



INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

Área Departamental de Engenharia Química

Extração de produtos e valorização do farelo de arroz com tecnologias mais verdes

INÊS MARIA SANTOS FERNANDES

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

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

Orientador:

Doutor José Augusto Paixão Coelho

Júri:

Presidente: Doutor João Fernando Pereira Gomes

Vogal (Arguente): Doutora Maria Beatriz Pinto P. Palma Nobre

Vogal (Orientador): Doutor José Augusto Paixão Coelho

Lisboa

Setembro de 2021



INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

Área Departamental de Engenharia Química

Extração de produtos e valorização do farelo de arroz com tecnologias mais verdes

INÊS MARIA SANTOS FERNANDES

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

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

Orientador:

Doutor José Augusto Paixão Coelho

Júri:

Presidente: Doutor João Fernando Pereira Gomes

Vogal (Arguente): Doutora Maria Beatriz Pinto P. Palma Nobre

Vogal (Orientador): Doutor José Augusto Paixão Coelho

Lisboa

Setembro de 2021

"Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante."

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

Gostaria de demonstrar o meu profundo agradecimento a um conjunto de pessoas que apoiaram e contribuíram para a execução deste Trabalho Final de Mestrado.

Em especial, ao meu orientador, ao Professor Doutor José Coelho, evidencio a minha gratidão pela sua orientação e ajuda neste ano atípico. Apesar de todas as adversidades, sempre demonstrou total disponibilidade e apoio constante. Agradeço também pelo conhecimento transmitido, empenho, paciência e pelo agradável ambiente de laboratório, indiscutivelmente tornou a realização deste percurso muito mais fácil.

Agradeço ao Agrupamento de Produtores de Arroz do Vale do Sado Lda. – Aparroz, nomeadamente, à diretora comercial Catarina de Novais e ao Engenheiro de produção Nuno Nascimento por me terem facultado a matéria-prima (farelo de arroz), tornando, assim, possível a realização desta investigação.

Muitíssimo obrigada à Professora Doutora Paula Robalo e Doutora Catarina Sousa, que sempre asseguraram o acesso ao laboratório de Química Inorgânica e me auxiliaram de bom grado o uso de materiais e equipamentos. Ao Professor Doutor Manuel Matos e Doutora Cecília Calado, sou grata por me disponibilizarem, incessantemente, o equipamento de espectrofotometria, no laboratório de Biomédica, e pela simpatia demonstrada, nas diversas deslocações ao mesmo.

Ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL) e Área Departamental de Engenharia Química agradeço a oportunidade e as condições fornecidas ao longo do meu percurso no Centro de Investigação em Engenharia Química e Biotecnologia (CIEQB).

Aos meus preciosos amigos que, nesta fase, entenderam e respeitaram a minha ausência, mesmo distantes demonstraram-se presentes, e aos que acompanharam a minha vida académica de perto, o meu sincero agradecimento por me incentivarem, por me apoiarem e por toda a amizade.

Às pessoas que mais estimo neste mundo, os meus pais - Diamantino e Ana Paula - e o meu irmão - Paulo - a quem agradeço, do fundo do meu coração, por me terem apoiado e incentivado incondicionalmente, por acreditarem sempre nas minhas capacidades, mesmo quando eu não o fazia, por me terem

transmitido e inculcido os seus valores fazendo de mim a pessoa que sou hoje, não só a nível pessoal como profissional. Ser-lhes-ei eternamente agradecida pelo esforço efetuado na realização desta etapa.

Sou profundamente grata à pessoa que me acompanhou desde o começo do meu percurso académico, o Pedro, por me escutar e me acalmar as minhas inseguranças, preocupações e desânimos, incentivando-me e ajudando a executar 120% de mim mesma. Um obrigada não é suficiente por toda a paciência e compreensão demonstradas perante o meu péssimo feitio. Sem dúvida alguma, esta etapa teria sido mais difícil e demorada sem ele.

Resumo

No mundo contemporâneo, cada vez mais, tem-se consciência de que as propriedades antioxidantes de diversos compostos desempenham um papel essencial no organismo, ajudando na proteção das células e reduzindo a ameaça de certo tipo de doenças.

Nesta dissertação analisou-se o óleo extraído do farelo de arroz, pois este apresenta na sua constituição uma grande porção de antioxidantes naturais, tais como, tocoferóis, tocotrienóis e fitoesteróis. Estes fornecem ao óleo uma melhor resistência à oxidação e deterioração.

Procedeu-se à obtenção de frações de óleo de farelo de arroz enriquecidas em antioxidantes através do método convencional, extração em Soxhlet com dois solventes (hexano e etanol), e do método não convencional, extração supercrítica com dióxido de carbono (CO₂). Utilizou-se CO₂ supercrítico numa gama de pressões entre os 250 e 400 bar (25 e 40 MPa), com uma temperatura entre os 40 e os 80°C (313,15 e os 353,15K) e um caudal entre os 0,5 e 1,5 L/minuto (0,9E-03 e 2,7E-03 kg/min). Implementou-se à última técnica mencionada, um Planeamento Estatístico de Experiências (DOE, do inglês *Design of Experiments*) em duas etapas, de forma a delinear as condições para análise de diversas respostas resultantes de cada ensaio. As respostas do objeto de estudo foram: o rendimento do processo, a quantidade de flavonoides e polifenóis totais nos óleos.

Utilizou-se, inicialmente, um plano fatorial completo, FFD, sucedido por um planeamento composto central, CCD, que possibilitou definir as melhores condições laboratoriais para a extração supercrítica com CO₂, otimizando as respostas obtidas para o óleo de farelo de arroz, com base nos fatores estudados (pressão, temperatura e caudal de CO₂).

Para a caracterização do óleo de farelo de arroz recorreu-se ao método de atividade antioxidante do radical DPPH, ao método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de polifenóis totais e ao método do cloreto de alumínio para o teor de flavonoides. As curvas de calibração com o DPPH otimizaram diversos solventes, permitindo estabelecer as melhores condições para análise dos extratos. Submeteram-se estes dados a uma análise de variância (ANOVA).

Realizou-se, ainda, a modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais, adquiridos na extração supercrítica, por meio dos métodos fundamentados no sistema de fluxo pistão (Sovová 1994 e Sovová 2005) e através do método de dessorção em condições supercríticas (Tan e Liou 1989).

Os resultados, obtidos pelo modelo Sovová 2005, apresentaram uma melhor capacidade de ajuste, comparativamente aos restantes modelos matemáticos utilizados.

Verificou-se que, comparando os solventes utilizados na extração em Soxhlet, obteve-se um melhor rendimento com o hexano (7,31%), aos 90 minutos. Por sua vez, este resultado não demonstrou uma diferença significativa quando comparado com os rendimentos apresentados pela extração supercrítica com CO₂, 6,91% (40 MPa, 353,15K com 0,9E-03 kg/min) e 7,12% (35 MPa, 338,15K e 1,8E-03 kg/min).

Palavras-chave: Farelo de arroz; óleo vegetal; extração em Soxhlet; extração supercrítica com CO₂; metodologia de superfície de resposta; atividade antioxidante; polifenóis totais; flavonoides; análise de variância; modelação matemática.

Abstract

Nowadays, it is increasingly aware that the antioxidant properties of various compounds play an essential role in the body, helping to protect cells and reducing the threat of certain types of diseases.

Having this clear, this dissertation analyzed the oil extracted from rice bran, as it has in its constitution a large portion of natural antioxidants, such as, tocopherols, tocotrienols and phytosterols. These provide to the oil an improved resistance to oxidation and deterioration.

In this work, through the conventional method, the Soxhlet extraction with two solvents (ethanol and hexane), and the unconventional method, supercritical extraction with carbon dioxide (CO₂), we were able to obtain rice bran oil fractions, which are known to have an abundance of antioxidants. Supercritical CO₂ was used in a pressure range between 250 and 400 bar (25 and 40 MPa), at a temperature between 40 and 80°C (313.15 and 353.15K) and a flow rate between 0.5 and 1.5 L/min (0.9E-03 and 2.7E-03 kg/min). The last mentioned technique was implemented, a Design of Experiments (DOE) in two stages, in order to outline the conditions for analyzing the various responses resulting from each trial. The answers of the object of study were: the yield, the amount of total flavonoids and polyphenols in the oils.

Initially, a fractional factorial design, FFD, was used, followed by a central composite design, CCD, which made it possible to define the best laboratory conditions for supercritical extraction with CO₂, optimizing the responses obtained for rice bran oil, based on factors studied (pressure, temperature and flow of CO₂).

The composition and properties of rice bran oil was investigated in order to examine is antioxidant activity, between the analyzes performed are identified the DPPH method, the Folin-Ciocalteu method for the determination of polyphenol content and the method of aluminum chloride to the flavonoid content. The data, relating to the calibration curve used in the DPPH method, was submitted to a statistical treatment by analysis of variance (ANOVA).

We carried out the mass transfer mathematical modeling of the experimental results obtained in the supercritical extraction by methods based on plug flow model (Sovová 1994 and Sovová 2005) and through desorption method under supercritical conditions (Tan and Liou 1989). The results analyzed

by Sovová 2005 model revealed a better ability to adjust compared to other mathematical models used.

It was found that, comparing the solvents used in Soxhlet extraction, was obtained a better yield with hexane (7.31%), at 90 minutes. This result did not show a significant difference when compared to the yields presented by supercritical extraction with CO₂, 6.91% (40 MPa, 353.15K with 0.9E-03 kg/min) and 7.12% (35 MPa, 338.15K and 1.8E-03 kg/min).

Keywords: Rice bran; vegetable oil; Soxhlet extraction; supercritical CO₂ extraction; response surface methodology; antioxidant activity; total polyphenols; flavonoids; analysis of variance; mathematical modeling.

Glossário

Abreviaturas e Siglas

Letra A

ANOVA	Teste de análise de variância
AAD	Desvio médio absoluto (Absolute average deviations)

Letra C

CCD	Desenho do composto central
CO₂	Dióxido de carbono
CV	Coefficiente de variação (Coefficient of variation)

Letra D

DOE	Planeamento estatístico de experiências
DX11	Design Expert 11
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil 2,2-difenil-1-(2,4,6 – trinitrofenil)hidrazin-1-il (nome IUPAC)

Letra E

EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
ESC	Extração supercrítica
EtOH	Etanol

Letra F

FA	Ácidos gordos
FFD	Desenho fatorial fracionário
FSC	Fluido supercrítico

Letra H

HEX	Hexano
------------	--------

Letra I

IC₅₀	Concentração que inibe metade, 50%
------------------------	------------------------------------

Letra L

LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação

Letra M

MeOH	Metanol
MV	Valor médio (mean value)

Letra P

P_c	Pressão crítica
p. ex.	Por exemplo
PI	Índice de polaridade (Polarity index)
p-value	Valores de probabilidade (probability values)

Letra R

RBO	Óleo de farelo de arroz (Rice bran oil)
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta (Response surface methodology)

Letra S

SD	Desvio padrão (Standard deviation)
SFE	Extração de fluido supercrítico (Supercritical fluid extraction)
SOX	Soxhlet

Letra T

t.a.	Temperatura ambiente
T_c	Temperatura crítica
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
Trolox	Ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano

Letra V

VIF	Erro da falta de ajuste (variance inflation factor)
------------	---

Símbolos e Parâmetros

Letras Romanas

a	m^{-1}	Superfície do volume unitário de partículas
C	kg/kg	Concentração do soluto na fase fluida
C_0	kg/kg	Concentração inicial do soluto na fase fluida
C_1	-	Constante dos modelos Sovová (de 1994 e de 2005)
C_2	-	Constante dos modelos Sovová (de 1994 e de 2005)
e	kg/kg	Rendimento da extração
e_{calc}	kg/kg	Rendimento obtido através dos modelos Sovová (de 1994 e de 2005)
e_{exp}	kg/kg	Rendimento experimental
H	m	Altura do leito na extração supercrítica
K	-	Relação da concentração do soluto na fase sólida e gasosa (coeficiente de partição)
k_s	m/s	Coefficiente de transferência de massa interna na fase sólida
k_f	m/s	Coefficiente de transferência de massa externa na fase fluida
m	kg	Massa inicial de amostra colocada no extrator
q	kg/kg	Concentração de óleo (soluto) na fase sólida da amostra (arroz)
q^*	kg/kg	Concentração interfacial do óleo (soluto)
q_0	kg/kg	Concentração inicial de óleo (soluto) na fase sólida
q_k	kg/kg	Matéria inicial de óleo (soluto), inacessível, na amostra sólida
Q	kg/s	Caudal mássico de solvente
Q_c	kg/kg	Coordenada onde ocorre a mudança da extração rápida para a lenta
r	-	Fração inicial de óleo (soluto) nas células fragmentadas

r_0	-	Fração inicial de soluto (total e nas células intactas)
t	s	Tempo
u	m/s	Velocidade superficial do fluido supercrítico
x_0	%	Quantidade de soluto (óleo) total na matriz sólida (farelo de arroz)
Y	%	Rendimento
Z	-	Proporção dos parâmetros adimensionais do coeficiente externo de transferência de massa
zw	-	Coordenada axial adimensional no meio da extração rápida e lenta

Letras Gregas

ε	-	Porosidade do leito
γ	kg/kg	Razão entre a massa de solvente no arroz (matriz) e no leito
ρ_s	kg/m ³	Densidade da fase sólida (arroz)
ρ_f	kg/m ³	Densidade da fase fluida (solvente – CO ₂)
τ	-	Tempo adimensional
τ_m	-	Tempo onde começa o segundo período no modelo Sovová (1994)
τ_n	-	Tempo onde começa o terceiro período no modelo Sovová (1994)

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	viii
Glossário	x
Abreviaturas e Siglas	x
Símbolos e Parâmetros	xiii
Índice de Figuras	xix
Índice de Tabelas	xxiii
Capítulo 1	1
1. Introdução	1
1.1. Contextualização e Motivação.....	1
1.2. Objetivos e descrição do projeto laboratorial.....	3
1.3. Organização da dissertação.....	4
Capítulo 2	6
2. Revisão da Literatura	6
2.1. A cultura do arroz no mundo.....	6
2.2. A cultura do arroz na Europa e em Portugal.....	6
2.3. Arroz, uma planta herbácea.....	8
2.4. Farelo de arroz.....	11
2.5. Óleo de Farelo de arroz.....	13
2.6. Técnicas clássicas de extração do óleo.....	14
2.6.1. Extração em Soxhlet.....	15
2.6.2. Extração Supercrítica com CO ₂	16
2.7. Técnicas de quantificação e caracterização dos extratos.....	20
2.7.1. Método do Radical Livre DPPH.....	21
2.7.2. Determinação do teor de polifenóis totais.....	22
2.7.3. Determinação do teor de flavonoides.....	24
2.8. Desenho Experimental (Design Expert 11).....	26
2.9. Tratamento de resultados e análises estatísticas.....	28
2.10. Modelação Matemática da transferência de massa em Extração Supercrítica com CO ₂	29

2.10.1. Modelo I – Modelo de Sovová 1994	31
2.10.2. Modelo II – Modelo de Sovová 2005.....	34
2.10.3. Modelo III – Modelo de Tan e Liou 1989.....	35
Capítulo 3	38
3. Materiais e técnicas experimentais	38
3.1. Preparação da amostra do farelo de arroz	38
3.1.1. Determinação do teor de humidade e densidade.....	38
3.2. Obtenção dos extratos do farelo de arroz.....	41
3.2.1. Extração em Soxhlet	41
3.2.2. Extração Supercrítica com CO ₂	43
3.3. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos do farelo de arroz	45
3.3.1. Método do Radical Livre DPPH.....	45
3.3.2. Determinação dos polifenóis totais (TPC)	46
3.3.3. Determinação do teor de flavonoides.....	47
3.4. Planeamento Estatístico de Experiências (DOE)	48
3.4.1. Desenho fatorial fracionário (FFD – Fractional Factorial Design)	48
3.4.2. Desenho do composto central (CCD – Central Composite Design)	51
Capítulo 4	56
4. Resultados e Discussão	56
4.1. Extração em Soxhlet do óleo do farelo de arroz.....	56
4.2. Extração Supercrítica com CO ₂ do óleo do farelo de arroz através do desenho fatorial fracionário (FFD).....	58
4.3. Caracterização da atividade antioxidante, flavonoides e polifenóis totais no óleo de farelo de arroz.....	64
4.3.1. Comparação de diferentes curvas de calibração para o método do radical livre DPPH – influência dos solventes	65
4.3.1.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH para as amostras.....	74
4.3.2. Determinação da quantidade de flavonoides.....	76

4.3.3. Determinação dos polifenóis totais.....	77
4.4. Análise dos resultados da extração em Soxhlet e a extração supercrítica com CO ₂ , recorrendo ao desenho fatorial fracionário (FFD)	78
4.5. Extração supercrítica com CO ₂ do óleo do farelo de arroz através do desenho do composto central (CCD).....	84
4.6. Modelação Matemática da transferência de massa.....	97
4.6.1. Modelação do processo de obtenção dos óleos do farelo de arroz	97
4.6.2. Análise dos parâmetros adimensionais nos resultados de modelação	105
Capítulo 5	109
5. Conclusões e perspectivas futuras	109
5.1. Conclusões	109
5.2. Perspetivas futuras	111
Contribuições.....	113
Referências Bibliográficas.....	114
ANEXOS	123
ANEXO A – Dados estatísticos relativos ao arroz produzido na União Europeia, em 2020	123
ANEXO B – Medições realizadas para a extração do óleo supercrítico	124
ANEXO C – Medições realizadas para as curvas de calibração com uma solução padrão trolox	134
Anexo D – Caraterização da quantidade de flavonoides e dos polifenóis totais existentes no óleo supercrítico	139
Anexo E – Valores obtidos de rendimento a dois tempos no desenho experimental CCD, e respetiva % de extração.....	141
Anexo F – Contribuições Científicas.....	142
Anexo G – Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais	145

