e entre amostras e variáveis. A metodologia desta ferramenta estatística permite a redução do número de variáveis, isto é, n -variáveis originais geram, através de combinações lineares, n -componentes principais, cujas principais características são a ortogonalidade e serem ordenados de forma decrescente relativamente às variâncias. Deste modo, é possível construir gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística e avaliar a importância das próprias variáveis originais (Neto & Moita, 1998).

Para o óleo de grainha de uva das distintas castas foram realizados dois tipos de Análise de Componentes Principais:

Matriz 1: Análise conjunta dos parâmetros rendimento de extração (Rend), perfil de ácidos gordos (AG), Acidez e índice espectrofotométrico (Abs);

Matriz 2: Análise conjunta dos parâmetros rendimento de extração e perfil de ácidos gordos (fatores possíveis de controlar).

A Tabela 11 apresenta os valores próprios e respetivas variâncias das componentes principais (CP) 1, 2 e 3. Verifica-se que apenas as quatro primeiras CP têm os valores próprios superiores a 1 e, por isso, são significativas. O espaço definido pelas CP 1, 2 e 3 explica 73,82% da variância total, sendo as restantes componentes consideradas residuais e conseqüentemente não relevantes para a análise efetuada.

Tabela 11 – Valores próprios das componentes principais e estatísticas relacionadas da Matriz 1.

Componentes	Valor próprio (Eigenvalue)	Variância Total (%)	Valores próprios cumulativos	Variância cumulativa (%)
1	2,34	29,21	2,34	29,21
2	2,00	25,05	4,34	54,26
3	1,64	20,47	5,98	74,72
4	1,20	14,98	7,18	89,70
5	0,47	5,82	7,64	95,52
6	0,31	3,93	7,96	99,45
7	0,04	0,55	8	100
8	0	0	8	100

Foi efetuada a projeção das variáveis iniciais no plano definido pelas componentes principais 1 e 2 (Figura 14).

Verifica-se que, ao longo da segunda CP o Rendimento e a Acidez se encontram fortemente correlacionados, com uma relação inversa, pois quando o Rendimento aumenta, a Acidez diminui. Os ácidos gordos C16 (ácido palmítico) e C18 (ácido esteárico) apresentam uma correlação fraca.

A 1ª CP descreve o estado de oxidação dos óleos que aumenta no sentido negativo do eixo. A 2ª componente principal opõe a acidez do óleo, que aumenta no sentido positivo do eixo, ao rendimento.

Os teores de C18:2 e C18:1 têm uma variação oposta, e o mesmo se observa relativamente aos teores de C18 e C16.

A 3ª CP (Figura 15), está relacionada com o teor de C18:2 que aumenta no sentido positivo do eixo.

Relativamente à projeção das amostras no plano fator 1 *versus* fator 2 (Figura 14), a elevada dispersão dos pontos não permite agrupar claramente as amostras. Porém, identificaram-se três grupos:

As amostras de óleo das castas Rabo de Ovelha, Castelão, Antão Vaz e Cercial são as que apresentam maiores valores dos parâmetros K_{232} e K_{270} , isto é, em estado de maior degradação oxidativa.

Outro grupo identificado inclui as castas Vital, Chardonnay, Syrah e Malvasia Colares, que apresentam elevada acidez. São óleos extraídos de grainhas que apresentavam humidade elevada.

As castas no 4º quadrante indiciam caracterizar-se por exibirem um maior teor de ácido linoleico, essencial e maioritário no óleo de grainha de uva, e maior rendimento em óleo (castas Azal e Arinto).

Quando as amostras são projetadas no plano 1x3 (Figura 15), as castas que se encontram no 2º quadrante são as que contêm óleo mais rico em ácido linoleico.