Índice de Figuras

Figura 1 - Produtividade versus produção nos países da União Europeia, adaptado da referência: (Eurostat, 2020).....	7
Figura 2 - Diferentes regiões de cultivo do arroz, em Portugal, adaptado da referência: (Soffiati, 2021).	8
Figura 3 – Exemplos de tamanhos existentes de arroz, adaptado da referência: (Saichuk, 2005).	9
Figura 4 - Corte longitudinal de um grão de arroz (Marquez, 2010).	10
Figura 5 – Exemplos de antioxidantes contidos nas plantas, das três grandes classes.	14
Figura 6 - Diagrama de fases da substância pura CO ₂ para se identificar o seu ponto crítico, adaptado da referência: (Voormeij & Simandl, 2002).	17
Figura 7 – Percurso visual do equilíbrio líquido-gás até se atingir o ponto crítico da substância pura – CO ₂ , adaptado da referência: (Miller & Phillips, 2020).	17
Figura 8 – Exemplos referentes a espécies reativas de oxigénio.....	20
Figura 9 – Exemplos referentes a espécies reativas de nitrogénio.....	21
Figura 10 – Exemplos das estruturas das principais classes de flavonoides.	25
Figura 11 – Estrutura geral dos flavonoides, adaptado da referência: (Martins & Paganini-costa, 2011).....	25
Figura 12 - Balança térmica Kern MRS I20-3 utilizada para calcular a humidade do farelo de arroz.	39
Figura 13 - Esquema referente à instalação da Extração em Soxhlet, adaptado da referência: (Dabbs et al., 2006).	42
Figura 14 - Montagem laboratorial do método convencional, extração em Soxhlet.	42
Figura 15 - Esquema referente à instalação do equipamento de Extração Supercrítica: G – Garrafa de gás (CO ₂); PT – Manómetro; BP – Regulador de Pressão (“Back-Pressure”); C – Compressor; P – Bomba; TI – Indicador de Temperatura; E – Extrator; MM – Válvula Micrométrica; S – Separador; MV – Caudalímetro; Tot – Totalizador (Georgieva et al., 2018).	43
Figura 16 - Montagem laboratorial para o método alternativo, extração supercrítica com CO ₂ , Applied Separations Spe-ed SFE.....	44
Figura 17 - Óleos obtidos através da extração em Soxhlet.	56
Figura 18 - Óleos obtidos através da extração supercrítica com CO ₂	59

Figura 19 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma temperatura de 353,15K.....	60
Figura 20 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma temperatura de 313,15K.....	61
Figura 21 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma pressão de 25 MPa.....	62
Figura 22 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma pressão de 40 MPa.....	63
Figura 23 - Curva de calibração do trolox, o antioxidante usado, em 50% metanol com 50% isopropanol, tris e DPPH.....	66
Figura 24 - Curva de calibração do trolox, com a mistura de 50% metanol 50% isopropanol, em DPPH.....	67
Figura 25 - Curva de calibração e sua reta para o trolox, o antioxidante usado, em metanol com 100 mM de DPPH.....	69
Figura 26 - Curva de calibração e sua reta para o trolox, o antioxidante usado, em 50% metanol com 50% etanol com 100 mM de DPPH.....	71
Figura 27 - Curva de calibração e sua reta de linearidade do trolox, o antioxidante usado, em 50% etanol com 50% água, em DPPH.....	72
Figura 28 - Curva de calibração e regressão linear correspondente, usando como referência a catequina, para quantificação dos flavonoides.....	76
Figura 29 - Curva de calibração e regressão linear correspondente, usando como referência a ácido gálico, para os polifenóis totais.....	77
Figura 30 - Superfície obtida através do erro padrão relativo face a dois fatores da matriz FFD (A: Pressão - MPa e B: Temperatura - K), para um valor constante de caudal (1,8E-03 kg/min).....	82
Figura 31 - Correlação entre os valores estimados (previstos) e experimentais para os valores de rendimento de óleo por extração supercrítica com CO ₂ , de acordo com as condições da Tabela 22.....	83
Figura 32 - Correlação entre os valores estimados (previstos) e experimentais para os valores de flavonoides no óleo por extração supercrítica com CO ₂ , de acordo com as condições da Tabela 22.....	83
Figura 33 - Correlação entre os valores estimados (previstos) e experimentais para os valores de TPC no óleo por extração supercrítica com CO ₂ e acordo com as condições da Tabela 22.....	84
Figura 34 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma temperatura de 338,15K.....	86

Figura 35 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma pressão de 35 MPa.	87
Figura 36 - Superfície obtida através do erro padrão relativo face a dois fatores da matriz CCD (A: Pressão - MPa e B: Temperatura - K).....	89
Figura 37 - Superfície obtida através do rendimento (%) face a dois fatores da matriz CCD (A: Pressão - MPa e B: Temperatura - K).....	92
Figura 38 - Curvas de superfície obtidas pelo modelo polinomial quadrático para o rendimento do óleo obtido na extração supercrítica em função das variáveis independentes, temperatura e pressão.....	93
Figura 39 - Correlações obtidas entre os valores de rendimento previstos e experimentais.	94
Figura 40 - Verificação do pressuposto da análise de variância para a probabilidade normal de resíduos, para a resposta: rendimento (%).....	94
Figura 41 - Verificação do pressuposto da análise de variância para a probabilidade normal de resíduos, para a resposta: flavonoides ($\mu\text{mol EC/g ext}$).	95
Figura 42 - Verificação do pressuposto da análise de variância para a probabilidade normal de resíduos, para a resposta: TPC - polifenóis totais ($\mu\text{mol EAG/g ext}$).	96
Figura 43 - Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais com FFD, para uma temperatura de 313,15K, através de três modelos (Sovová 1994, Sovová 2005, Tan e Liou 1989).....	100
Figura 44 - Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais com FFD, para uma temperatura de 353,15, através de três modelos (Sovová 1994, Sovová 2005, Tan e Liou 1989).	102
Figura 45 - Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais com CCD, para uma temperatura de 338,15K, através de três modelos (Sovová 1994, Sovová 2005, Tan e Liou 1989).....	103
Figura 46 - Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais com CCD, para uma pressão de 35 MPa, através de três modelos (Sovová 1994, Sovová 2005, Tan e Liou 1989).....	104
Figura 47 - Número de Reynolds em função da velocidade linear, para uma pressão de 40 MPa e uma temperatura de 353,15K.	105
Figura 48 - Número de Schmidt em função da velocidade linear, para uma pressão de 40 MPa e uma temperatura de 353,15K.	106
Figura 49 - Número de Sherwood em função da velocidade linear, para uma pressão de 40 MPa e uma temperatura de 353,15K.	107

Figura 50 - Teor de flavonoides, em $\mu\text{mol EC/gext}$, através do método de microplaca a 415 nm, do extrato do farelo de arroz obtido pelas extrações - Soxhlet e Supercrítica com CO_2 - em ordem à concentração, em ppm.	139
Figura 51 - Teor de polifenóis totais, em $\mu\text{mol EAG/g ext}$, através do método de microplaca a 655 nm, do extrato do farelo de arroz obtido pelas extrações - Soxhlet e Supercrítica com CO_2 - em ordem à concentração, em mg/mL.	140
Figura 52 - Resumo da comunicação em painel no Fórum de Engenharia Química de Lisboa, 11-13 de Maio de 2021.	142
Figura 53 - Resumo da comunicação em painel no 1.º Encontro Ibérico de Fluidos Supercríticos em Santiago de Compostela, 18-19 de Fevereiro de 2020.	143
Figura 54 - Exemplo de um documento em Microsoft Excel referente ao modelo I, o de Sovová 1994.	145
Figura 55 - Exemplo de um documento em Microsoft Excel referente ao modelo II, o de Sovová 2005.	146
Figura 56 - Exemplo de um documento em Microsoft Excel referente ao modelo III, o de Tan e Liou 1989.	146

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Apresentação do plano de etapas com as respectivas tarefas elaboradas para esta dissertação, de forma a extrair produtos e a valorizar o farelo de arroz.	3
Tabela 2 - Classificação científica do arroz.	10
Tabela 3 - Composição e propriedades referentes ao farelo de arroz (Juliano & Hicks, 1996).	12
Tabela 4 - Percentagem de humidade do farelo de arroz.	39
Tabela 5 - Determinação da densidade da matéria-prima farelo de arroz, antes da secagem.	40
Tabela 6 - Determinação da densidade do farelo de arroz sujeito a secagem.	40
Tabela 7 - Condições de separação do solvente do óleo, no Rota Vapor e na Linha de Vácuo.	43
Tabela 8 - Descrição do desenho fatorial fracionário, FFD (2^3), através de fatores de codificação.	50
Tabela 9 - Descrição do desenho fatorial fracionário, FFD (2^3), através de fatores reais de trabalho.	51
Tabela 10 - Descrição do desenho do composto central, CCD, através de fatores de codificação.	53
Tabela 11 - Descrição do desenho do composto central, CCD, através de fatores reais de trabalho.	54
Tabela 12 - Resultados obtidos na Extração em Soxhlet, em hexano e etanol.	57
Tabela 13 - Parâmetros de coeficientes da equação para a curva de calibração, do trolox em DPPH, com a mistura de 50% metanol 50% isopropanol.	68
Tabela 14 - Parâmetros da curva de calibração, através do método DPPH com o metanol puro, para o antioxidante trolox.	70
Tabela 15 - Parâmetros retirados da regressão ANOVA, através do método DPPH com 50% metanol e 50% etanol, para o antioxidante trolox.	71
Tabela 16 - Parâmetros retirados da regressão ANOVA, através do método DPPH com 50% etanol e 50% água, para o antioxidante trolox.	73
Tabela 17 - IC_{50} obtido para o trolox em diferentes solventes.	73
Tabela 18 - Percentagem de inibição e equivalente em trolox para as amostras, obtidas através do método convencional e não convencional.	74

Tabela 19 - Percentagem de inibição e equivalente em trolox para as amostras, obtidas através do método não convencional, em metanol puro.....	75
Tabela 20 - Parâmetros retirados da regressão ANOVA, através do composto de referência da catequina, para quantificação dos flavonoides.....	76
Tabela 21 - Parâmetros retirados da regressão ANOVA, através do composto de referência do ácido gálico, para os polifenóis totais.	78
Tabela 22 - Resultados planeados para o FFD, com os fatores das respetivas magnitudes, de forma a otimizar o desempenho de extração e respostas associadas.	79
Tabela 23 - Resultados planeados para o CCD, com os fatores das respetivas magnitudes, de forma a otimizar o desempenho de extração e respostas associadas.	88
Tabela 24 - Resultados da ANOVA para o desenho selecionado, CCD. Modelo de regressão estimado da relação entre uma variável de resposta e variáveis independentes.	90
Tabela 25 - Resultados obtidos através da modelação matemática e coeficientes de transferência de massa para a extração supercrítica do óleo do farelo de arroz.	98
Tabela 26 - Valores de produção, área e respetiva produtividade do arroz nos países da União Europeia, no ano de 2020 (Eurostat, 2020).....	123
Tabela 27 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A1 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao FFD (25 MPa, 313,15K, 2,7E-03 kg/min).....	124
Tabela 28 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A2 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao FFD (40 MPa, 353,15K, 0,9E-03 kg/min).....	124
Tabela 29 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A3 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao FFD (25 MPa, 313,15K, 0,9E-03 kg/min).....	125
Tabela 30 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A4 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao FFD (40 MPa, 313,15K, 0,9E-03 kg/min).....	125
Tabela 31 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A5 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao FFD (40 MPa, 313,15K, 2,7E-03 kg/min).....	126

Tabela 32 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A6 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao FFD (25 MPa, 353,15K, 0,9E-03 kg/min).....	126
Tabela 33 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A7 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao FFD (25 MPa, 353,15K, 2,7E-03 kg/min).....	127
Tabela 34 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A8 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao FFD (40 MPa, 353,15K, 2,7E-03 kg/min).....	127
Tabela 35 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A9 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (30 MPa, 323,15K, 1,8E-03 kg/min).....	128
Tabela 36 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A10 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (40 MPa, 323,15K, 1,8E-03 kg/min).....	128
Tabela 37 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A11 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (30 MPa, 353,15K, 1,8E-03 kg/min).....	129
Tabela 38 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A12 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (42 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).....	129
Tabela 39 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A13 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).....	130
Tabela 40 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A14 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).....	130
Tabela 41 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A15 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 317,15K, 1,8E-03 kg/min).....	131
Tabela 42 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A16 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).....	131
Tabela 43 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A17 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (40 MPa, 353,15K, 1,8E-03 kg/min).....	132

Tabela 44 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A18 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 359,15K, 1,8E-03 kg/min).....	132
Tabela 45 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A19 da Extração Supercrítica com CO ₂ recorrendo ao CCD (27,9 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).....	133
Tabela 46 - Curva de calibração, em 50% metanol com 50% isopropanol, tris e 100 mM de DPPH, variação da percentagem de inibição em função da concentração de trolox.	134
Tabela 47 - Curva de calibração, em 50% metanol com 50% isopropanol e 100 mM de DPPH, variação da percentagem de inibição em função da concentração de trolox.	135
Tabela 48 - Curva de calibração, em metanol puro, variação da percentagem de inibição em função da concentração de trolox.....	136
Tabela 49 - Curva de calibração, em 50% metanol com 50% etanol, variação da percentagem de inibição em função da concentração de trolox....	137
Tabela 50 - Curva de calibração, em 50% etanol com 50% água, variação da percentagem de inibição em função da concentração de trolox.....	138
Tabela 51 - Resultados planeados para o CCD com os fatores com respetivas magnitudes para otimizar o desempenho de extração e respostas associadas.....	141

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Contextualização e Motivação

Desde a época da revolução industrial, meados do século XVIII, até aos dias de hoje, deparamo-nos com problemas derivados do aumento significativo da poluição no planeta Terra. Gradualmente, os seres humanos adquiriram uma consciencialização relativamente às consequências que a poluição atmosférica provoca na Terra e na sua saúde.

De acordo com a Agência Europeia do Ambiente (AEA) (Ambiente, 2020) estima-se que, aproximadamente, 90% dos cidadãos europeus estão sujeitos a poluentes cuja concentração é mais elevada que o recomendado, sendo prejudicial à sua saúde, encurtando o tempo de vida dos mesmos, em média, por 8 meses.

A população encontra-se, constantemente, exposta a radicais livres. Quer seja, através da própria respiração (originando os mais abundantes, de oxigénio), da inalação de poluentes (derivados do tabaco ou de gases oriundos de veículos motorizados), da longa exposição a raios UV (radiação solar) ou do processo de metabolização da comida (Mohammed et al., 2015).

Esses radicais livres são iões (moléculas instáveis) que, acima de tudo, tentam tornar-se estáveis ao captar eletrões de outras moléculas. Embora sejam importantes para a saúde, em excesso estes danificam e causam distúrbios no funcionamento do organismo humano, alterando assim, o ADN (Ácido desoxirribonucleico), provocando o envelhecimento e doenças (por exemplo, o cancro) (Lobo et al., 2010).

Por tais razões, é necessário possuir na alimentação antioxidantes, visto que estes apresentam uma elevada eficiência em estabilizar os radicais livres, na medida em que doam um dos seus eletrões, preservando deste modo, as células saudáveis (Mohammed et al., 2015). Estes encontram-se em alimentos, naturais e refinados, em produtos cosméticos, cremes de beleza e de anti-idade, e em produtos farmacêuticos (Lobo et al., 2010).

O farelo de arroz, como um subproduto do arroz, apresenta na sua constituição uma grande quantidade de antioxidantes naturais, tais como tocoferóis, tocotrienóis e fitoesteróis, sendo atualmente utilizado, maioritariamente, para ração animal.

Assim, a motivação deste trabalho final de mestrado consiste na tentativa de se usar esta matéria-prima para se conseguir uma maior quantidade de antioxidantes naturais para uso humano. Idealiza-se, então, um novo percurso para este subproduto. As frações de óleo de farelo de arroz serão concebidas através de uma via sustentável, a extração supercrítica com CO₂. Este método demonstra ser vantajoso, pois dispensa tratamento ao solvente usado, uma vez que, o dióxido de carbono é reintroduzido no processo, possuindo uma menor pegada ecológica, mesmo comparado com outros métodos integrados na “química verde”, tornando-se assim ainda mais amigável do meio ambiente.

1.2. Objetivos e descrição do projeto laboratorial

O objetivo deste trabalho reside na obtenção de frações de óleo, através da extração de produtos e na valorização do farelo de arroz, mediante tecnologias mais verdes, usando solventes ambientalmente sustentáveis. Consequentemente, elaborou-se um plano, por meio de diversas etapas, detalhadamente descritas de seguida, com o intuito de se concretizar o objetivo proposto.

Tabela 1 - Apresentação do plano de etapas com as respetivas tarefas elaboradas para esta dissertação, de forma a extrair produtos e a valorizar o farelo de arroz.

Etapa 1 – Extração de produtos

Método convencional

- Extração em Soxhlet

Método não convencional

- Extração Supercrítica com CO₂

(Nota: Realizou-se com o auxílio de um programa de desenho experimental, Design Expert 11.)

Etapa 2 – Caraterização dos óleos obtidos

Caraterização da atividade antioxidante

- Método do radical livre DPPH
 - Determinação do conteúdo em polifenóis totais
 - Determinação do conteúdo em flavonoides
-

Etapa 3 – Modelação numérica de resultados

Teste estatístico de análise de variância (ANOVA)

Modelo matemático Sovová 1994

Modelo matemático Sovová 2005

Modelo matemático Tan e Liou 1989

1.3. Organização da dissertação

Este trabalho final de mestrado está estruturado em cinco capítulos. Neste primeiro capítulo descreve-se o enquadramento da problemática abordada, a causa fundamentada do crescente interesse no tema proposto e ainda contém os objetivos para esta dissertação, sendo estes investigados ao longo do documento.

O segundo capítulo refere-se à revisão bibliográfica de diversos assuntos relacionados com o tema explorado, destacando, os quantitativos produzidos do arroz no mundo e em Portugal, a descrição geral da matéria-prima analisada, o farelo de arroz e do produto final desejado, o óleo vegetal. Abordaram-se, também, os conceitos teóricos dos processos implementados em laboratório e dos modelos numéricos utilizados na simulação, definindo os seus parâmetros.

As metodologias experimentais empregues laboratorialmente encontram-se descritas, em detalhe, no terceiro capítulo.

No quarto capítulo, apresentam-se as condições implementadas e analisam-se os resultados obtidos, experimentalmente e numericamente. Discute-se ao pormenor a eficiência dos métodos utilizados, o poder antioxidante do óleo extraído do farelo de arroz, o ajuste numérico dos dados experimentais e o(s) fator(es) relevante(s) para esta atividade laboratorial.

No último capítulo – quinto - enumeram-se as conclusões pertinentes retiradas desta dissertação, bem como, as perspetivas de trabalhos futuros, baseadas nos resultados obtidos.

Capítulo 2

2. Revisão da Literatura

2.1. A cultura do arroz no mundo

O cultivo agrícola de arroz, também conhecido como orizicultura, ocupa 9% da terra arável do planeta, abrangendo 112 países (53°N a 35°S) numa área total de 164 milhões de hectares (Mha). A produção deste cereal encontra-se, mundialmente, na 2.ª posição, originando, anualmente, cerca de 730 milhões de toneladas (Mt).

O continente asiático é responsável por 90,93% da produção de arroz, a nível global, sendo que os maiores produtores são a China, a Índia e a Indonésia. De referir que a Índia produz 156 Mt em 44 Mha, no entanto a China consegue uma produção de 202 Mt numa área menor (30 Mha).

No mercado mundial são transacionados somente 7% do arroz produzido, tendo como maiores exportadores a Índia, o Vietname, a Tailândia, o Paquistão e os USA. Os maiores importadores são a Nigéria, a China, a Indonésia, as Filipinas, o Irão e o Iraque. Ao longo das últimas décadas, observou-se o maior crescimento no consumo deste cereal no continente africano (Almeida & Marques, 2013).

2.2. A cultura do arroz na Europa e em Portugal

No continente europeu, a orizicultura atinge os 4,4 Mt por ano (representando, apenas, 0,55% da produção mundial), onde 68,18% (cerca de 3 Mt) se produz na União Europeia (UE), numa área de 0,466 Mha (correspondendo a uma produtividade média de 5,8 t/ha), promovendo uma autossuficiência de 69%. A UE é um importador mundial relevante, visto que possui uma capacidade inferior de produção face às suas necessidades de consumo, importando, assim, aproximadamente 1 Mt/ano de arroz branco (Almeida & Marques, 2013).

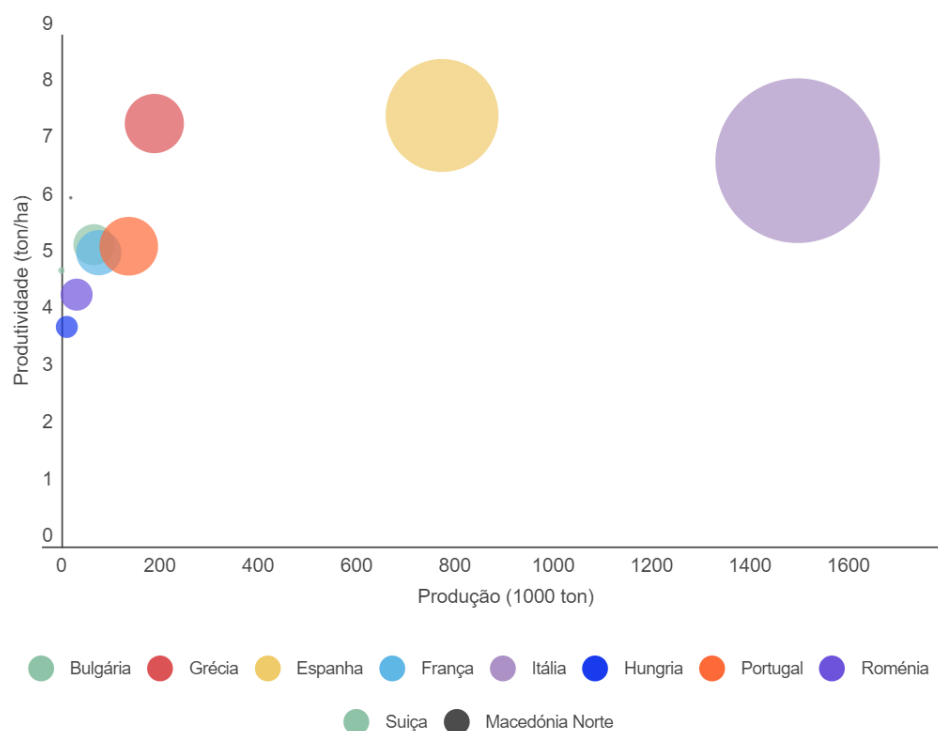


Figura 1 - Produtividade versus produção nos países da União Europeia, adaptado da referência: (Eurostat, 2020).

*Os valores apresentados na Figura 1 encontram-se, em detalhe, no **Anexo A**.

Em Portugal, anualmente, produz-se 0,12 Mt de arroz (em que 72% equivale ao Carolino, 27% ao Agulha e o restante 1% ao tipo médio redondo) e consome-se 0,18 Mt (onde 44% refere-se ao Carolino, 45% ao Agulha e os demais 11% - por exemplo, Basmati, Aromático e Risoto), sendo o maior consumidor europeu. Importa-se cerca de 0,08 Mt, dos quais 90% são Agulha. Sabe-se, também, que o país é autossuficiente em Carolino, onde se verificou um aumento de 27% nas áreas semeadas, em contraste do Agulha que reduziu 25% (Almeida & Marques, 2013).

O cultivo agrícola nacional de arroz concentra-se nas seguintes regiões:

- Vale do Mondego (Baixo Mondego);
Coimbra – Figueira da Foz, Montemor-o-Velho;
- Vale do Tejo e Sorraia;
Lisboa – Vila Franca de Xira, Azambuja;
Santarém – Benavente, Coruche;
- Vale do Sado;
Setúbal – Alcácer do Sal, Santiago do Cacém (Almeida & Marques, 2013).

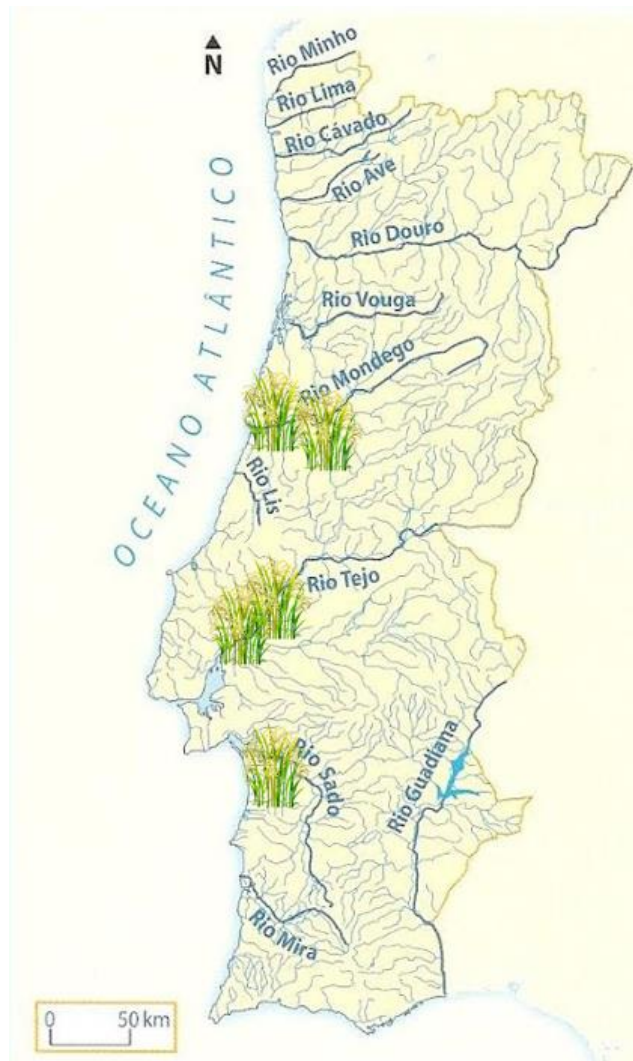


Figura 2 - Diferentes regiões de cultivo do arroz, em Portugal, adaptado da referência: (Soffiati, 2021).

Atualmente, em Portugal, produzem-se diversas variedades, algumas das quais, Ariete, Gládio, Sprint, Sírio, Ronaldo, Ulisse, Luna, Teti, Loto, etc (Almeida & Marques, 2013; Aparroz, 2017).

2.3. Arroz, uma planta herbácea

Da produção total de arroz, cerca de 85% destina-se ao consumo alimentar humano, não só na forma tradicional – *baga* -, como moído (em pó), torrado, expandido (*tufado*) ou fermentado. Sendo, também, usado na confeção de cereais de pequeno-almoço, snacks, sobremesas ou alimentos processados – pré-cozidos, enlatados ou secos -, (tais como pães, papel de arroz comestível, bolos, pudins,

massas (noodles), vinagres e alimentos fermentados - licores, saquê e cerveja -), farinha (amido de arroz), xaropes e fórmulas alimentares infantis.

Sabe-se que o arroz é constituído por minerais, vitaminas e fibras, contudo, quando submetido ao processo de branqueamento, estes são reduzidos, com exceção dos hidratos de carbono. Apresenta um teor diminuto em lípidos e em vitamina A, com ausência de glúten (Borges, 2014).

Considera-se este rico em hidratos de carbono, bem como, em vitamina B1, ferro e ácido fólico. Este alimento constitui a dieta básica em 34 países, cerca de metade dos habitantes do planeta, sendo que 17 encontram-se na Ásia e no Pacífico, 9 na América do Norte e do Sul e 8 em África (Almeida & Marques, 2013).

O arroz caracteriza-se em conformidade com o seu tamanho, existindo 3 tipos:

- Curto, tamanho: 5,2 mm (p. ex., o Arbório ou Gomoso);
- Médio, tamanho: 6,0 mm (p. ex., o Risoto ou Calrose);
- Longo, tamanho: superior a 6,0 mm (p.ex., o Carolino, Agulha, Basmati ou Jasmin) (Almeida & Marques, 2013).

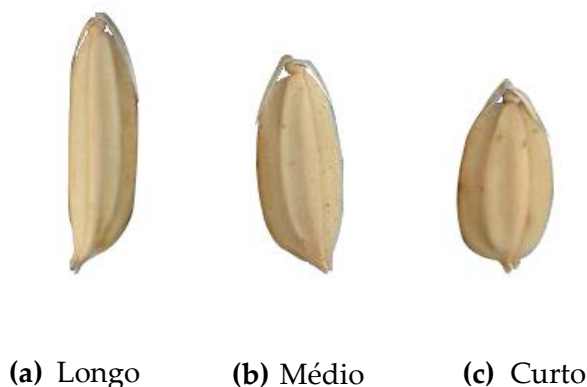


Figura 3 – Exemplos de tamanhos existentes de arroz, adaptado da referência: (Saichuk, 2005).

Na tabela seguinte, encontra-se a classificação taxonómica do arroz.

Tabela 2 - Classificação científica do arroz.

Domínio	Euraky
Reino	Plantae
Super divisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta ou Angiospermia
Classe	Liliopsida (monocotiledónea)
Ordem	Poales
Família	Poaceae (gramíneas)
Género	Oryza

Este género (*Oryza*) contém duas espécies de arroz produzido, a *Oryza sativa* L., sendo originária do continente asiático, onde se engloba as subespécies Índica, Japónica (consumidas mundialmente) e a Javânica oriunda da Indonésia, e a *Oryza glaberrima* Steud., criada no continente africano (Ocidental). Inclui, também, aproximadamente, 20 espécies selvagens (Borges, 2014).

A figura abaixo representa os principais constituintes da estrutura do grão de arroz.

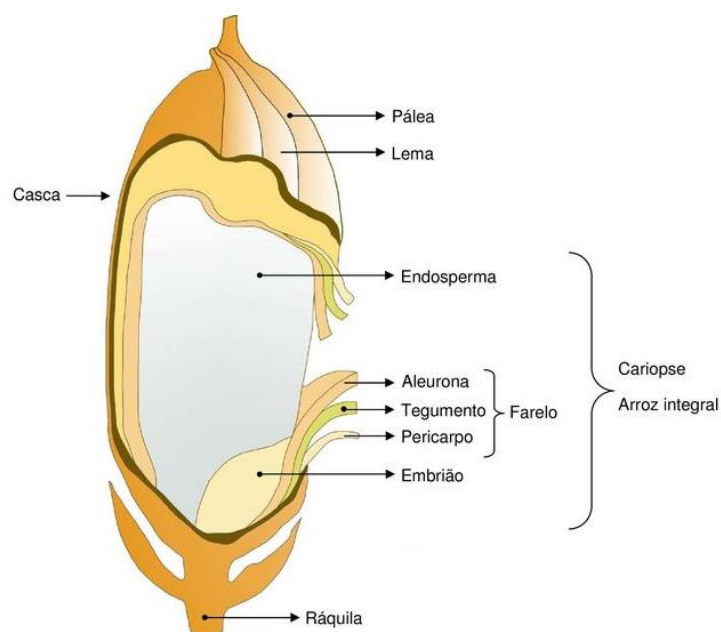


Figura 4 - Corte longitudinal de um grão de arroz (Marquez, 2010).

A casca do grão de arroz reveste a cariopse, também designada por grão integral. Este é composto por camadas externas do pericarpo, do tegumento e de

aleurona. Esta última envolve o embrião (germe) e o endosperma. De referir que o pericarpo se subdivide em epicarpo, mesocarpo e endocarpo, sendo que a tonalidade deste se altera consoante as variedades existentes (numa gama de branco ou amarelo-pálido até ao castanho avermelhado e preto-acastanhado). A camada de aleurona pode apresentar uma a cinco camadas de células (Borges, 2014; Juliano & Hicks, 1996; Sookwong & Mahatheeranont, 2017).

2.4. Farelo de arroz

Após o descasque, o arroz é submetido ao branqueamento, onde é obtido o Farelo Integral. Posteriormente, com o intuito de eliminar vestígios de farelo ainda presentes no arroz, recorre-se a um tratamento complementar, o polimento, do qual resulta o Farelo Branco.

O farelo de arroz (ou sêmea) é um subproduto do arroz, constituído pelas camadas externas, que representa 8% do grão de arroz com casca. Este é rico em proteínas, fibras, ácidos gordos, vitaminas, minerais (ferro, fósforo e magnésio) e com quantidades acrescidas de antioxidantes e fitoquímicos. Na sequência da produção de arroz branco, gera-se, anualmente, cerca de 60 Mt de farelo (Borges, 2014; Juliano & Hicks, 1996; Sookwong & Mahatheeranont, 2017).

Sabe-se que o farelo de arroz integral apresenta na sua constituição aproximadamente 18 a 22% de óleo, contendo lípidos insaponificáveis (p.ex., tocoferóis, tocotrienóis, fitoesteróis, γ -orizanol e carotenoides). Estes são benéficos, a nível fisiológico, uma vez que auxiliam, através da sua capacidade antioxidante, a precaver o dano oxidativo do DNA e dos diversos tecidos, e também possuem propriedades antiangiogénicas, anti-hipercolesterolémico e neuroprotetoras (Sookwong & Mahatheeranont, 2017).

Tabela 3 – Composição e propriedades referentes ao farelo de arroz (Juliano & Hicks, 1996).

Propriedades	Farelo de Arroz
Proteína bruta (%N × 5,95)	11,3-14,9
Gordura bruta (%)	15,0-19,7
Fibra bruta (%)	7,0-11,4
Cinza bruta (%)	6,6-9,9
Carboidrato disponível (%)	34,0-62,0
Fibra em detergente neutro (%)	24,0-29,0
Tiamina (vitamina B1) (mg/100 g)	1,2-2,4
Riboflavina (vitamina B2) (mg/100 g)	0,18-0,43
Niacina (ácido nicotínico) (mg/100 g)	26,7-49,9
α-tocoferol (vitamina E) (mg/100 g)	2,6-13,3
Cálcio (mg/100 g)	30,0-120,0
Fósforo (g/100 g)	1,1-2,5
Fósforo Fitina (g/100 g)	0,9-2,2
Ferro (mg/100 g)	8,6-43,0
Zinco (mg/100 g)	4,3-25,8
Conteúdo energético (kJ/g)	16,7-19,9
Conteúdo energético (kcal/g)	3,99-4,76
Densidade (g/mL)	1,16-1,29
Densidade Aparente (g/mL)	0,20-0,40

Existe uma dificuldade acrescida de consumir estes componentes numa alimentação diária, dado que o farelo de arroz é retirado, na sua totalidade, no processo de produção de arroz branco.

Verifica-se que, num ano, cerca de 90% do farelo é aproveitado para fabrico de ração animal (gado e aves), e o restante empregue em substratos na produção de cogumelos, em enzimas, em óleos, em farinhas, em fibras (dietéticas) e em alimentos concentrados, prejudicando assim, o seu valor económico nas diversas áreas, como a nutracêutica, a farmacêutica e a cosmética. Contudo, recentemente, tem-se observado um interesse crescente no farelo de arroz, por parte da indústria alimentar, de forma a enriquecer nutricionalmente

os alimentos processados (pão, noodles, massa, gelado e bolos) (Borges, 2014; Sookwong & Mahatheeranont, 2017).