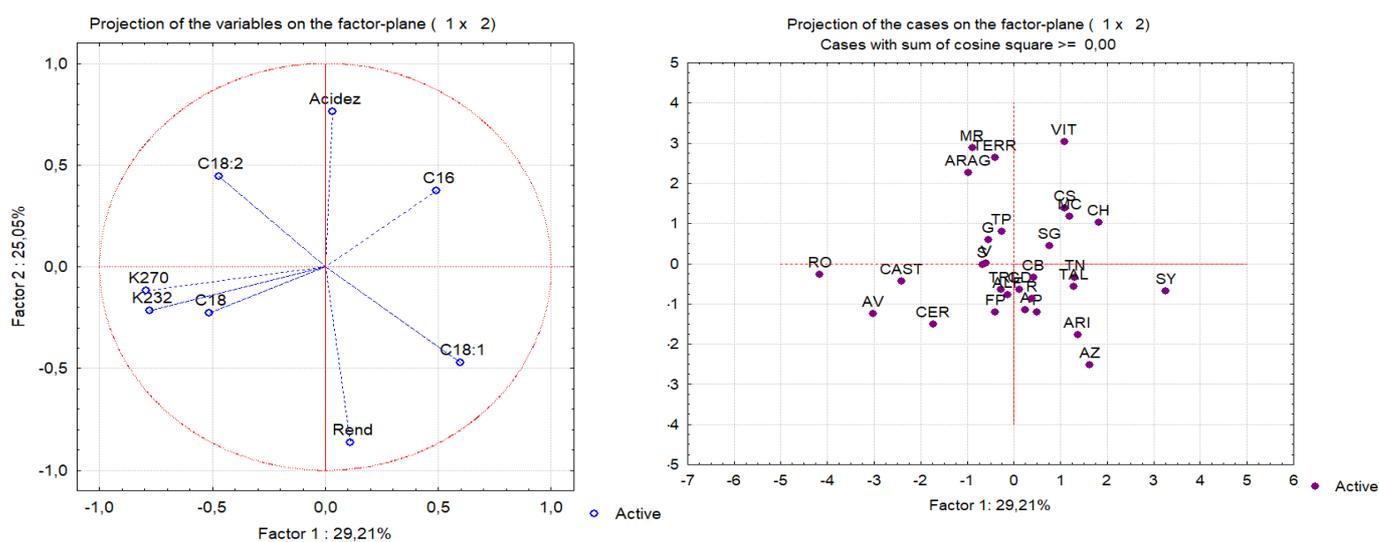


Figura 14 – (À esquerda) Projeção de variáveis no plano (Fator 1 vs. Fator 2) para Análise dos Componentes Principais para o óleo de grainha de uva, com recurso às características: Rendimento (Rend); Composição em ácidos gordos (AG); Acidez e Absorvância a 232 nm (K_{232}) e a 270 nm (K_{270}). (À direita) Projeção das amostras no plano Fator 1 vs. Fator 2.

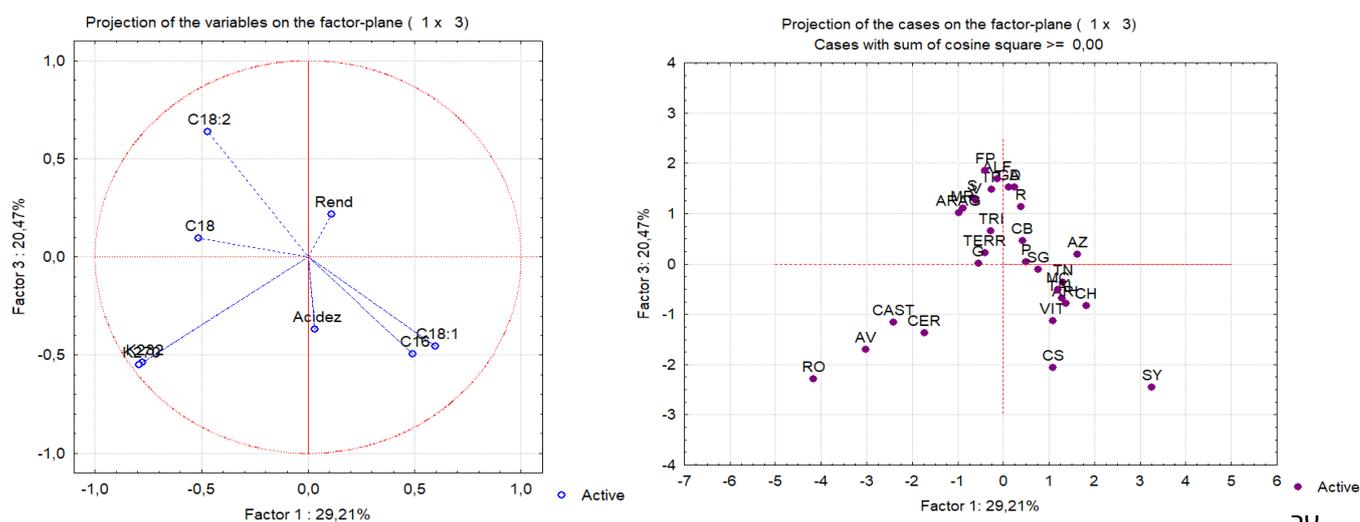


Figura 15 – (À esquerda) Projeção de variáveis no plano (Fator 1 vs. Fator 3) para Análise dos Componentes Principais para o óleo de grainha de uva, com recurso às características: Rendimento (Rend); Composição em ácidos gordos (AG); Acidez e Absorvância a 232 nm (K_{232}) e a 270 nm (K_{270}). (À direita) Projeção das amostras no plano Fator 1 vs. Fator 3.

Através do *output* disposto na Tabela 12, verifica-se a primeira componente possui um valor próprio de 1,99 correspondente a 40% da variância total, a segunda componente possui um valor próprio de 1,4 que corresponde a 28% da variância total e a terceira componente um valor próprio de 1,23 que corresponde a 25% da variância total atingindo apenas com as três primeiras componentes principais mais de 90% da informação estatística presente nas cinco variáveis originais.

Tabela 12 – Valores próprios e estatísticas relacionadas das componentes principais da Matriz 2.

Componentes	Valor próprio (Eigenvalue)	Variância Total (%)	Valores próprios cumulativos	Variância cumulativa (%)
1	1,985723	39,71446	1,985723	39,7145
2	1,406114	28,12228	3,391837	67,8367
3	1,226634	24,53267	4,618471	92,3694
4	0,381529	7,63058	5	100
5	0	0	5	100

Igualmente ao efetuado para o caso anterior, foi elaborado o gráfico do plano definido pela componente 1 *versus* a componente 2 (Figura 16).