2.5. Óleo de Farelo de arroz

O óleo de farelo de arroz (RBO) extraído do farelo de arroz é considerado um líquido hidrofóbico. Este é composto por 96% de lípidos saponificáveis, nomeadamente por triacilgliceróis (onde 47% são gorduras monoinsaturadas, 33% são gorduras polinsaturadas e os restantes 20% são gorduras saturadas), glicolípidos e fosfolípidos, e em 4% de compostos insaponificáveis, em concreto, por tocoferóis, tocotrienóis, esteróis, γ -orizanol e carotenoides (que contém propriedades antioxidantes e quimiopreventivas, apresentando, assim, vantagens nutricionais). De referir que os tocoferóis presentes no óleo também ajudam na proteção dos lípidos face às oxidações, permitindo um maior período de tempo de armazenamento do mesmo (Sookwong & Mahatheeranont, 2017).

Neste óleo encontra-se, em grandes quantidades, o composto γ -orizanol (formado com esteres de ácido ferúlico, fitosteróis e álcoois triterpênicos). Este tem demonstrado benefícios a nível da saúde humana, reduzindo o colesterol total e incrementando o colesterol HDL, precavendo assim, doenças cardiovasculares. De notar que este benefício provém não somente da matéria insaponável existente (além do composto mencionado, os tocotrienóis e esteres) como também dos ácidos gordos oriundos do óleo (Borges, 2014).

O óleo de farelo de arroz é a origem não sintética mais rica em orizanois naturais, que juntamente com os fitoquímicos presentes, promovem um bem-estar devido às suas propriedades antidiabéticas, antiaterogênicas e hipolipemiantes. Sendo que, também, auxiliam no crescimento capilar e na circulação sanguínea. (Liu et al., 2015; Sookwong & Mahatheeranont, 2017)

Atualmente, é utilizado como um óleo comestível, onde a sua aplicabilidade difere entre óleo de cozinha, suplementos (para fácil obtenção destes compostos bioativos) ou como ingrediente na cozinha oriental (Liu et al., 2015).

2.6. Técnicas clássicas de extração do óleo

A composição qualitativa e quantitativa de antioxidantes (compostos bioativos) existentes nas amostras é analisada em conformidade com o método de extração escolhido. A extração apresenta uma responsabilidade fundamental e significativa na obtenção dos resultados finais, sendo por isso, uma das etapas iniciais a efetuar-se na investigação de plantas. A eficiência desta depende de fatores como o solvente selecionado, as características da matriz da planta, a pressão, a temperatura e o tempo (Azmir et al., 2013; Coelho & Palavra, 2015). De realçar que, a preferência do solvente é influenciada de acordo com a polaridade do componente a extrair, a afinidade molecular presente entre o soluto e o solvente, a transferência de massa, a segurança ambiental, a toxicidade e o custo deste (Azmir et al., 2013; Dai & Mumper, 2010; Gurib-Fakim, 2006).

Conseguem-se extrair antioxidantes de diversas partes da planta (raiz, folha, fruto, caule, flores e frutas), juntamente com outros compostos. Correspondendo a um dos grupos do sistema metabólico de plantas, os compostos bioativos são denominados de metabolitos secundários. De referir, que o metabolito primário (o outro grupo) contempla as substâncias químicas (hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos e proteínas) direcionadas ao crescimento e ao desenvolvimento da planta (Azmir et al., 2013).

Os antioxidantes contidos nas plantas subdividem-se em três grandes classes, em conformidade com Croteau et al., 2000, a saber:

- 1 - Terpenos e terpenóides, +/- 25000 exemplares;
- 2 - Alcaloides, +/- 12000 exemplares;
- 3 - Compostos fenólicos, +/- 8000 exemplares (Azmir et al., 2013).

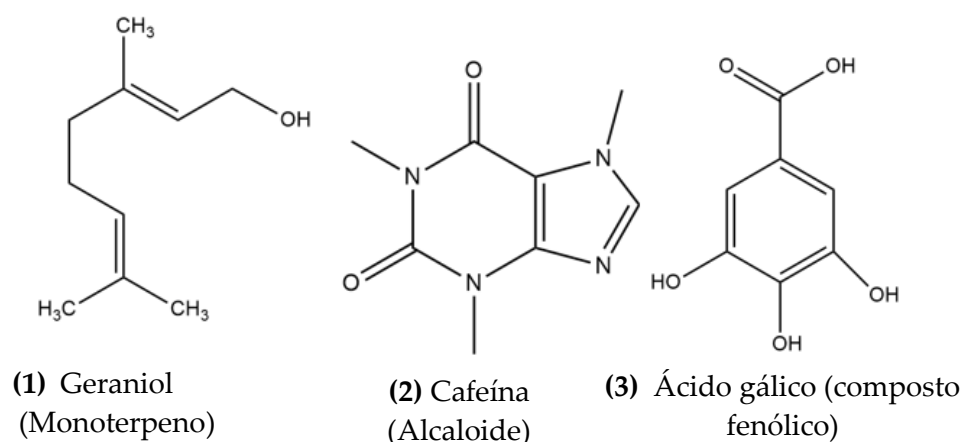


Figura 5 – Exemplos de antioxidantes contidos nas plantas, das três grandes classes.

Os extratos podem ser adquiridos através de métodos convencionais, p.ex. a extração em Soxhlet, ou de métodos não convencionais, como a extração supercrítica com CO₂. Os métodos convencionais (clássicos) alicerçam o poder de extração dos diversos solventes com o uso de calor, agitação, ultrassons e micro-ondas (Azmir et al., 2013; Ibañez et al., 2012). Por sua vez, os métodos não convencionais (mais recentes), comparativamente com os anteriores, apresentam como vantagens, o uso diminuto de solventes orgânicos, revelando-se menos adversos ao meio ambiente, apresentando uma redução substancial de tempo e alcance de resultados idênticos ao nível de rendimento e de qualidade do extrato (Azmir et al., 2013; Coelho & Palavra, 2015).

2.6.1. Extração em Soxhlet

Tem-se vindo a recorrer, amiúde, à extração em Soxhlet com o objetivo de extrair antioxidantes, derivados de fontes naturais, como de plantas e outras. Nos dias de hoje, esta é um auxílio como técnica de referência na comparação com outras técnicas de extração alternativas.

Usualmente, coloca-se no invólucro (cartucho), geralmente de celulose, uma amostra seca de quantidade diminuta. Sendo este, de seguida, posicionado no extrator Soxhlet. Começa-se por aquecer o solvente, de forma a que o mesmo atinga o seu ponto de ebulição. Este vaporiza e sobe até atingir o circuito de refrigeração, aonde condensa. Na câmara, o solvente acumula lentamente os compostos que extrai, sendo esta esvaziada pelo sifão através de um diferencial de pressão. A mistura retorna ao balão de fundo redondo, completando um ciclo de extração. Este ciclo repete-se até se finalizar este método (Azmir et al., 2013).

A polaridade do solvente escolhido tem um papel preponderante na eficiência desta extração, dos quais se destacam a água, o hexano, o etanol, o metanol, o clorofórmio, o diclorometano, o éter e a acetona, como os mais empregues (Cowan, 1999).

A extração em Soxhlet é um processo contínuo, revelando-se uma vantagem importante, quando se descarrega no balão de fundo redondo a solução saturada em metabolitos solubilizados, o solvente recondensa-se, iniciando um novo ciclo de extração, e desta forma, extrai-se o material ininterruptamente. Contudo, a desvantagem desta consiste no permanente aquecimento do extrato, consequência da necessidade de se atingir o ponto de

ebulição do solvente, podendo deteriorar, assim, os compostos termolábeis e/ou resultar na degradação destes (Coelho & Palavra, 2015; Seidel, 2006).

2.6.2. Extração Supercrítica com CO₂

Nos últimos anos, a preservação do meio ambiente tem sido um enorme foco não só para a comunidade científica, mas também, para a sociedade em geral. Nesse sentido, a química verde impulsiona tecnologias químicas inovadoras, desempenhando um papel fundamental na aplicação de processos e produtos químicos que promovem uma menor pegada ecológica. Os métodos não convencionais, entre os quais, a extração com ultrassom, a extração acelerada por solventes, a extração supercrítica, a extração por micro-ondas, a digestão enzimática e o campo elétrico pulsado, baseiam-se nos princípios desta. As grandes vantagens destes residem na redução e/ou eliminação de produção ou uso de substâncias perigosas (solventes orgânicos), diminuição do tempo e obtenção de melhores resultados (de rendimento e de qualidade do extrato) (Azmir et al., 2013).

Destaca-se a extração supercrítica, considerada muito relevante, nos dias de hoje, sendo uma técnica alternativa aos métodos convencionais, uma vez que contorna os problemas oriundos dos mesmos, como a degradação térmica, a hidrosolubilização e a hidrólise registadas com a hidrodestilação (Palavra et al., 2011). Esta técnica suscita uma grande curiosidade para aplicação em contexto industrial (alimentar, farmacêutico e petroquímico), pois satisfaz os requisitos ambientais e do produto desejado (Azmir et al., 2013; Yener, 2015). Assim, recorre-se a esta com o intuito de se extrair óleos, vegetais ou essenciais, donde se obtém os antioxidantes (compostos bioativos), derivados de plantas (Palavra et al., 2011).

A extração supercrítica é uma técnica que, a partir de uma matriz sólida, pretende separar as substâncias solúveis, na presença de um solvente, cujos valores de temperatura e pressão se encontram acima do seu ponto crítico. Este, numa substância pura, é atingido quando se registam valores de temperatura e pressão, onde o equilíbrio líquido-vapor desaparece, apresentando uma única fase, tal como se demonstra nas Figuras 6 e 7. Acima deste ponto crítico, situa-se a região supercrítica, na qual não se observa diferenças entre os estados líquido e gasoso na substância, apresentado um fluido homogéneo, nomeado por fluido

supercrítico (FSC) (Azmir et al., 2013; Coelho & Palavra, 2015; Fontana et al., 2013; Riera et al., 2004; Yener, 2015).

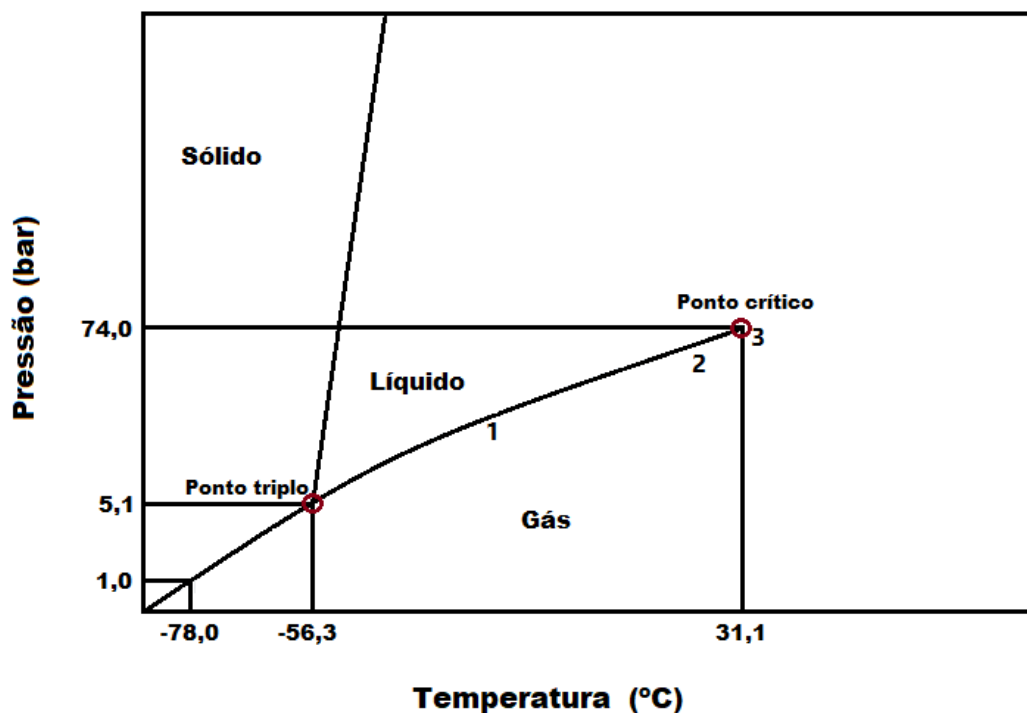


Figura 6 - Diagrama de fases da substância pura CO_2 para se identificar o seu ponto crítico, adaptado da referência: (Voormeij & Simandl, 2002).

Os números 1, 2 e 3 da Figura 6 são ilustrados na figura seguinte.



(1) Equilíbrio líquido-gás

(2) Mistura das fases na aproximação da zona crítica

(3) Interfase líquido-gás desaparece

Figura 7 – Percurso visual do equilíbrio líquido-gás até se atingir o ponto crítico da substância pura – CO_2 , adaptado da referência: (Miller & Phillips, 2020).

Os fluidos supercríticos possuem propriedades termofísicas, que oscilam entre as de um gás e as de um líquido. Quando estes são submetidos a variações mínimas de temperatura e pressão, as suas propriedades modificam-se. Em

concreto, estes exibem uma elevada compressibilidade e difusidade, uma reduzida viscosidade, equivalente à dos gases, e, por sua vez, uma reduzida tensão superficial, um poder elevado de solvatação, tal como se verifica nos solventes orgânicos, e uma densidade como a dos líquidos (Azmir et al., 2013; Palavra et al., 2011). Consequentemente, estes fluidos evidenciam uma capacidade de dissolução idêntica à dos solventes orgânicos (líquidos) e propriedades de transporte semelhantes à dos gases, tornando-os solventes seletivos e eficientes. Assim, estas propriedades permitem que os fluidos supercríticos beneficiem as extrações com rendimentos elevados e tempos de retenção reduzidos (Azmir et al., 2013; Coelho et al., 2012; Yener, 2015).

Inerente à aplicação da generalidade dos FSC, estão associadas vantagens como, custo reduzido (em contraponto aos solventes utilizados industrialmente), elevado grau de pureza, atóxico, ignífugo, de fácil recuperação e elevada seletividade na extração (Fontana et al., 2013). Desta forma, a técnica de extração supercrítica apresenta-se como uma alternativa viável na aquisição de compostos naturais das matrizes de plantas (Coelho & Palavra, 2015; Grosso et al., 2009).

Substâncias compostas como etano, propano, butano, pentano, amoníaco, óxido nitroso, trifluorometano, água e dióxido de carbono são alguns exemplos usados como fluidos supercríticos. Destes, evidencia-se o CO₂, em virtude das vantagens que apresenta, sendo amplamente usado na extração supercrítica (Azmir et al., 2013; Yener, 2015).

As vantagens do CO₂ supercrítico consistem nas características, a seguir apresentadas:

- Pressão crítica baixa ($P_c = 7,3$ MPa);
- Temperatura crítica próxima da t.a. ($T_c = 31^\circ\text{C}$) – proporciona uma extração de compostos termolábeis com um risco de degradação reduzido, conservando as propriedades dos mesmos;
- Ignífugo;
- Não explosivo;
- Atóxico;
- Solvente quimicamente inerte – não reage com extratos ou produtos;
- Seletividade de produtos específicos na extração;
- Facilidade em se separar dos extratos - fácil por descompressão;
- Extratos sem resíduos de solventes orgânicos;
- Custo reduzido;
- Abundante;

- Reciclável – permite mais do que uma utilização;
- Pureza alta;
- Transferência de massa acelerada na fase supercrítica – devido à sua capacidade de intrusão dos poros da matriz (Ajila et al., 2011; Azmir et al., 2013; Coelho & Palavra, 2015; Fontana et al., 2013; Mendes et al., 2003; Yener, 2015).

No entanto, identificam-se as seguintes desvantagens no CO₂ supercrítico:

- Custos de investimento da instalação superiores;
- Propriedades sensoriais ligeiramente distintas face às conseguidas através de métodos convencionais – exigindo, assim, modificações das normas internacionais;
- Adversidade em extrair nas matrizes sólidas que possuem uma alta percentagem de água.

O CO₂ supercrítico é um solvente não polar, extraíndo, preferencialmente, substâncias compostas lipofílicas e apolares. Porém, o seu comportamento é contrário perante compostos polares. Consegue-se contrariar esta peculiaridade acrescentando ao mesmo, pequenas porções de co-solventes (1-10%). Estes incrementam a polaridade do CO₂ supercrítico através do seu poder de solvatação, promovendo a extração de substâncias compostas com polaridades diferentes. Assim, os co-solventes, obrigatoriamente polares, como o metanol, o etanol, o acetato de etilo e a acetona, são os mais genericamente aplicados (Ajila et al., 2011; Azmir et al., 2013; Cowan, 1999; Mechergui et al., 2014; Yener, 2015).

Além do referido, os co-solventes demonstram ainda ser vantajosos, na medida em que, aumentam a eficiência da extração e a produtividade, bem como, modificam a seletividade da extração supercrítica (Dalmolin et al., 2010). Estes contribuem para a alteração das propriedades existentes na mistura de solventes, favorecendo o aumento da solubilidade e densidade desta, resultando no incremento das interações físicas, da mesma forma que, aumentam o ponto crítico da mistura, proporcionando uma diferença superior entre a densidade aparente e a local – à volta da molécula de soluto (Berna et al., 2001; Kopcak & Mohamed, 2005).

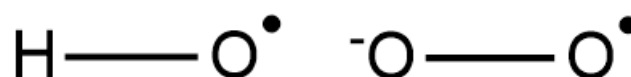
A eficiência da extração também depende de parâmetros como a temperatura, a pressão, o caudal de solvente, a quantidade de amostra, a duração de extração e o tamanho de partícula (Azmir et al., 2013; Coelho et al., 2012; Yener, 2015).

2.7. Técnicas de quantificação e caracterização dos extratos

Fontes vegetais, como plantas e frutas, abundantes em antioxidantes naturais, suscitam um vasto interesse científico e da população consumidora. Estas possuem compostos fitoquímicos, a título de exemplo, as substâncias compostas fenólicas e flavonoides, que apresentam propriedades redox e quelantes de metais. Também se identificam outras características biológicas, nomeadamente, ações antialérgicas, antivirais, anti-inflamatórias, anti úlceras e vasodilatadoras (Karimi & Jaafar, 2011).

A atividade antioxidante de um composto define a capacidade do mesmo em diminuir e/ou eliminar radicais livres, de forma a atrasar, inibir ou precaver a oxidação do organismo humano, promovendo a redução do stress oxidativo (Li et al., 2012). O desequilíbrio resultante deste, que acontece na presença abundante de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio, oxida e deteriora lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (DNA), provocando modificações e inativações, inibindo a sua função (Karimi & Jaafar, 2011; Li et al., 2012).

Desta forma, os antioxidantes desempenham um papel extremamente importante nos seres humanos, protegendo as suas células destes danos, que podem originar doenças degenerativas (Alzheimer e Parkinson), cardiovasculares, oncológicas e envelhecimento precoce (Karimi & Jaafar, 2011; Li et al., 2012; Setiawan et al., 2001; Thaipong et al., 2006).



(a) Radical hidroxilo

(b) Radical superóxido

Figura 8 – Exemplos referentes a espécies reativas de oxigénio.

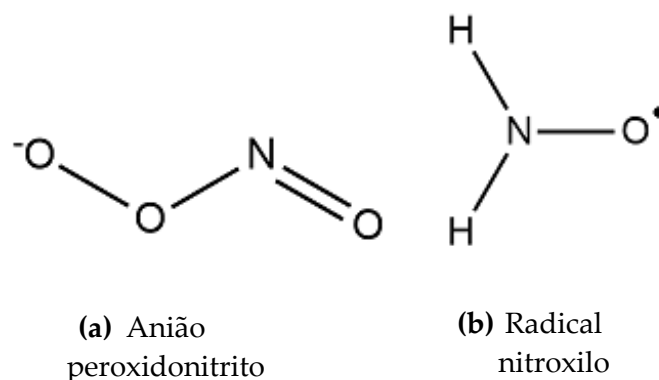


Figura 9 – Exemplos referentes a espécies reativas de nitrogénio.

Os antioxidantes dividem-se em duas categoriais, os naturais e os sintéticos. Sendo que, os tocoferóis são os antioxidantes naturais (ou biológicos) com maior relevância, enquanto os polifenóis, especificamente o BHT (butil-hidroxi-tolueno), o BHA (butil-hidroxi-anisol), o PG (propil galato) e o TBHQ (terc-butil-hidroquinona) são os sintéticos (ou primários) mais utilizados (Li et al., 2012). No entanto, por questões ambientais e de saúde pública (toxicidade e efeitos cancerígenos), através de normas legislativas limitou-se o uso de antioxidantes sintéticos (BHA e BHT), promovendo o interesse em antioxidantes naturais (Li et al., 2012).

Evidencia-se o método espectrofotométrico baseado na utilização do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) para a análise da capacidade antioxidante referente a um extrato ou óleo. Este método distingue-se pelos seus procedimentos sensíveis, rápidos, simples e amplamente reprodutíveis (Apak et al., 2013; Li et al., 2012).

2.7.1. Método do Radical Livre DPPH

O método do radical orgânico DPPH fundamenta-se na capacidade de doação de eletrões ou hidrogénios de um extrato ou óleo com potencial antioxidante, na presença do radical livre estável DPPH• (Apak et al., 2013; Molyneux, 2004). Assim, o efeito provocado pelos antioxidantes na solução, desencadeia a neutralização do DPPH• para DPPH-H, provocando uma mudança da cor violeta (da solução inicial) para amarela. Este fenómeno, designado como colorimetria, ocorre devido a uma diminuição da absorvância ao longo do tempo, que quanto mais acentuada se torna, maior o poder antioxidante da amostra (Apak et al., 2013; Duda et al., 2015). Os ensaios

efetuaram-se num período de 40 minutos, procedendo-se, de seguida, à leitura da microplaca num comprimento de onda de 515 nm (Apak et al., 2013; Duda et al., 2015; Molyneux, 2004).

A determinação do IC₅₀ possibilita caracterizar a atividade antioxidante, baseando-se no cálculo da concentração de antioxidantes requerida para a inibição de 50% dos radicais livres de DPPH presentes na solução. Define-se a percentagem de inibição, de acordo com a seguinte equação (Apak et al., 2013):

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que, A_{controlo} corresponde à absorvância referente ao DPPH• no solvente e A_{amostra} é a absorvância do DPPH• na amostra.

Um valor reduzido de IC₅₀ traduz-se numa capacidade superior de antioxidante na amostra, uma vez que, implica uma menor quantidade desta para inibir em 50% a concentração inicial de radicais livres de DPPH• na solução (Apak et al., 2013; Thaipong et al., 2006).

Usualmente, estabelece-se uma comparação com antioxidantes de referência (trolox, ácido ascórbico e BHT – butil-hidroxitolueno, os mais comuns) para se obter uma compreensão superior dos resultados (Duda et al., 2015; Li et al., 2012; Thaipong et al., 2006).

De mencionar que este é um método amplamente reproduzível, de simples realização, executado com concentrações diminutas e que possibilita a análise de numerosas amostras conjuntamente, reduzindo, assim, a duração do ensaio. Além de que, o seu reagente é de fácil aquisição no mercado. Porém, este deve ser manuseado com o maior cuidado, evitando expô-lo à luz, o que provoca uma degradação do radical (Apak et al., 2013; Sarker et al., 2008). Também é uma desvantagem o volume que as moléculas de DPPH• possuem, pois dificultam o acesso ao radical (Apak et al., 2013; Fontana et al., 2013).

2.7.2. Determinação do teor de polifenóis totais

Os polifenóis, caracterizados como metabolitos secundários, estão disponíveis abundantemente nas plantas (nas suas diversas partes) (Ajila et al., 2011; Manach et al., 2004). Estes são substâncias naturais, responsáveis pelo

crescimento, reprodução, pigmentação e fragrância das plantas. Além disso, assegura a resistência face a agentes patogénicos e a parasitas, bem como a proteção das mesmas contra a radiação ultravioleta (UV) (Ajila et al., 2011).

Estes antioxidantes integram uma elevada variedade de substâncias compostas, desde estruturas simples a poliméricas (Manach et al., 2004). Os polifenóis exibem, na sua estrutura, um ou mais anéis aromáticos ligados a grupos hidroxilo (Ajila et al., 2011).

Adicionalmente à atividade antioxidante, supra indicada, os polifenóis apresentam uma clara vantagem, possuindo propriedades medicinais, tais como, anti-inflamatórias, antialérgicas e antimicrobianas (Ajila et al., 2011).

A quantificação dos polifenóis totais denota uma dificuldade, devido à complexidade e à elevada variedade estrutural destes (Blainski et al., 2013). Recorre-se ao método de Folin-Ciocalteu, designado também de método de determinação de fenóis totais, para se determinar o teor dos mesmos nas amostras dos extratos e óleos vegetais oriundos de origem natural (Singleton et al., 1965). De referir que este é um método de fácil realização em escala laboratorial, dado o seu custo reduzido, rapidez e possibilidade de repetições (Blainski et al., 2013; Pelozo et al., 2008; Singleton et al., 1965).

Este método baseia-se numa reação de oxidação-redução, em meio alcalino, com os polifenóis existentes nas amostras e um reagente redox específico, em concreto o reagente Folin-Ciocalteu, de tonalidade amarela, sendo este uma combinação dos ácidos fosfomolibdúico com fosfomolibdénio (Blainski et al., 2013; Pelozo et al., 2008; Singleton et al., 1965). Este reagente sofre redução, e por sua vez, os polifenóis sofrem oxidação, dando origem a um complexo de fosfomolibdénio e fosfotúngstenio, com uma coloração azul, $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^4]$. Quanto mais acentuado for o azul, maior será a concentração de polifenóis na amostra (Singleton et al., 1965). Esta reação permite obter informações pormenorizadas e muito minuciosas relativamente aos diversos grupos de substâncias compostas aromáticas (fenólicas), uma vez que, estes alteram diferentemente a sua coloração, consoante a sua massa unitária e a cinética desta (Blainski et al., 2013).

Ainda assim, para que a reação seja completa, é fundamental que o reagente a consumir, esteja em excesso, dado que este se decompõe demasiadamente depressa em meios alcalinos (Blainski et al., 2013; Pelozo et al., 2008). Existe a possibilidade deste excesso formar precipitados, adulterando os resultados obtidos através do método de espectrofotometria. Soluciona-se esta

adversidade, introduzindo sais de lítio no método de Folin-Ciocalteu, impossibilitando, assim, o desenvolvimento dos mesmos (Blainski et al., 2013; Pelozo et al., 2008).

Mediante o método espectrofotométrico UV/Vis, na região visível (comprimentos de onda entre os 400 e 800 nm), é possível efetuar-se a leitura da absorvância de polifenóis a 765 nm, determinados através do leitor de microplaca, em conformidade com a sua coloração (Blainski et al., 2013; Pelozo et al., 2008; Singleton et al., 1965). Recorre-se à curva de calibração de uma solução do ácido gálico, composto utilizado como referência, para determinar a quantidade destes, sendo que os resultados dos óleos analisados se encontram expressos em equivalente de ácido gálico por grama de extrato ($\mu\text{mol EAG/g ext}$) (Blainski et al., 2013; Pelozo et al., 2008; Singleton et al., 1965).

2.7.3. Determinação do teor de flavonoides

Na classe de polifenóis enquadra-se um grupo de metabolitos secundários, os flavonoides, nos quais se integram as antocianinas, as calconas, os flavanóis, as flavanonas, os flavonóis, as flavonas e as isoflavonas (Schijlen et al., 2004; Valls et al., 2009). Estes possuem um papel ativo na coloração das flores, frutas e folhas. Nos dias de hoje, já estão detetados aproximadamente 4 000 variedades dos mesmos (Figuerola et al., 2014).

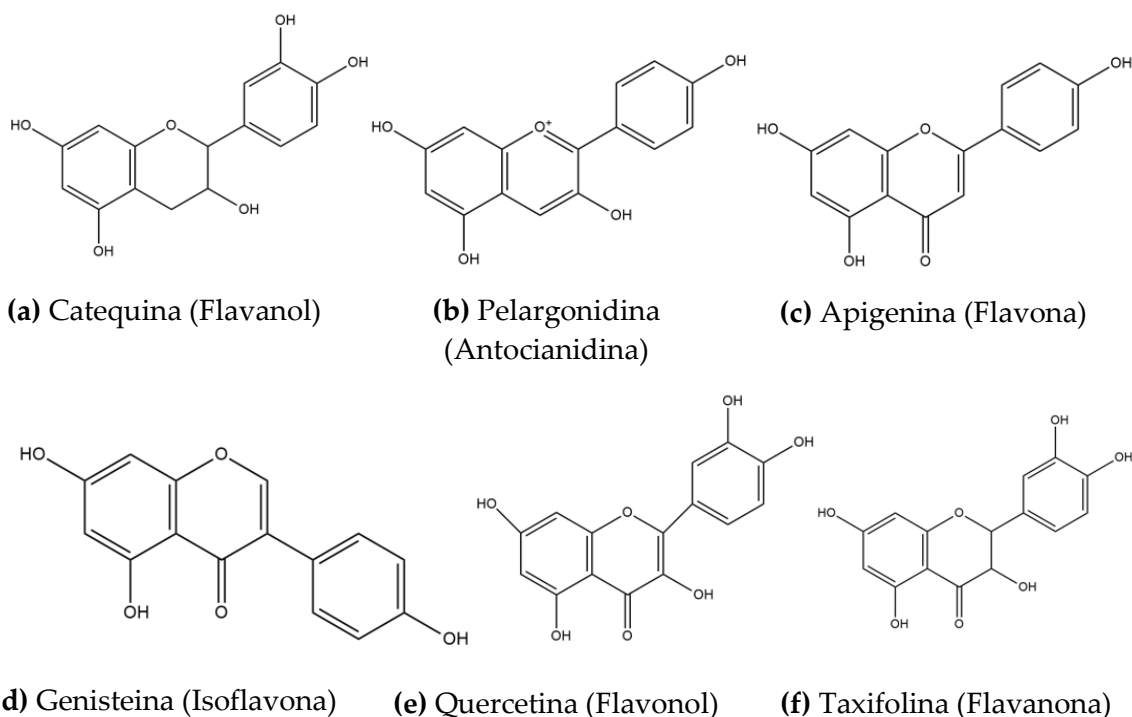


Figura 10 – Exemplos das estruturas das principais classes de flavonoides.

Os flavonoides são substâncias compostas, com peso molecular reduzido, constituídos por quinze átomos de carbono. Estruturalmente, apresentam uma configuração C6-C3-C6, formada com dois anéis aromáticos (fenólicos, α e γ), interligados por um anel heterocíclico pirânico (β), conforme exibido na seguinte figura (Ajila et al., 2011; Valls et al., 2009). As alterações, a nível estrutural, deste anel, promovem as diversas famílias de flavonoides, anteriormente descritas (Valls et al., 2009).

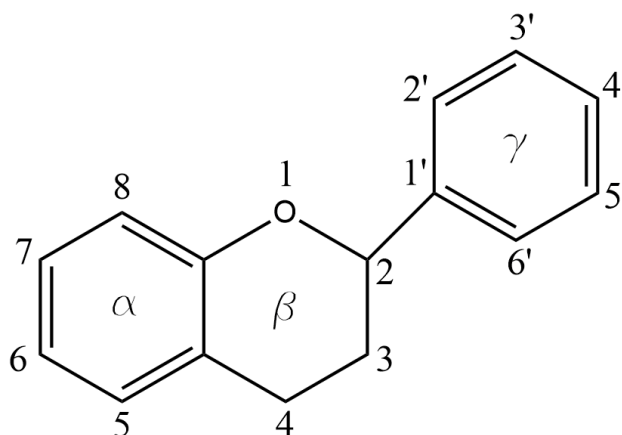


Figura 11 – Estrutura geral dos flavonoides, adaptado da referência: (Martins & Paganini-costa, 2011).

As vantagens dos flavonoides devem-se às suas propriedades promissoras, nomeadamente, antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, anti-hipertensivas, apoptóticas e hepatoprotetores, com aplicabilidade na área da saúde (p.ex., a farmacológica) (Figuroa et al., 2014; Hernández-Abreu et al., 2013). Porém, doses excessivas revelam-se prejudiciais, uma vez que, estes podem ter comportamentos de agentes mutagénicos e pró-oxidantes perante metais de transição ou peroxidases (Schijlen et al., 2004).

Calcula-se o teor de flavonoides presentes na amostra pelo método de cloreto de alumínio, originando um complexo estável entre o cloreto de alumínio, o grupo ceto e os grupos hidroxilo dos antioxidantes contidos na mesma (Hassan et al., 2013). Efetua-se a leitura da absorvância a 415 nm, usando o leitor de microplaca.

Recorre-se à curva de calibração de uma solução de catequina, composto utilizado como referência, para determinar a quantidade destes. Os resultados dos óleos analisados encontram-se expressos em equivalente de catequina por grama de extrato ($\mu\text{mol EC/g ext}$) (Rajasekaran & Kalaimagal, 2011).

2.8. Desenho Experimental (Design Expert 11)

O Planeamento Estatístico de Experiências (DOE, do inglês *Design of Experiments*) tem como objetivo obter um modelo matemático adequado para descrever um fenómeno, utilizando o menor número possível de experiências. Ao contrário do método convencional, que altera um fator mantendo os restantes constantes para determinar o seu efeito (Subra & Jestin, 2000), este é uma ferramenta que prevê os efeitos da influência de várias condições de processo, num sistema específico, identificando os fatores principais (Subra & Jestin, 2000; Tenorio et al., 2007) e as respostas do mesmo. Devido às diversas alterações de parâmetros combinados, o DOE diminui significativamente os ensaios necessários, representando, assim, uma vantagem relevante face à necessidade de vastos ensaios do método convencional (Montgomery, 2013; Subra & Jestin, 2000).

O planeamento de uma experiência e sua análise necessitam de se reger pelas seguintes etapas (Montgomery, 2013):

- Obter a maior precisão nos resultados;
- Reduzir os erros aleatórios;

- Prevenir enviesamentos ou erros sistemáticos;
- Aferir a dimensão dos erros aleatórios;
- Com recurso ao ajuste de fatores, utilizar a estrutura especial dos dados.

Para tal, devem ser consideradas os passos que se seguem (Montgomery, 2013):

1. Reconhecimento e declaração do problema - Uma identificação clara do problema e dos objetivos globais da experiência contribuem para uma melhor compreensão do fenómeno em estudo.

2. Seleção da variável de resposta - Ao selecionar a variável de resposta, deve-se ter a certeza de que esta variável realmente fornece informações úteis sobre o processo em estudo.

3. Escolha de fatores, níveis e alcance - Os fatores que podem influenciar o desempenho de um processo ou sistema, uma vez que estes tenham sido selecionados, devem ser escolhidas as gamas sobre as quais serão variados. O conhecimento do processo é necessário para o fazer.

4. Escolha do Planeamento Estatístico de Experiências - A escolha do design deve ponderar o tamanho da amostra, a execução ordenada para os ensaios experimentais e a determinação das restrições envolvidas.

5. Executar a experiência - Ao realizar a experiência, é de elevada importância monitorizá-la, de forma a identificar eventuais erros no procedimento experimental que retirem a validade da experiência executada.