O fator 1 (CP1) opõe os parâmetros C18:1 e C18:2, ou seja, quando o conteúdo em ácido oleico aumenta o teor em ácido linoleico diminui.

Verifica-se que, quando o Rendimento aumenta o teor em ácido palmítico (C16) diminui. O fator 2 opõe castas de maior rendimento às que possuem um maior teor em ácido palmítico).

Quanto ao universo das amostras projetadas no plano bidimensional em questão, Figura 16, este é relativamente disperso. A casta Syrah destaca-se por ser a amostra que apresenta maior teor relativamente aos ácidos gordos oleico e palmítico.

O fator 3 está relacionado positivamente com o teor de ácido esteárico.

A projeção das amostras no plano definido (Figura 17), apenas destaca a coordenada correspondente à casta Syrah, como sendo a que apresenta maior teor em ácido oleico. Devido à elevada dispersão dos dados considera-se que as coordenadas remanescentes não são relevantes para a análise de componentes principais.

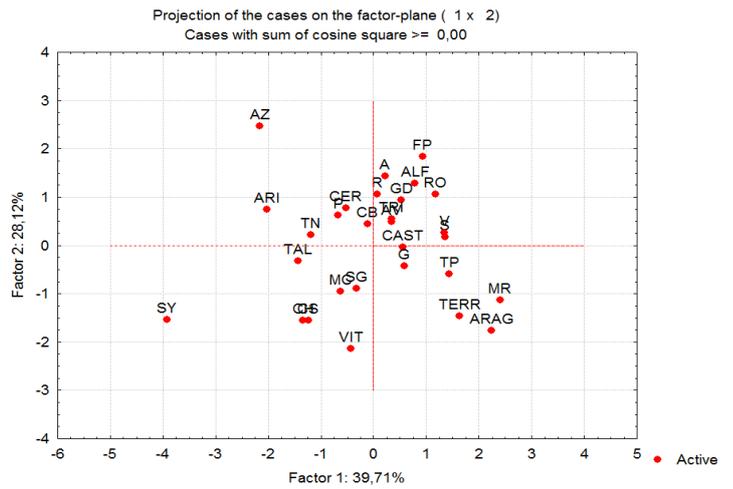
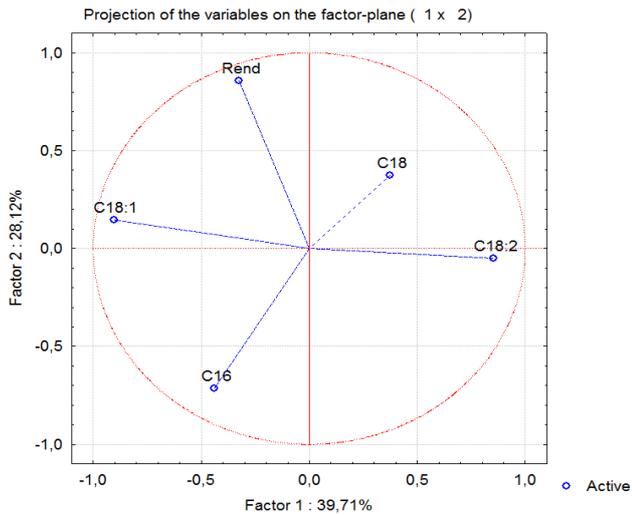


Figura 16 - (À esquerda) Projeção de variáveis no plano (Fator 1 vs. Fator 2) para Análise dos Componentes Principais para o óleo de grinha de uva, com recurso às características: Rendimento (Rend) e Composição em ácidos gordos (AG). (À direita) Projeção das amostras no plano Fator 1 vs. Fator 2.

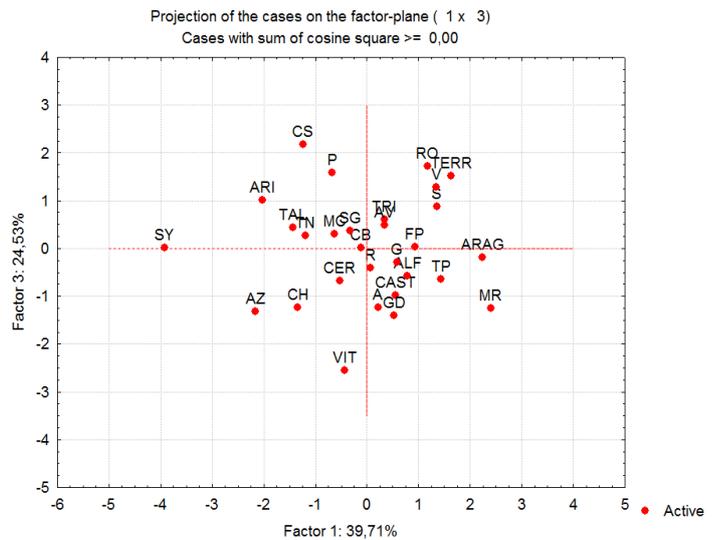
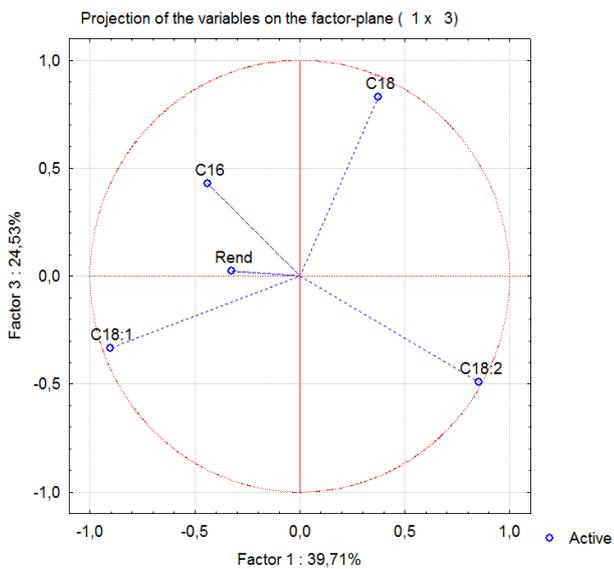


Figura 17 - (À esquerda) Projeção de variáveis no plano (Fator 1 vs. Fator 3) para Análise dos Componentes Principais para o óleo de grinha de uva, com recurso às características: Rendimento (Rend) e Composição em ácidos gordos (AG). (À direita) Projeção das amostras no plano Fator 1 vs. Fator 3.

Classificação Hierárquica

A classificação hierárquica (*Clustering*) é uma ferramenta estatística cuja técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por associações no hiperespaço inicial, da qual resulta um dendograma em que amostras vão sendo agrupadas por semelhanças. A interpretação mais básica é que, quanto menor a distância entre pontos, maior a semelhança entre as amostras. Os dendogramas são bastante úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos, num espaço com dimensão maior que três, em que a representação gráfica convencional não é aplicável, (Neto & Moita, 1997).

Na Figura 18 encontram-se os dendogramas respetivos às amostras descritas por todas as variáveis (Matriz 1) e, outro apenas com o rendimento e a composição em ácidos gordos (Matriz 2). Dos mesmos, verifica-se que não existem grupos de amostras individualizadas, quando estas são descritas por todas as variáveis consideradas. Porém existem amostras que se destacam.

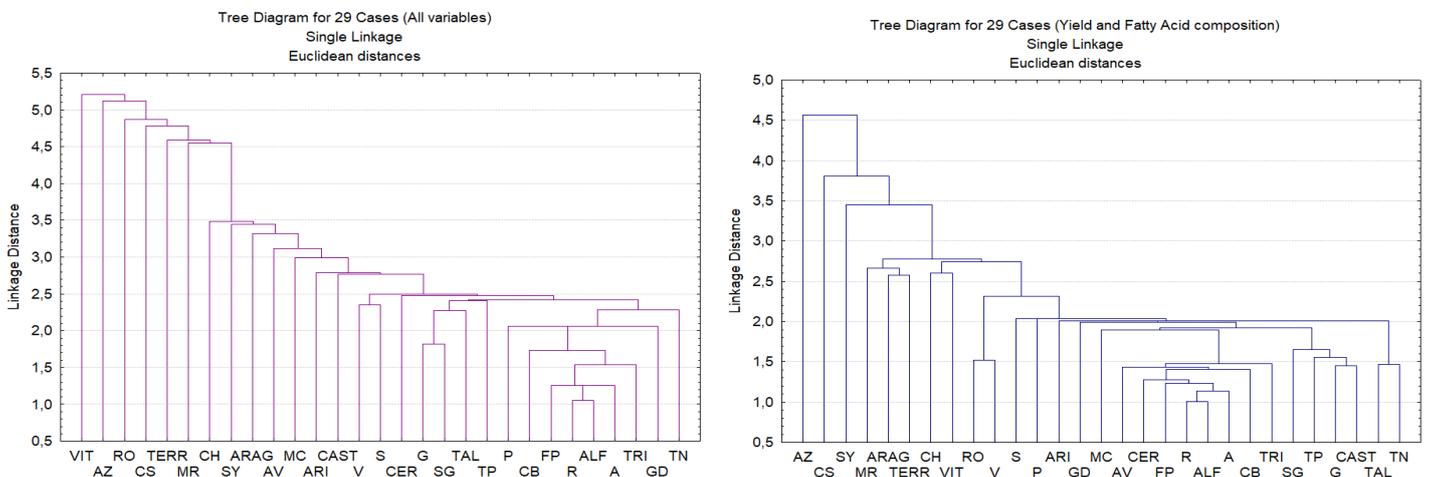


Figura 18 – Dendogramas da Matriz 1 (amostras descritas por todas as variáveis consideradas) e da Matriz 2 (amostras descritas pelas variáveis rendimento e composição em ácidos gordos), respetivamente.

Conclusões e perspectivas futuras

O presente estudo visou a extração de óleo de grainha de uva de 29 castas distintas, cultivadas sob as mesmas condições edafo-climáticas e a caracterização do respetivo óleo, relativamente ao perfil de ácidos gordos, acidez, produtos de oxidação e cor.