6. Análise estatística dos resultados - Os métodos estatísticos devem analisar os resultados de uma forma objetiva, frequentemente, recorrendo a gráficos e a modelos empíricos.

7. Conclusões e recomendações - Uma vez analisados os dados, devem-se obter conclusões práticas sobre os resultados. Um bom planeamento pré-experimental geralmente levará a uma boa e bem-sucedida experiência.

Para o DOE, a abordagem estatística é essencial para obter conclusões relevantes dos dados. Os três princípios básicos deste são:

- Aleatorização;
- Replicação;
- Utilização de blocos.

A Aleatorização define aleatoriamente a determinação do material experimental e a ordem pela qual devem ser realizados os ensaios individuais da experiência. Esta permite assumir como válida que as observações ou erros sejam

considerados como variáveis aleatórias distribuídas independentemente, para a utilização dos métodos estatísticos. A aleatoriedade, criada pelo software usado, recorre a um gerador de números aleatórios, permitindo a redução dos erros sistemáticos e precavê a independência das observações e dos erros.

A Replicação possibilita uma repetição independente de cada combinação de fatores, refletindo fontes de variabilidade entre ensaios e, potencialmente, dentro dos mesmos, conseguindo-se assim dados relevantes como:

- Uma estimativa do erro experimental. Permitindo confirmar, se estatisticamente, as diferenças observadas nos dados são diferentes;
- Maior precisão na estimativa da média amostral, quando utilizada para estimar a resposta média para um dos níveis de fator.

Os Blocos são uma técnica de design aplicada com o intuito de melhorar a precisão das comparações entre os fatores de interesse. Estes são usados, com frequência, para reduzir ou eliminar a variabilidade transmitida de fatores incômodos, ou seja, fatores que podem induzir a resposta experimentada, porém não interessam diretamente (Montgomery, 2013).

O Planeamento Estatístico de Experiências e a subsequente análise estatística dos resultados estão profundamente relacionados, permitindo, de forma acessível e fácil, a análise e interpretação dos mesmos. A Análise de Variância (ANOVA) é a técnica estatística associada a este tipo de análise.

2.9. Tratamento de resultados e análises estatísticas

Recorre-se à análise de variância, ANOVA, (Miller & Miller, 2005), e às suas equações correlacionadas, para se determinar as curvas de calibração com trolox, bem como, as respetivas regressões lineares dos vários métodos, onde se testam solventes para solubilizar os óleos.

Para a validação desse método, procede-se ao cálculo dos limites de deteção e de quantificação, LOD e LOQ, respetivamente (Saadati et al., 2013). Estes limites são influenciados pelos seguintes fatores, a saber:

- A concentração referente à amostra de óleo;
- O efeito de matriz, farelo de arroz;
- A pureza dos reagentes empregues;
- A sensibilidade associada ao instrumento (Saadati et al., 2013).

Definem-se os limites, supracitados, em conformidade com um método fundamentado através de considerações estatísticas, sendo assim considerado, mais subjetivo, e alicerça-se em parâmetros relativos à curva de calibração (Shrivastava & Gupta, 2011; Veiga, 2016).

Calculam-se os limites de detecção e de quantificação recorrendo às seguintes equações:

$$LOD = \frac{3Sa}{b} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10Sa}{b} \quad (3)$$

Em que Sa simboliza o desvio padrão da ordenada na origem (a) e b o declive da reta.

2.10. Modelação Matemática da transferência de massa em Extração Supercrítica com CO₂

A modelação matemática da extração supercrítica é uma ferramenta de grande importância, que possibilita uma melhor compreensão dos diferentes componentes do processo. Os métodos empregues, modelos cinéticos teóricos, simulam o comportamento do sistema, permitindo avaliar os efeitos produzidos por alterações no mesmo e analisar, posteriormente, a viabilidade económica dos processos de extração para a aplicação em escala (Huang, 2015).

A literatura disponível dos diversos modelos para otimização dos processos de extração supercrítica dos óleos, proporciona uma melhor compreensão das curvas da mesma em função do tempo. Desta forma, deve ser feita uma avaliação cuidadosa e aprofundada das particularidades da matéria-prima, nomeadamente, o pré-tratamento desta (p.ex. secagem ou moagem), a humidade presente, a concentração inicial do soluto na matriz e a composição do mesmo; os dados do processo aplicados à extração do óleo, como a pressão, temperatura e caudal do fluido supercrítico; e os parâmetros de equilíbrio da fase fluida (Grosso et al., 2010).

Dividem-se em quatro grupos, os modelos matemáticos existentes que caracterizam a extração de óleos (soluto), a partir de matrizes sólidas por via de fluidos supercríticos, a saber:

- os sustentados em analogias de transferência de calor;
- os sustentados em balanços de massa diferenciais;
- os empíricos;
- os de núcleo encolhido.

Entre os modelos estudados, Tan e Liou 1989, Sovová 1994 e Sovová 2005, os modelos mais amplamente referenciados na literatura são os modelos sustentados em balanços de massa diferenciais para aplicação de fluidos supercríticos, apresentados por Sovová.

Estes modelos consideram as propriedades da matriz da matéria-prima, particularmente o tamanho das partículas e a porosidade do leito e os diversos mecanismos dos processos de extração, como as relações de equilíbrio e os mecanismos de transferência de massa (Coelho et al., 2012; Grosso et al., 2010).

A estimativa teórica de valores e modelação é ponderada pelos desvios médios absolutos entre os rendimentos experimentais e os calculados, em concordância com a equação abaixo:

$$ADD(\%) = \frac{1}{NP} \sum_{i=1}^{NP} \text{abs}\left(\frac{e_{exp} - e_{calc}}{e_{exp}}\right)_i \times 100 \quad (4)$$

Consideram-se os seguintes pressupostos para os modelos usados:

- Para a concentração inicial de soluto e o tamanho de partícula, o leito sólido considera-se homogêneo. O decréscimo de pressão e a variação da temperatura dentro da célula de extração assumem-se nulos;
- Na fase fluida, os gradientes de concentração são superiores quando comparados ao tamanho da partícula, desenvolvendo-se numa escala maior;
- Ainda que o leito sólido seja constituído por partículas e por um soluto que possui componentes variados, assume-se que este é um componente único, dado que, para as amostras de extrato recolhidas de forma sucessiva, foram alcançadas composições idênticas, em estudos

anteriormente feitos, evidenciando que as alterações na composição não eram relevantes;

- À entrada da célula de extração, o solvente encontra-se livre de soluto, percorrendo axialmente pelo leito da planta (farelo de arroz) (Grosso et al., 2010);
- Em toda a célula de extração, a variação de caudal de solvente é uniforme, assim, a porosidade não é afetada no período de extração.

A equação do sistema fluxo pistão é dada pela seguinte expressão do balanço de massa diferencial:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{u}{\varepsilon} \frac{\partial C}{\partial h} + \frac{(1 - \varepsilon) \rho_s}{\varepsilon} \frac{\partial q}{\rho_f \partial t} = 0 \quad (5)$$

O rendimento da extração obtém-se por:

$$e = \frac{Q}{t} \int_0^t C(h = H) dt \quad (6)$$

Em conformidade com as subsequentes condições iniciais, supõe-se que a concentração é homogénea nas duas fases:

$$q(h, t = 0) = q_0, \quad C(h, t = 0) = C_0 \quad (7)$$

Sendo a condição de fronteira, a seguinte:

$$C(h = 0, t) = 0 \quad (8)$$

2.10.1. Modelo I – Modelo de Sovová 1994

Em 1994, Sovová elaborou a extensão do modelo fluxo pistão adequado a extrações supercríticas de óleos, a partir de sementes moídas (Sovova, 1994). Na

qual se considera uma relação de equilíbrio linear entre as fases sólida e fluida, assumindo uma interação entre a matriz e o soluto.

$$q^* = KC \quad (9)$$

Este modelo prevê que uma fração do soluto seja de fácil remoção durante a extração, uma vez que se encontra nas células fragmentadas, encontrando-se o restante soluto, mais inacessível, nas células intactas. A equação seguinte, mediante transferência de massa externa, caracteriza a extração do soluto acessível (Grosso, 2009).

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -\frac{k_f a \rho_f}{\rho_s} (C_0 - C), \quad \text{para } q \geq q_k \quad (10)$$

Admite-se que a solubilidade do óleo no fluido supercrítico se equivale à concentração da fase fluida de equilíbrio, C_0 . Assim, inicia-se a extração do óleo nas células intactas, através de transferência de massa interna, após o declínio da concentração da fase sólida ($q = q_k$) (Grosso, 2009).

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -k_s a q, \quad \text{para } q < q_k \quad (11)$$

De forma a se conseguir uma aproximação analítica das Equações 5, 6, 10 e 11 (Grosso, 2009), considera-se nula a concentração na superfície da partícula, e na Equação 5 despreza-se o termo de acumulação, $\frac{\partial C}{\partial t}$.

Efetua-se, assim, uma manipulação extra, pressupondo que o extrato em solvente supercrítico apresente baixa solubilidade.

$$e = \begin{cases} (q_k \tau / Z)[1 - \exp(-Z)], & \text{para } \tau < \tau_m \\ (q_k \tau / Z)[\tau - \tau_m \exp(Z_w - Z)], & \text{para } \tau_m \leq \tau < \tau_n \\ q_0 - \left(\frac{q_k}{kZ}\right) \ln \{1 + [\exp(r_0 k Z) - 1] \exp [k(\tau_m - \tau)] / r_0\}, & \text{para } \tau \geq \tau_n \end{cases} \quad (12)$$

O tempo adimensional é dado por:

$$\tau = \frac{k_f a \rho_f C_0}{\rho_s q_k} t \quad (13)$$

A equação infra traduz o coeficiente entre soluto inicial total e o soluto das células intactas.

$$r_0 = \frac{q_0}{q_k} \quad (14)$$

O termo adimensional, Z , é proporcional ao coeficiente externo de transferência de massa:

$$Z = \frac{k_f a M_p \rho_f}{Q \rho_s} \quad (15)$$

A curva de extração divide-se em três regiões. Sendo que na primeira região se procede à extração do soluto acessível, $\tau \geq \tau_m$, em que é definida através da resistência do filme de solvente.

$$t_m = r_0 - 1 \quad (16)$$

Na segunda região, o fluido supercrítico, CO_2 , propaga-se no interior das partículas do leito com o intuito de extrair o soluto mais profundo, após estas soltarem o soluto acessível. Em simultâneo, na região posterior, o soluto acessível é retirado (Grosso, 2009). Através das Equações 17 e 18 são definidas as medidas de fronteira das regiões com e sem soluto acessível.

$$Z_w = \frac{1}{kr_0} \ln \frac{r_0 \exp [k(\tau - \tau_m)] - 1}{r_0 - 1}, \quad \text{para } \tau_m \leq \tau < \tau_n \quad (17)$$

$$k = \frac{k_s \rho_s q_k}{k_f \rho_f C_0} \quad (18)$$

A terceira região inicia-se em tempo adimensional, na qual ocorre a extração do soluto dentro das partículas, limitada pela resistência de transferência de massa interna.

$$\tau_n = \tau_m + \frac{1}{k} \ln \frac{1 + \tau_m \exp(r_0 k Z)}{1 + \tau_m} \quad (19)$$

Assim sendo, o modelo de Sovová 1994 possui como parâmetros de transferência de massa ajustáveis: k_f , k_s e r_0 .

2.10.2. Modelo II – Modelo de Sovová 2005

Em 2005, Sovová alterou, de novo, a extensão do modelo fluxo pistão aplicada a extrações de óleo vegetal, para adaptar a mesma, a diferentes tipos de equilíbrio de fase e padrões de fluxo. Assim, para células fragmentadas e intactas, desenvolveu-se, em separado, equações de equilíbrio de massa para a fase sólida. Considerou-se, então, que a alteração de regime de transporte nas células intactas para as fragmentadas é definido através do coeficiente interno de transferência de massa e que o transporte de células fragmentadas para o solvente é determinado por meio do coeficiente externo de transferência de massa. Neste modelo, a fração inicial de soluto nas células fragmentadas passou a ser um parâmetro, r (Grosso et al., 2010).

$$r = 1 - \frac{q_k}{q_0} \quad (20)$$

Especificamente para o sistema de fluxo pistão e misturador ideal, conjugado com distintas relações de equilíbrio de fase, sugeriu-se as equações aproximadas para as curvas de extração, sendo estas compostas por duas partes, nomeadamente:

- O período inicial corresponde à predominância da extração de células fragmentadas, validado pela Equação 21.
- O período final é determinado através da difusão interna, descrito pela Equação 22.

Considera-se que a expressão usada admite o sistema de fluxo pistão, a relação de equilíbrio linear dada pela Equação 9 e uma resistência de transferência de massa externa nula (Grosso et al., 2010).

$$e = Q \frac{q_0}{K + \gamma/r}, \quad \text{para } 0 \leq Q \leq Q_c \quad (21)$$

$$e = q_0 [1 - C_1 \exp(-C_2 Q)], \quad \text{para } Q > Q_c \quad (22)$$

Para o qual, γ é o coeficiente entre a massa de solvente na matriz e no leito:

$$\gamma = \frac{\rho_f \varepsilon}{\rho_s (1 - \varepsilon)} \quad (23)$$

As constantes C_1, C_2, K e a coordenada, Q_c , no ponto de interseção entre a primeira e a segunda parte da curva de extração, permitem estimar os dois parâmetros de transferência de massa ajustáveis deste modelo, k_s e r .

$$r = 1 - C_1 \exp(-C_2 Q_c) \quad (24)$$

$$k_s a = \frac{(1 - r) C_2}{1 - (1 - r) K C_2} \frac{Q}{M_p} \quad (25)$$

2.10.3. Modelo III – Modelo de Tan e Liou 1989

Em 1989, Tan e Liou desenvolveram o modelo de dessorção com um único parâmetro, o coeficiente de dessorção (k_d). Independentemente da concentração existente na fase fluida, a transferência de massa é descrita através da equação cinética de primeira ordem (Grosso et al., 2010). O balanço de massa na fase fluida, desprezando o efeito de dispersão axial, pode ser expresso por (Tan & Liou, 1989):

$$\varepsilon \times \rho_{CO_2} \times \frac{\partial C}{\partial t} + u \times \rho_{CO_2} \times \frac{\partial C}{\partial z} + (1 - \varepsilon) \times \rho_{sólido} \times \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad (26)$$

Sendo as condições iniciais e de fronteira, as seguintes (Tan & Liou, 1989):

$$t = 0, \quad C = 0 \quad (27)$$

$$z = 0, \quad C = 0 \quad (28)$$

Por sua vez, o balanço de massa referente à fase sólida é expresso:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -k_d(q - q^*) \quad (29)$$

Sendo que a concentração inicial é expressa por (Tan & Liou, 1989):

$$t = 0, \quad q = q_0 \quad (30)$$

Onde o coeficiente de dessorção é determinado através de:

$$k_d = k_i \times a \quad (31)$$

Mediante a solução analítica das Equações 26 e 29, a concentração à saída pode ser calculada (Grosso et al., 2010):

$$C_{(t,z)} = \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \times \frac{\rho_{sólido}}{\rho_{CO2}} \times (q_0) \times \left[\exp\left(-k_i \times a \left(t - \frac{\varepsilon \times Z}{u}\right)\right) - \exp(-k_i \times a \times t) \right] \quad (32)$$

Para o qual, o rendimento Y, em %, é determinado pela equação seguinte:

$$Y = \frac{Q \times \int_0^t C \partial t}{m (planta)} \times 100 \quad (33)$$

Em que:

$$\int_0^t C \partial t = B \times \left(\frac{1}{-k_i \times a} \right) \times [\exp(-k_i \times a \times t) - 1] \quad (34)$$

$$B = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \times \frac{\rho_{sólido}}{\rho_{CO2}} \times (q_0) \times \left[\exp\left(\frac{k_i \times a \times \varepsilon \times Z}{u}\right) - 1 \right] \quad (35)$$

Capítulo 3

3. Materiais e técnicas experimentais

3.1. Preparação da amostra do farelo de arroz

O farelo de arroz, de variedade Luna (tonalidade branca), cedido pelo Agrupamento de Produtores de Arroz do Vale do Sado Lda. – Aparroz, com sede em Alcácer do Sal, no concelho de Setúbal (38°22'24.0"N 8°31'47.0"W), serviu como amostra de estudo para as diversas técnicas experimentais abaixo descritas.

3.1.1. Determinação do teor de humidade e densidade

Determinou-se a percentagem de humidade das amostras estudadas. Esta é de extrema relevância devido às possíveis interferências (da humidade) com o fluido supercrítico (o dióxido de carbono) para as extrações. Caso não estejam suficientemente desumidificadas, a água presente na amostra, solúvel no CO₂ supercrítico, será extraída e, conseqüentemente, diminui a solubilidade dos compostos pretendidos. Realizaram-se as leituras do teor de humidade numa balança térmica Kern MRS I20-3. O valor obtido foi conseguido através da diferença de pesagens entre as massas, inicial e residual, mediante uma temperatura e um tempo atribuídos.

Para a determinação da humidade do farelo de arroz colocou-se, aproximadamente, 1 grama na balança térmica, a uma temperatura de 106°C (379,15K) durante 8 minutos. Procedendo-se ao registo de valores apresentados na Tabela 4.

No processo de diminuição da humidade das amostras, colocaram-se 150 g de farelo de arroz na estufa (LSIS-B2V / VC111 1900 W), por um período de 96 horas (4 dias) a 65°C (338,15K) (temperatura reduzida para minimizar a perda ou a deterioração dos compostos) com o objetivo de se retirar a maior quantidade de humidade possível para utilizações futuras. Ao fim deste período determinou-se, de novo, a humidade final das amostras para os ensaios.