Numa primeira fase do trabalho experimental, determinou-se o teor de humidade das grainhas de uva, cujo valor deverá ser o mais baixo possível, de forma a evitar reações de degradação do óleo. As grainhas da casta Avesso apresentaram o menor teor de humidade (7,4 %).

O tempo de extração do óleo com o solvente éter de petróleo foi otimizado à escala laboratorial, pelo método de Soxhlet, com grainhas da casta Vinhão. A extração foi completa (8 % de óleo b.s.) ao fim de 5 horas. Os teores de óleo variaram entre $18 \pm 0,62\%$ b.s., observado na casta Azal, e $5 \pm 0,15\%$ b.s., na casta Malvasia Rei.

O perfil de ácidos gordos foi semelhante em todas as amostras, sendo o ácido linoleico (ácido gordo essencial), que variou de $69 \pm 0,75\%$ (Arinto e Syrah) a $75 \pm 0,3\%$ (Malvasia Rei e Aragonês), o ácido gordo maioritário. A partir da análise estatística dos resultados obtidos, nomeadamente pela ACP, foi possível concluir que, de um modo geral, as amostras com menor rendimento em óleo apresentaram um maior teor em ácido linoleico.

A qualidade dos óleos de grainha de uva foi avaliada, em termos da sua acidez e teor em produtos de oxidação. As amostras de óleo com maior acidez e maiores teores de produtos de oxidação devem-se às condições inadequadas de armazenamento de algumas grainhas que favoreceram as reações degradativas de hidrólise e oxidação. Relativamente à análise de cor e das características cromáticas dos óleos de grainha de uva, as coordenadas cromáticas situaram as amostras na zona do amarelo.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese pode servir de enquadramento para outros estudos que poderão complementar e/ou representar melhorias ao estudo realizado. Estes são apresentados nas seguintes propostas de trabalho futuro:

- Avaliação dos teores de componentes bioativos/ antioxidantes, como os compostos fenólicos e esteróis, no sentido de valorizar algumas castas.
- Seleção de castas de interesse em função do objetivo: obter um maior rendimento em óleo vs. obter um óleo mais rico em ácido linoleico, e como tal, com maior valor biológico.

Em suma, o presente trabalho constitui um contributo para a seleção de castas para produção de óleo de grainha de uva, tendo em vista a produção deste óleo à escala industrial no futuro.

Referências bibliográficas

- Aghamirzaei, M., Peighambaroust, S. H., Azadmard-Damirchi, S., & Majzoubi, M. (2015). Effects of grape seed powder as a functional ingredient on flour physicochemical characteristics and dough rheological properties. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(2), 365–373.
- Agostini, F., Bertussi, R. A., Agostini, G., Atti dos Santos, A. C., Rossato, M., & Vanderlinde, R. (2012). Supercritical Extraction from Vinification Residues: Fatty Acids, α -Tocopherol, and Phenolic Compounds in the Oil Seeds from Different Varieties of Grape. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1100/2012/790486>
- Ahmadi, S., & Siahshar, B. (2011). Analogy of physicochemical attributes of two grape seeds cultivars. *Ciencia E Investigacion Agraria*, 38(2), 291–301.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. a, ... Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148(2–3), 187–197. <https://doi.org/S0300483X00002109> [pii]
- Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., & Buchbauer, G. (2008). Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 108(3), 1122–1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.063>
- Baydar, N. G., & Akkurt, M. (2001). Oil Content and Oil Quality Properties of Some Grape Seeds. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25(3), 163–168. Obtido de <http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-01-25-3/tar-25-3-3-9909-25.pdf>
- Beveridge, T. H. J., Girard, B., Kopp, T., & Drover, J. C. G. (2005). Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1799–1804. <https://doi.org/10.1021/jf040295q>
- Bhosle, B. M., & Subramanian, R. (2005). New approaches in deacidification of edible oils - A review. *Journal of Food Engineering*, 69(4), 481–494. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.09.003>
- Bonfigli, M., Godoy, E., Reinheimer, M. A., & Scenna, N. J. (2017). Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from

- grape pomace. Experimental results and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.011>
- Brum, A. A. S., Arruda, L. F., & Regitano-D'Arce, M. A. B. (2009). Metodo De Extração E Qualidade Da Fração Lipídica De Materias-Primas De Origem Vegetal E Animal. *Quimica Nova*, *32*(4), 849–854. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400005>
- Cao, X., & Ito, Y. (2003). Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1021*(1–2), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.001>
- Ceballos, C., Moyano, M. J., Vicario, I. M., Alba, J., & Heredia, F. J. (2003). Chromatic evolution of virgin olive oils submitted to an accelerated oxidation test. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *80*(3), 257–262. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0686-0>
- Choi, Y., & Lee, J. (2009). Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. *Food Chemistry*, *114*(4), 1386–1390. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.018>
- Clark, A. J., Ross, A. H., & Bon, S. A. F. (2017). Synthesis and Properties of Polyesters from Waste Grapeseed Oil: Comparison with Soybean and Rapeseed Oils. *Journal of Polymers and the Environment*. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0883-3>
- Correddu, F., Nudda, A., Manca, M. G., Pulina, G., & Dalsgaard, T. K. (2015). Light-Induced Lipid Oxidation in Sheep Milk: Effects of Dietary Grape Seed and Linseed, Alone or in Combination, on Milk Oxidative Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(15), 3980–3986. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01614>
- Crews, C., Hough, P., Brereton, P., Godward, J., Lees, M., Guet, S., & Winkelmann, W. (2006). Quantitation of the main constituents of some authentic sesame seed oils of different origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(17), 6266–6270. <https://doi.org/10.1021/jf0603578>
- Criado, M. N., Morelló, J. R., Motilva, M. J., & Romero, M. P. (2004). Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *81*(7), 633–640. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-954-z>
- Crisman Mitchell, D., McMahon, K. E., Shively, C. A., Apgar, J. L., & Kris-Etherton, P. M. (1989). Digestibility of cocoa butter and corn oil in human subjects: A preliminary study. *American Journal of Clinical Nutrition*, *50*(5), 983–986.

- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>
- de Campos, L. M. A. S., Leimann, F. V., Pedrosa, R. C., & Ferreira, S. R. S. (2008). Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, *99*(17), 8413–8420. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.058>
- Domínguez, J., Sanchez-Hernandez, J. C., & Lores, M. (2017). Vermicomposting of Winemaking By-Products. *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions*, 55–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00003-X>
- Durante, M., Montefusco, A., Marrese, P. P., Soccio, M., Pastore, D., Piro, G., ... Lenucci, M. S. (2017). Seeds of pomegranate, tomato and grapes: An underestimated source of natural bioactive molecules and antioxidants from agri-food by-products. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.026>
- Dwyer, K., Hosseinian, F., & Rod, M. (2014). The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *Journal of Food Research*, *3*(2), 91. <https://doi.org/10.5539/jfr.v3n2p91>
- Eikani, M. H., & Fereshteh, G. (2009). Optimized superheated hexane extraction of grapeseed oil. *Journal of Food Lipids*, *16*(4), 514–523. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2009.01163.x>
- Ezejiolor, T. I. N., Enebaku, U. E., & Ogueke, C. (2014). Waste to wealth-value recovery from agro-food processing wastes using biotechnology: a review. *British Biotechnology Journal*, *4*(4), 418–481.
- Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.039>
- Fernández, C. M., Ramos, M. J., Pérez, Á., & Rodríguez, J. F. (2010). Production of biodiesel from winery waste: Extraction, refining and transesterification of grape seed oil. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.014>
- Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Siva, P., Harsha, C. S., Mohamed, H. Ben, & Guella, G. (2014). Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *The Journal of Supercritical Fluids*, *94*, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.021>
- Fiori, L., Solana, M., Guella, G., Strim, C., & Tosi, P. (2010). Rape seed oil : supercritical

extraction , chemical analysis and fractionation.

- Fornasari, C. H., Secco, D., Santos, R. F., da Silva, T. R. B., Galant Lenz, N. B., Tokura, L. K., ... Gurgacz, F. (2017). Efficiency of the use of solvents in vegetable oil extraction at oleaginous crops. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.123>
- Frega, N., Mozzon, M., & Lercker, G. (1999). Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' ...*, 76(3), 325–329.
<https://doi.org/10.1007/s11746-999-0239-4>
- Garcia-Jares, C., Vazquez, A., Lamas, J., Pajaro, M., Alvarez-Casas, M., & Lores, M. (2015). Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. *Antioxidants*, 4(4), 737–749. <https://doi.org/10.3390/antiox4040737>
- Gariso, S. I. S. (2011). Estudo do Efeito de Reutilizações Sucessivas de Óleos de Fritura sobre Parâmetros de Qualidade Gariso Isabel Simões.
- Giacomelli, L. M., Mattea, M., & Ceballos, C. D. (2006). Analysis and characterization of edible oils by chemometric methods. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4), 303–308. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1204-0>
- Göktürk Baydar, N., & Özkan, G. (2006). Tocopherol contents of some Turkish wine by-products. *European Food Research and Technology*, 223(2), 290–293.
<https://doi.org/10.1007/s00217-005-0203-y>
- Göktürk Baydar, N., Özkan, G., & Sema Çetin, E. (2007). Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y Aceites*, 58(1), 29–33.
<https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i1.5>
- González-Centeno, M. R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M. C., López, F., & Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: Grape pomaces and stems. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1580–1586. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.024>
- González-Paramás, A. M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., De Pascual-Teresa, S., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 234–238.
<https://doi.org/10.1021/jf0348727>
- Gris, E. F., Mattivi, F., Ferreira, E. A., Vrhovsek, U., Filho, D. W., Pedrosa, R. C., & Bordignon-Luiz, M. T. (2011). Stilbenes and tyrosol as target compounds in the assessment of antioxidant and hypolipidemic activity of vitis vinifera red wines from