Após este processo de desumidificação, o farelo de arroz foi armazenado a -20°C (253,15K) com o intuito de se preservar, ao máximo, as propriedades do mesmo para ser utilizado à posteriori.



(a) Balança térmica Kern MRS I20-3

(b) Interior da Balança térmica Kern MRS I20-3 durante o ensaio

Figura 12 - Balança térmica Kern MRS I20-3 utilizada para calcular a humidade do farelo de arroz.

Na seguinte tabela apresentam-se os valores do teor de humidade e as massas, iniciais e finais, das amostras, e as respetivas médias e desvios padrões dos ensaios efetuados, antes e depois da estufa.

Tabela 4 - Percentagem de humidade do farelo de arroz.

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Humidade (%)	Média	Desvio padrão
1*	1,055	0,920	12,74	12,64	0,10
2*	1,040	0,908	12,54		
3	1,067	1,009	5,61	5,23	0,42
4	1,061	1,003	5,44		
5	1,045	0,997	4,65		

*amostra não submetida à secagem na estufa.

Analisando a Tabela 4, constatou-se que a percentagem de humidade diminuiu mais de 60%, passando de 12,64% para valores de 5,23%, após a amostra ter sido submetida à secagem em estufa.

Determinou-se a densidade aparente do farelo de arroz, com o auxílio de uma balança (Kern ABS, $\pm 0,1$ mg) e de uma proveta, de forma a quantificar a concentração de massa no volume colocada no extrator e para a modelação dos modelos matemáticos a efetuar.

Calculou-se a densidade recorrendo à seguinte equação:

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (36)$$

Em que m é a massa do farelo de arroz, em gramas e v o volume pelo mesmo ocupado, em mL.

Nas tabelas seguintes apresentam-se os valores de massas e volumes utilizados para as determinações das densidades do farelo de arroz antes e depois da secagem, bem como a média e desvio padrão.

Tabela 5 - Determinação da densidade da matéria-prima farelo de arroz, antes da secagem.

Massa (g)	Volume (mL)	Densidade (g/mL)	Média	Desvio Padrão
1,042	1,90	0,55		
1,517	2,70	0,56		
2,002	3,40	0,59	0,59	0,03
2,529	4,20	0,60		
3,014	4,80	0,63		

Tabela 6 - Determinação da densidade do farelo de arroz sujeito a secagem.

Massa (g)	Volume (mL)	Densidade (g/mL)	Média	Desvio Padrão
1,070	2,10	0,51		
1,501	2,60	0,58		
2,014	3,50	0,58	0,57	0,03
2,513	4,30	0,58		
3,012	4,90	0,62		

Recorrendo às Tabelas 5 e 6, verificou-se que a densidade para as amostras não apresenta diferenças significativas, de acordo com o seu desvio padrão.

A média e o desvio padrão da densidade finais do farelo de arroz obtiveram-se através dos valores das médias e desvios padrões das Tabelas 5 e 6, sendo que, a densidade apresenta um valor de 0,58 g/mL e o respetivo desvio padrão tem o valor de 0,03 g/mL.

3.2. Obtenção dos extratos do farelo de arroz

Neste subcapítulo procedeu-se à descrição do método convencional, extração em Soxhlet com dois solventes (hexano e etanol), e do método não convencional, extração supercrítica com dióxido de carbono (CO₂), para a obtenção de frações de óleo de farelo de arroz.

3.2.1. Extração em Soxhlet

A extração em Soxhlet foi efetuada para a obtenção do extrato de farelo de arroz, usando hexano (Analar NORMAPUR 98%, VWR//BDH PROLABO) e etanol (Analytical Reagent Grade 99,99%, F – Fisher Chemical) como solventes. Inicialmente, utilizou-se o solvente hexano, dado que uma das suas características é ser apolar, conseguindo assim, extrair, maioritariamente, os componentes apolares da amostra, nomeadamente o óleo. O solvente etanol foi utilizado de seguida, sendo um solvente mais polar, remove, preferencialmente, os compostos mais polares do farelo de arroz e, eventualmente, alguns componentes apolares. É de salientar ainda que o etanol é menos tóxico, não sendo prejudicial para o ambiente e tolerado em baixas quantidades na indústria alimentar, quando comparado com o hexano.

Pesou-se 10 gramas de farelo de arroz, previamente seco. Prosseguiu-se ao enchimento do invólucro (cartucho de celulose) com o mesmo, acondicionando-o devidamente, para a extração em Soxhlet. Adicionou-se ao balão de fundo redondo 250 mL de solvente, de forma a garantir uma quantidade de solvente suficiente para o equipamento Soxhlet, evitando assim o risco de o balão de fundo redondo trabalhar a seco. O ciclo de extração em Soxhlet demorou 3 horas. A montagem laboratorial do método encontra-se apresentado nas próximas figuras.

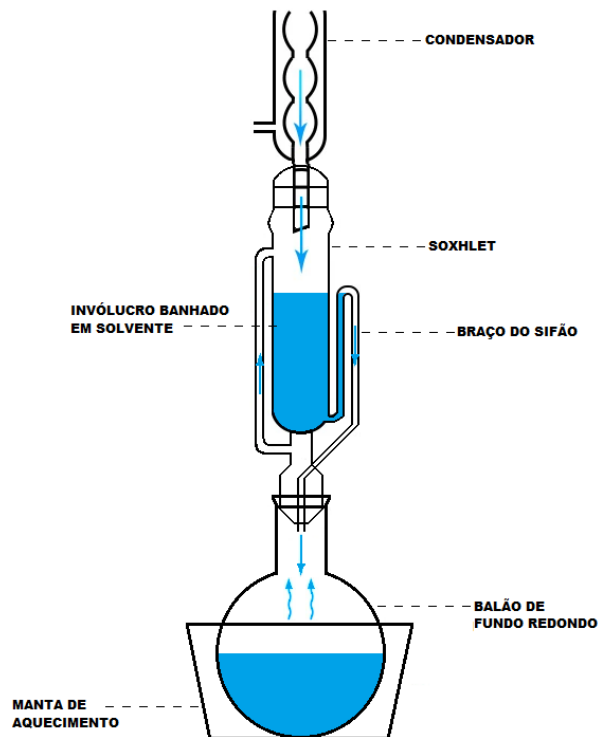


Figura 13 - Esquema referente à instalação da Extração em Soxhlet, adaptado da referência: (Dabbs et al., 2006).



(a) Equipamento da extração em Soxhlet

(b) Extrator Soxhlet com invólucro

Figura 14 - Montagem laboratorial do método convencional, extração em Soxhlet.

Após a extração em Soxhlet, colocou-se o cartucho na estufa, secando-o, para depois o pesar com o intuito de se efetuar o balanço de massa final. Por sua

vez, o balão que contém o solvente e o óleo foi submetido a um rota-vapor (BUCHI Rotavapor, R-205) e, posteriormente, a uma linha de vácuo, com o objetivo de garantir a evaporação completa do solvente no óleo extraído, de acordo com as condições dispostas na Tabela 7. Finalmente, procedeu-se ao armazenamento dos extratos obtidos até ao seu uso, num frigorífico a -20°C (253,15K).

Tabela 7 - Condições de separação do solvente do óleo, no Rota Vapor e na Linha de Vácuo.

Solvente	Rota Vapor		Linha de Vácuo
	Temperatura (K)	Vácuo (RPM)	Tempo (min)
Hexano	313,15 – 318,15	200	15
Etanol	323,15	220	60

3.2.2. Extração Supercrítica com CO_2

Para a obtenção de frações de óleo de farelo de arroz através de CO_2 supercrítico utilizou-se o equipamento presente no laboratório do CIEQB-ISEL, *Applied Separations Spe-ed SFE*. Este possibilita o processamento de ensaios com temperaturas até aos 120°C (393,15K) e pressões, no máximo, até 600 bar (60 MPa).

As Figuras 15 e 16 mostram o esquema e a imagem referentes ao equipamento de extração supercrítica, respetivamente.

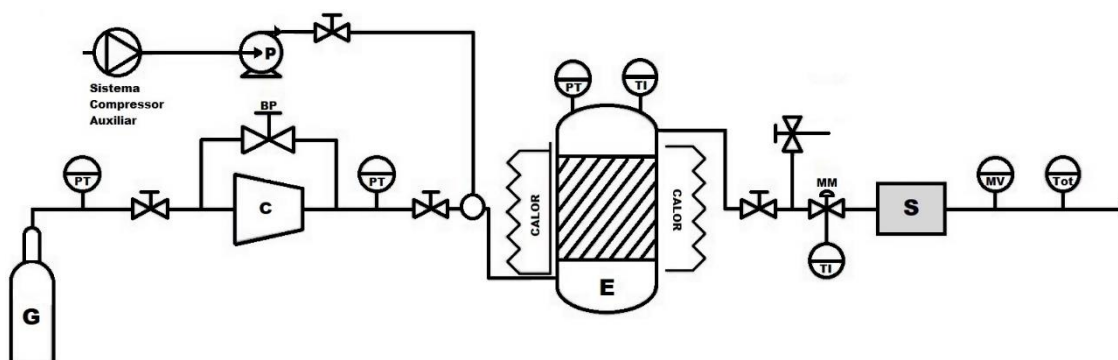


Figura 15 - Esquema referente à instalação do equipamento de Extração Supercrítica: G – Garrafa de gás (CO_2); PT – Manómetro; BP – Regulador de Pressão (“Back-Pressure”); C – Compressor; P – Bomba; TI – Indicador de Temperatura; E – Extrator; MM – Válvula Micrométrica; S – Separador; MV – Caudalímetro; Tot – Totalizador (Georgieva et al., 2018).



Figura 16 - Montagem laboratorial para o método alternativo, extração supercrítica com CO₂, Applied Separations Spe-ed SFE.

Preparou-se a célula de extração, preenchendo-a com aproximadamente 15 gramas de amostra (farelo de arroz) misturada com esferas de vidro, deste modo evita-se a colmatagem do leito do extrator, ou seja, a formação de um bolo, e com lã de propileno em cada uma das extremidades. Esta lã atua como filtro, reforçando os filtros de aço já existentes na célula de extração adjacentes a esta, impossibilitando o arrastamento para o sistema de partículas sólidas no decorrer do ensaio. Esta célula foi instalada dentro do forno, sendo que se fixou primeiro a parte superior da mesma e depois a parte inferior facilitando o processo da instalação.

De seguida, ligou-se o equipamento e os compressores, assim como se definiram as condições das temperaturas desejadas no forno e na válvula. Depois de estabilizadas as mesmas e garantindo a estabilidade térmica do sistema, introduziu-se a pressão pretendida no compressor e aguardou-se cerca de 30 minutos com o objetivo de se uniformizar as condições de trabalho implementadas.

O funcionamento da extração supercrítica compõe-se em três fases distintas, a saber (Santos, 2014; Veiga, 2016):

- 1ª Fase – Compressão do gás (CO₂)

Nesta etapa, implementou-se uma compressão do gás CO₂, recorrendo a um compressor auxiliar da *Jun-Air, modelo OF302*, que exerce um aumento de pressão até 7 bar (0,7 MPa), uma vez que, o compressor (C) (*Applied Separations, modelo*

Spe-ed SFE) apenas trabalha a pressões superiores a esta, tendo como finalidade comprimir o CO₂ até à pressão pretendida de funcionamento do extrator (E).

- 2ª Fase – Aquecimento

Avança para o extrator (E) (*Applied Separations, modelo Spe-ed SFE*) o CO₂ que foi comprimido previamente, onde será aquecido até à temperatura de trabalho desejada. A amostra que irá ser analisada foi colocada anteriormente na célula (E), localizando-se no interior do forno. Este apresenta uma capacidade para duas células de extração (vasos extratores) em linhas distintas e, portanto, cada linha tem um controlador de caudal (válvula micrométrica (MM)).

- 3ª Fase – Extração Supercrítica

Depois de estabilizadas as condições críticas de temperatura e pressão do gás, este circula através da célula onde se encontra a amostra em estudo, solubilizando-a. De seguida, iniciou-se o ensaio, sendo que o óleo flui através da válvula micrométrica (MM), mediante o ajuste de caudal de CO₂ da mesma.

É no separador (S), que também atua como filtro (*Applied Separations, modelo Spe-ed SFE phase extraction*), onde ocorre a saída e recolha da amostra precipitada. Consequentemente, o CO₂ dirige-se para o caudalímetro (MV) e para o medidor de gás total (*Alicat Scientific, modelo M-5SLPM-D*), onde se efetua a medição do caudal instantâneo, do volume total de CO₂ utilizado, bem como, o registo da temperatura e pressão. Além destas medições, também se apontou a duração do tempo de ensaio e a massa recolhida. Sendo esta recolhida num tubo de vidro em U (imerso em banho de gelo), à pressão atmosférica.

3.3. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos do farelo de arroz

A atividade antioxidante dos extratos do farelo de arroz foi efetuada através do método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), sendo ainda quantificados os polifenóis totais (TPC) e o teor de flavonoides.

3.3.1. Método do Radical Livre DPPH

Os ensaios da atividade antioxidante efetuaram-se pelo método do DPPH, de acordo com Bobo-García et al., 2015 e Prevc et al., 2013, não obstante as

alterações necessárias, usando o leitor de microplaca (*BioTek Synergy 2*). Para a determinação desta atividade, utilizou-se como solventes metanol puro e uma mistura de 50%/50% (v/v) de metanol etanol (Bobo-García et al., 2015; Duda et al., 2015; Shtereva et al., 2016).

Preparou-se uma solução 100 mmolar de DPPH (*Sigma Aldrich*) em 50 mL de solvente(s). Em cada poço de uma microplaca (*NUNC-96*) pipetou-se 300 µL de solvente(s), designado como branco. A existência de um solvente com um álcool primário é importante, uma vez que, a cinética é mais rápida, tal como é amplamente referenciado na literatura. Juntou-se 270 µL de solução de DPPH (2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazin-1-il) com 30 µL de solvente(s), definido como controlo negativo. Na mesma microplaca pipetou-se, ainda, para os poços, 270 µL de solução de DPPH junto com 30 µL de cada amostra (dissolvidas no(s) respetivo(s) solvente(s)).

A mistura reacional foi incubada num período de 40 minutos, sem exposição à luz e à temperatura ambiente. Após o término do tempo, recorreu-se à leitura da absorvância a 515 nm. Estas leituras foram realizadas em quadruplicado com o intuito de se consolidar estatisticamente os resultados obtidos.

Usou-se uma solução de trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) (*Sigma Aldrich 98%*) como antioxidante de referência de forma a se efetuar a curva de calibração e a análise de sensibilidade do método aplicado (Duda et al., 2015; Shtereva et al., 2016).

3.3.2. Determinação dos polifenóis totais (TPC)

Recorreu-se ao método de Folin-Ciocalteu, com algumas alterações, para se determinar o teor de polifenóis totais nas amostras, utilizando o leitor de microplaca (*BioTek Synergy 2*). A utilização ampla de microplacas consome menos solventes, menos tempo e facilita a aplicação dos componentes. Prepararam-se duas soluções: a do carbonato de sódio (em que se dissolveu 7,5 g de Na₂CO₃ em 100 mL de H₂O – água destilada) e a do reagente Folin-Ciocalteu (2N, numa proporção de 1:9 mL (v/v) diluído em água destilada). Diluíram-se as amostras num solvente, nomeadamente, uma mistura 50% de metanol + 50% etanol, após os testes já efetuados com o DPPH. Recorrendo-se, assim, ao procedimento descrito de seguida (Bobo-García et al., 2015; Reis et al., 2011):

- 1.º Passo – Pipetou-se nos diversos poços destinados ao branco (microplaca - *NUNC-96*), 30 µL de uma mistura de solventes, preparados anteriormente. E, noutros poços, 30 µL de amostra. Tanto o branco como a amostra foram analisados em quadruplicado;
- 2.º Passo – Adicionou-se, aos poços anteriores, 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu (2N, 1:9 mL (v/v)). A solução permaneceu em repouso à temperatura ambiente, num período de 4 minutos;
- 3.º Passo – Acrescentou-se 120 µL de solução de carbonato de sódio, 75 g/L (m/v) e colocou-se a 40°C (313,15K) na estufa, durante 30 minutos;
- 4.º Passo – Procedeu-se à leitura da microplaca num comprimento de onda de 765 nm.

Para a obtenção da curva de calibração, entre 0 e 55 µg, usou-se uma solução de ácido gálico (*Sigma Aldrich*, 97,5-102,5%). Sendo expressa a quantidade de polifenóis totais em µmol equivalente de ácido gálico por grama de extrato (EAG/ g ext).

3.3.3. Determinação do teor de flavonoides

Determinou-se o teor de flavonoides presente nas amostras pelo método de cloreto de alumínio, após algumas alterações, usando o leitor de microplaca (*BioTek Synergy 2*).

Dissolveram-se as amostras numa mistura de 50%/50% (v/v) de metanol etanol, tendo-se procedido de acordo com:

- 1.º Passo – Pipetou-se nos poços destinados ao branco (microplaca - *NUNC-96*), 240 µL de uma mistura de solventes (metanol + etanol), preparada anteriormente;
- 2.º Passo – Em poços distintos pipetou-se 25 µL de amostra e adicionou-se 100 µL de água destilada;
- 3.º Passo – Juntou-se 7,5 µL de uma solução de NaNO₂ (5% m/v) permanecendo a mistura em repouso à temperatura ambiente, num período de 5 minutos;
- 4.º Passo – Adicionou-se 7,5 µL de uma solução de AlCl₃ (*Merck - Schuchardt* 97%), 10% em etanol (m/v) e deixou-se repousar durante 5 minutos;
- 5.º Passo – Pipetou-se 100 µL de uma solução de NaOH (4% m/v) e colocou-se em repouso à temperatura ambiente, durante 10 minutos;

- 6.º Passo – Procedeu-se à leitura da microplaca num comprimento de onda de 415 nm. Tanto o branco como a amostra foram analisados em quadruplicado;

Recorreu-se a uma curva de calibração de uma solução de catequina (*Sigma Aldrich 98%*) com uma gama de concentrações de 0 a 300 µg/mL em função da absorvância, com o intuito de se determinar a quantidade de flavonoides presentes. Os resultados dos óleos analisados, dissolvidos na mistura de 50% metanol + 50% etanol, encontram-se expressos em micromole, equivalente de catequina por grama de extrato (µmol EC/g ext).