- Southern Brazil. Em *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 59, pp. 7954–7961). <https://doi.org/10.1021/jf2008056>
- Gül, H., Acun, S., Şen, H., Nayir, N., & Türk, S. (2013). Antioxidant activity, total phenolics and some chemical properties of Öküzgözü and Narince grape pomace and grape seed flour. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(2), 28–34.
- Hajati, H., Hassanabadi, A., Golian, A., Nassiri-Moghaddam, H., & Reza Nassiri, M. (2015). The effect of grape seed extract and vitamin C feed supplementation on some blood parameters and HSP70 gene expression of broiler chickens suffering from chronic heat stress. *Italian Journal of Animal Science*, 14(3). <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3273>
- Hanganu, A., Todaşcă, M.-C., Chira, N.-A., Maganu, M., & Roşca, S. (2012). The compositional characterisation of Romanian grape seed oils using spectroscopic methods. *Food Chemistry*, 134(4), 2453–2458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.048>
- Heleno, S. A., Diz, P., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, 197, 1054–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.108>
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L.-Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671–701. <https://doi.org/10.1007/BF02522884>
- Kamel, B. S., Dawson, H., & Kakuda, Y. (1985). Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(5), 881–883. <https://doi.org/10.1007/BF02541750>
- Kim, H., Kim, D. H., Seo, K. H., Chon, J. W., Nah, S. Y., Bartley, G. E., ... Yokoyama, W. (2015). Modulation of the intestinal microbiota is associated with lower plasma cholesterol and weight gain in hamsters fed chardonnay grape seed flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(5), 1460–1467. <https://doi.org/10.1021/jf5026373>
- Kohno, H., Suzuki, R., Yasui, Y., Hosokawa, M., Miyashita, K., & Tanaka, T. (2004). Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Science*, 95(6), 481–486. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03236.x>
- Labuschagne, M. t., & Hugo, A. (2010). Oil Content and Fatty Acid Composition of Cactus

- Pear Seed Compared with Cotton and Grape Seed. *Journal of Food Biochemistry*, 34(1), 93–100. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00266.x>
- Lachman, J., Hejtmánková, A., Táborský, J., Kotíková, Z., Pivec, V., Střalková, R., ... Dědina, M. (2015). Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.044>
- LdeMENEZES, M. (sem data). ESTUDO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR SOXHLET DO ÓLEO DE SEMENTE DE UVA. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-1264-20186-175316>
- Leifert, W. R., & Abeywardena, M. Y. (2008). Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*, 28(11), 729–737. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.08.007>
- Lenucci, M. S., Durante, M., Anna, M., Dalessandro, G., & Piro, G. (2013). Possible use of the carbohydrates present in tomato pomace and in byproducts of the supercritical carbon dioxide lycopene extraction process as biomass for bioethanol production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(15), 3683–3692. <https://doi.org/10.1021/jf4005059>
- Luque-García, J. L., & Luque De Castro, M. D. (2004). Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment - Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 1034(1–2), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.020>
- Luque-Rodríguez, J. M., De Castro, M. D. L., & Pérez-Juan, P. (2005). Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. *Talanta*, 68(1), 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.04.054>
- Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., & Yu, L. (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.040>
- Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.005>
- Manirakiza, P., Covaci, A., & Schepens, P. (2001). Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(1), 93–100.

<https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0972>

- Martinello, M., Hecker, G., & Carmen Pramparo, M. del. (2007). Grape seed oil deacidification by molecular distillation: Analysis of operative variables influence using the response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.012>
- Masan, V., Burg, P., & Horak, M. (2016). EVALUATION OF GRAPE SEED OILS USING COLOUR SYSTEM METHOD (CIELAB), 500, 883–886.
- Matthäus, B. (2008). Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight? *European Journal of Lipid Science and Technology*. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700276>
- Mirkin, B. (1997). Mathematical Classification and Clustering. *Journal of the Operational Research Society*, 48(8), 852–852. <https://doi.org/10.1057/palgrave.jors.2600836>
- Mironeasa, S., Codine, G. G., & Mironeasa, C. (2016). Optimization of wheat-grape seed composite flour to improve alpha-amylase activity and dough rheological behavior. *International Journal of Food Properties*, 19(4), 859–872. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1045516>
- Molero Gómez, A., Pereyra López, C., & Martinez de la Ossa, E. (1996). Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 61(3), 227–231. [https://doi.org/10.1016/0923-0467\(95\)03040-9](https://doi.org/10.1016/0923-0467(95)03040-9)
- Monrad, J. K., Howard, L. R., King, J. W., Srinivas, K., & Mauromoustakos, A. (2010). Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2862–2868. <https://doi.org/10.1021/jf904087n>
- Mythili, R., Venkatachalam, P., Subramanian, P., & Uma, D. (2014). Production characterization and efficiency of biodiesel: A review. *International Journal of Energy Research*, 38(10), 1233–1259. <https://doi.org/10.1002/er.3165>
- Ofori-Boateng, C., Keat Teong, L., & Jitkang, L. (2012). Comparative exergy analyses of Jatropha curcas oil extraction methods: Solvent and mechanical extraction processes. *Energy Conversion and Management*, 55, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2011.11.005>
- Oomah, B. D., Liang, J., Godfrey, D., & Mazza, G. (1998). Microwave Heating of Grapeseed: Effect on Oil Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf980412f>

- Özvural, E. B., & Vural, H. (2014). Which is the best grape seed additive for frankfurters: Extract, oil or flour? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(4), 792–797. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6442>
- Pardo, J. E., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A., & Alonso, G. L. (2009). Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, *111*(2), 188–193. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800052>
- Passos, C. P., Silva, R. M., Da Silva, F. A., Coimbra, M. A., & Silva, C. M. (2009). Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. *Journal of Supercritical Fluids*, *48*(3), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.11.001>
- Prado, J. M., Dalmolin, I., Carareto, N. D. D., Basso, R. C., Meirelles, A. J. A., Oliveira, J. V., ... Meireles, M. A. A. (2012). Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, *109*(2), 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.007>
- Rencher, A. C. (2002). *Methods of Multivariate Analysis, Second Edition*. *IIE Transactions*, *37*, 727. <https://doi.org/10.1080/07408170500232784>
- Řezanka, T., & Řezanková, H. (1999). Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis. *Analytica Chimica Acta*, *398*(2–3), 253–261. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00385-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00385-2)
- Rodrigues, J., Miranda, I., Gominho, J., Vasconcelos, M., Barradas, G., Pereira, H., ... Ferreira-Dias, S. (2013). Variability in oil content and composition and storage stability of seeds from *Jatropha curcas* L. grown in Mozambique. *Industrial Crops and Products*, *50*, 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.038>
- Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Castello, J., Van Hecke, E., & Lanoisellé, J. L. (2015). Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.001>
- Rubio, M., Alvarez-Ortí, M., Andrés Alvarruiz, Fernández, E., & Pardo, J. E. (2009). Characterization of oil obtained from grape seeds collected during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(7), 2812–2815. <https://doi.org/10.1021/jf803627t>
- Sabir, A., Unver, A., & Kara, Z. (2012). The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *Journal of the Science of Food and*

Agriculture, 92(9), 1982–1987. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5571>

Santos, L. P., Morais, D. R., Souza, N. E., Cottica, S. M., Boroski, M., & Visentainer, J. V. (2011). Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. *Food Research International*, 44(5), 1414–1418.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.022>

Savoire, R., Lanoisellé, J. L., & Vorobiev, E. (2013). Mechanical Continuous Oil Expression from Oilseeds: A Review. *Food and Bioprocess Technology*.

<https://doi.org/10.1007/s11947-012-0947-x>

Schieber, A., Stintzing, F., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(2001), 401–413. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00012-2)

Sherwin, E. R. (1978). Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55(11), 809–814. <https://doi.org/10.1007/BF02682653>

Singh, J., & Bargale, P. C. (2000). Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. *Journal of Food Engineering*, 43(2), 75–82.

[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00134-X)

Singh, K. K., Wiesenborn, D. P., Tostenson, K., & Kangas, N. (2002). Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(2), 165–170. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0452-3>

Spigno, G., Marinoni, L., & Garrido, G. D. (2017). State of the Art in Grape Processing By-Products. Em *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions*.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00001-6>

Stajić, S., Živković, D., Tomović, V., Nedović, V., Perunović, M., Kovjanić, N., ... Stanišić, N. (2014). The utilisation of grapeseed oil in improving the quality of dry fermented sausages. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(11), 2356–2363.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.12555>

STANDARD FOR NAMED VEGETABLE OILS. (sem data).

Stevenson, D. E., & Hurst, R. D. (2007). Polyphenolic phytochemicals - Just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7237-1>

Syed, U. T., Brazinha, C., Crespo, J. G., & Ricardo-da-Silva, J. M. (2017). Valorisation of

- grape pomace: Fractionation of bioactive flavan-3-ols by membrane processing. *Separation and Purification Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.07.039>
- Tango, J. S., Carvalho, C. R. L., & Soares, N. B. (2004). Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(1), 17–23. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000100007>
- Tangolar, S. G., Özoğul, Y., Tangolar, S., & Torun, A. (2009). Evaluation of fatty acid profiles and mineral content of grape seed oil of some grape genotypes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(1), 32–39. <https://doi.org/10.1080/09637480701581551>
- Teissedre, P. L., Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Peleg, H., & German, J. B. (1996). Inhibition of In Vitro Human LDL Oxidation by Phenolic Antioxidants from Grapes and Wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(1), 55–61. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199601\)70:1<55::AID-JSFA471>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199601)70:1<55::AID-JSFA471>3.0.CO;2-X)
- Temenuzhka, O., Zlatanov, M., & Dimitrova, R. (2016). Chemical composition of seeds of four Bulgarian grape varieties, 31(1), 31–40. <https://doi.org/10.1051/ctv/20163101031>
- Vági, E., Simándi, B., Vászárhelyiné, K. P., Daood, H., Kéry, Á., Doleschall, F., & Nagy, B. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *Journal of Supercritical Fluids*, 40(2), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.05.009>
- Wijendran, V., & Hayes, K. C. (2004). DIETARY n-6 AND n-3 FATTY ACID BALANCE AND CARDIOVASCULAR HEALTH. *Annual Review of Nutrition*, 24(1), 597–615. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132106>
- Yi, C., Shi, J., Kramer, J., Xue, S., Jiang, Y., Zhang, M., ... Pohorly, J. (2009). Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. *Food Chemistry*, 114(2), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.103>