3.4. Planeamento Estatístico de Experiências (DOE)

Com recurso à ferramenta estatística, Planeamento Estatístico de Experiências (DOE), aplicada à extração supercrítica com dióxido de carbono (CO₂), pretendeu-se um estudo mais eficaz de interação entre os diversos fatores e os respetivos resultados nas respostas escolhidas.

Este permite uma otimização dos diversos fatores (variáveis explicativas), nomeadamente, a pressão (MPa), a temperatura (K) e o caudal (kg/min) mediante os resultados obtidos das variáveis de resposta (fatores ativos) escolhidas, tais como, o rendimento (%), o teor de flavonoides (µmol EC/g ext) e o teor de polifenóis totais (µmol EAG/g ext), sendo assim possível obter um melhor conjunto de resultados para o estudo.

3.4.1. Desenho fatorial fracionário (FFD – Fractional Factorial Design)

A Metodologia Fatorial (Factorial Methodology - FM) permite a análise em simultâneo de dois fatores, combinando os efeitos entre si (interaction effect), demonstrando ser mais eficiente do que o estudo isolado desses fatores (main effect). Além disso, esta metodologia é fundamental, caso interações estejam presentes, evitando conclusões erróneas e ainda, possibilita o cálculo dos efeitos de um fator, em diversos níveis dos outros, retirando conclusões válidas num intervalo de condições experimentais (Montgomery, 2013).

O desenho fatorial fracionário (FFD – Fractional Factorial Design) é um método de escolha, combinando os valores extremos do intervalo implementado, que possibilita a identificação dos efeitos mais relevantes do modelo através de um menor número de ensaios realizados (Ara et al., 2014; Karazhiyan et al., 2011; Montgomery, 2013).

Tendo em conta a metodologia e o equipamento da extração efetuada, elegeram-se três fatores que afetam as respostas experimentais, nomeadamente:

- **A: Pressão (MPa)** - A pressão de extração;
- **B: Temperatura (K)** – A temperatura de extração;
- **C: Caudal (kg/min)** – O caudal do fluido supercrítico (CO₂).

Numa primeira etapa do trabalho laboratorial, recorreu-se ao software estatístico Design Expert 11 (DX11) e escolheu-se um FFD (2³) com o desenho fatorial de dois níveis, conseguindo-se gerar uma matriz experimental de 1x8 ensaios. Na tabela seguinte encontram-se listados os respetivos ensaios, com base nos fatores de codificação (-1 e 1 equivalem aos níveis de fatores do valor mínimo e máximo, respetivamente).

Tabela 8 – Descrição do desenho fatorial fracionário, FFD (2^3), através de fatores de codificação.

		Fator 1	Fator 2	Fator 3
		A:	B:	C:
Padrão	Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (K)	Caudal (kg/min)
8	A1	1	1	1
5	A2	-1	-1	1
1	A3	-1	-1	-1
6	A4	1	-1	1
2	A5	1	-1	-1
3	A6	-1	1	-1
7	A7	-1	1	1
4	A8	1	1	-1

Os fatores de codificação apresentados na tabela anterior foram substituídos pelos intervalos de valores reais pré-definidos, tais como, uma gama de **pressões** entre os 25 e 40 MPa, uma **temperatura** entre os 313,15 e os 353,15K e um **caudal** entre os 0,9E-03 e 2,7E-03 kg/minuto, conforme demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 9 - Descrição do desenho fatorial fracionário, FFD (2^3), através de fatores reais de trabalho.

		Fator 1	Fator 2	Fator 3
		A:	B:	C:
Padrão	Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (K)	Caudal (kg/min)
8	A1	25,0	313,15	2,7E-03
5	A2	40,0	353,15	0,9E-03
1	A3	25,0	313,15	0,9E-03
6	A4	40,0	313,15	0,9E-03
2	A5	40,0	313,15	2,7E-03
3	A6	25,0	353,15	0,9E-03
7	A7	25,0	353,15	2,7E-03
4	A8	40,0	353,15	2,7E-03

3.4.2. Desenho do composto central (CCD – Central Composite Design)

A Metodologia de Superfície de Resposta (Response Surface Methodology - RSM) baseia-se em técnicas matemáticas e estatísticas cujo intuito é modelar e investigar problemas onde, uma ou mais variáveis de resposta de interesse são afetadas, por diversas variáveis explicativas. Analisando a relação entre elas, pretende-se atingir um resultado ótimo (Montgomery, 2013). Esta metodologia é considerada prática, económica e de fácil implementação (Amaral et al., 2018; Ara et al., 2014; Karazhiyan et al., 2011; Montgomery, 2013; Singh & Rao, 2007).

O desenho do composto central (CCD) é um método eficaz de ajuste de modelos de segunda ordem, sendo formado por um desenho fatorial 2^k (2^k factorial design) através de pontos não centrais, pontos fatoriais ou pontos axiais (de estrela) e de pontos centrais. Frequentemente, este desenho implementa-se mediante uma experimentação sequencial, permitindo otimizar os efeitos mais relevantes anteriormente determinados no desenho fatorial fracionário (FFD) (Montgomery, 2013).

Tendo em conta os resultados experimentais analisados no desenho fatorial fracionário (FFD), escolheram-se os dois principais fatores que os afetam, a saber:

- **A: Pressão (MPa)** - A pressão de extração;
- **B: Temperatura (K)** – A temperatura de extração.

Nesta segunda etapa do trabalho laboratorial, recorreu-se novamente, ao software estatístico Design Expert 11 (DX11). Selecionou-se um CCD com o desenho superfície de resposta de cinco níveis, onde se optou por um α giratório (α rotatable). Gerou-se uma matriz experimental de 11 ensaios, com 8 pontos não centrais e 3 pontos centrais (sendo o ponto central repetido três vezes de forma a determinar o desvio experimental entre estes, apresentando um suporte estatístico mais robusto aos resultados).

Na tabela seguinte encontram-se listados os respetivos ensaios, com base nos fatores de codificação (-1 e 1 equivalem aos níveis dos pontos fatoriais do valor mínimo e máximo, respetivamente; $-\alpha$ e α equivalem aos níveis dos pontos axiais ou de estrela do valor - 1,41421 - mínimo e máximo, respetivamente; e o 0 equivale ao nível do ponto central).

Tabela 10 – Descrição do desenho do composto central, CCD, através de fatores de codificação.

		Fator 1	Fator 2
		A:	B:
Padrão	Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (K)
1	A9	-1,000	-1,000
2	A10	1,000	-1,000
3	A11	-1,000	1,000
6	A12	1,414	0,000
9	A13	0,000	0,000
10	A14	0,000	0,000
7	A15	0,000	-1,414
11	A16	0,000	0,000
4	A17	1,000	1,000
8	A18	0,000	1,414
5	A19	-1,414	0,000

Os fatores de codificação apresentados na tabela anterior foram substituídos pelos intervalos de valores reais pré-definidos, tais como, uma gama de **pressões** entre os 30 e 40 MPa, uma **temperatura** entre os 323,15 e os 353,15K, conforme demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 11 – Descrição do desenho do composto central, CCD, através de fatores reais de trabalho.

		Fator 1	Fator 2
		A:	B:
Padrão	Ensaio*	Pressão (MPa)	Temperatura (K)
1	A9	30,0	323,15
2	A10	40,0	323,15
3	A11	30,0	353,15
6	A12	42,1	338,15
9	A13	35,0	338,15
10	A14	35,0	338,15
7	A15	35,0	316,94
11	A16	35,0	338,15
4	A17	40,0	353,15
8	A18	35,0	359,36
5	A19	27,9	338,15

* ensaios submetidos a **caudal** constante (1,8E-03 kg/minuto).

Capítulo 4

4. Resultados e Discussão

4.1. Extração em Soxhlet do óleo do farelo de arroz

O óleo obtido através da extração em Soxhlet, com hexano apresentava uma consistência líquida viscosa, uma tonalidade castanha amarelada e uma ausência de aroma, observado à t.a. Por sua vez, o extraído com etanol, possuía uma consistência sólida pegajosa, uma tonalidade castanha escura e ausência de aroma.



Figura 17 - Óleos obtidos através da extração em Soxhlet.

O rendimento do óleo foi determinado pela razão entre a massa de extrato e a de amostra, através da seguinte equação:

$$\eta = \frac{\text{massa do extrato (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (37)$$

Na tabela seguinte, encontram-se os dados referentes aos ensaios efetuados.

Tabela 12 - Resultados obtidos na Extração em Soxhlet, em hexano e etanol.

Solvente	Tempo (min)	Ensaio	Massa da amostra (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Hexano	45	1*	15,01	0,82	5,47
	90	2*	15,03	1,10	7,31
	180	3	10,08	0,89	8,81
		4	10,09	0,84	8,32
Etanol	180	5	9,08	0,45	4,96
		6	9,10	0,37	4,06

*amostra não submetida posteriormente ao solvente etanol.

Nota: Os cartuchos usados nos ensaios 3 e 4 foram reutilizados nos ensaios 5 e 6, respetivamente.

Com base na tabela anterior, avaliou-se o desempenho dos solventes usados na extração em Soxhlet, aos 180 minutos (tempo de extração comum). Constata-se que o hexano apresentou um rendimento na ordem de 8,50%, enquanto o etanol rondou os 4,50%.

Através da extração sequencial de hexano e etanol, verifica-se que, sensivelmente, 4,50% de compostos mais polares não são extraídos com o solvente hexano, existindo, assim, duas classes de compostos, apolares e polares presentes no óleo de farelo de arroz.

Segundo o estudo efetuado por Kuk e Dowd, para obtenção do óleo do farelo de arroz extraído em Soxhlet, com o solvente hexano, registou-se um rendimento de 20,50%. Por sua vez, Balachandran et al., obteve um rendimento de 22,50% para a extração em Soxhlet, com igual solvente (Sookwong & Mahatheeranont, 2017). Nesta dissertação, alcançou-se valores de rendimento em torno dos 8,50%, tal pode ser justificado pela diferente variedade de arroz estudada ou pela forma como é obtida a própria camada de farelo de arroz.

Da análise dos diversos tempos utilizados na extração em Soxhlet, verifica-se rendimentos na ordem de 5,0% e 7,0%, quando se observam os minutos 45 e 90, respetivamente. Para o dobro do tempo, verifica-se um aumento de 40% de rendimento, para valores próximos de 8,5%. Posteriormente, constatou-se um acréscimo de 29% de rendimento apesar de se repetir a duplicação do tempo de reação, dos 90 minutos (7%) para os 180 (9%, média dos

ensaios 3 e 4). Verifica-se que o rendimento apresenta uma estabilização, para o tempo de 180 minutos.

4.2. Extração Supercrítica com CO₂ do óleo do farelo de arroz através do desenho fatorial fracionário (FFD)

Através do software estatístico, Design Expert 11 (DX11), numa primeira fase, selecionou-se o desenho fatorial fracionário (FFD), combinando apenas os valores extremos e, de seguida, realizou-se o desenho do composto central (CCD) aplicando combinações com os valores existentes no intervalo pré-definido. Analisaram-se vários fatores, como a pressão (MPa), a temperatura (K) e o caudal (kg/min) em conformidade com os resultados das variáveis de resposta escolhidas.

Para o desenho fatorial fracionário (FFD – Fractional Factorial Design) consideraram-se três variáveis de resposta, a saber:

- **Resposta 1: Rendimento (%)** – O rendimento obtido no processo de extração supercrítica com CO₂;
- **Resposta 2: Polifenóis (μmol EAG/g ext)** – A quantidade total de polifenóis totais nos óleos de acordo com o método de Folin-Ciocalteu;
- **Resposta 3: Flavonoides (μmol EC/g ext)** – A quantidade total de flavonoides nos óleos de acordo com o método de cloreto de alumínio.

Este procedimento experimental, efetuado em 8 ensaios, possibilita a identificação dos **fatores** mais relevantes, numa gama de **pressões** entre os 25 e 40 MPa (250 e 400 bar), com uma **temperatura** entre os 313,15 e os 353,15K (40 e os 80°C) e um **caudal** entre os 0,9E-03 e 2,7E-03 kg/minuto (0,5 e 1,5 L/min).

Escolheu-se este limite máximo de pressão, de temperatura e de caudal em conformidade com a informação disponível na literatura, de modo a facilitar a comparação entre os métodos, tradicional e alternativo (Coelho & Palavra, 2015). Ainda se consideraram diversos fatores, nomeadamente, a solubilidade característica deste tipo de óleos, estes apresentam uma solubilidade mais baixa em redor dos 25 MPa, bem como, uma solubilidade mais alta aos 40 MPa, e o limite da capacidade física do equipamento utilizado na gestão de caudal.

Durante o ensaio procedeu-se ao registo do tempo, da massa do óleo extraído e do volume do fluido supercrítico (CO₂) dos diversos pontos medidos

para se avaliar a evolução da extração através do rendimento obtido (**Anexo B**). Dava-se por terminado o ensaio quando se comprovava que a massa do óleo extraído era irrelevante face a um volume estipulado, atingindo-se um patamar limite.

Os óleos extraídos com CO₂ supercrítico denotavam ligeiras diferenças entre si, mediante as combinações aplicadas de pressão, temperatura e caudal. Visualmente, observado a uma t.a., apresentavam ténues tonalidades de verdes, uma consistência que variava entre a líquida translúcida e a líquida viscosa (baça), com ausência de aroma.



Figura 18 - Óleos obtidos através da extração supercrítica com CO₂.

As figuras abaixo evidenciam os gráficos do rendimento obtido em função ao tempo de extração para as diferentes combinações de pressão, temperatura e caudal das extrações supercríticas executadas. De forma a se estabelecer uma comparação, optou-se por se agrupar os ensaios efetuados através de valores constantes de temperatura (313,15; 353,15K) ou pressão (25; 40 MPa), nos quais o caudal de CO₂ também é considerado como fator de análise.

Na Figura 19, constata-se que para uma temperatura de 353,15K, o aumento de pressão permite obter um maior rendimento num tempo significativamente reduzido. Por outro lado, para um caudal superior verifica-se, igualmente, que o tempo de extração é significativamente menor para ambas as pressões, principalmente para a pressão mais baixa (25 MPa), tendendo mais rapidamente para o patamar máximo da extração, ou seja, a exaustão da matriz em termos de compostos extratáveis pelo método. É notório que um caudal mais elevado favorece um maior rendimento num menor tempo de extração necessário para atingir esse máximo.

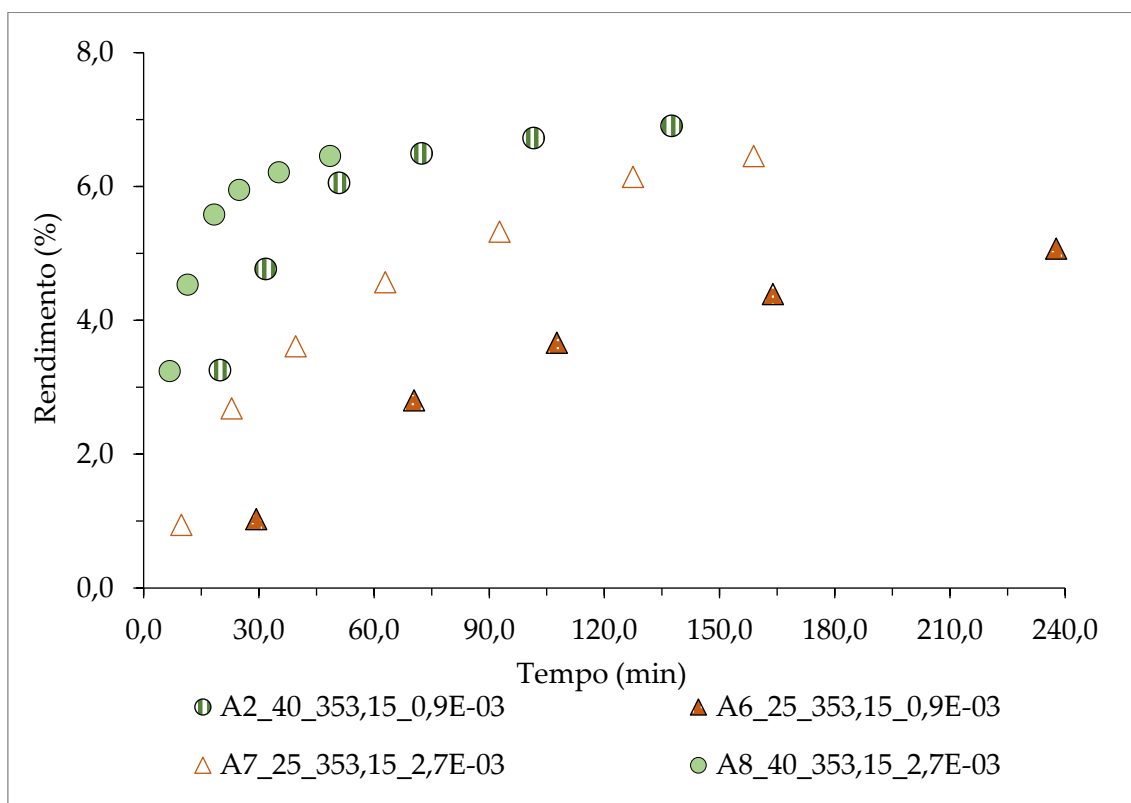


Figura 19 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma temperatura de 353,15K.

Considerando a figura anterior, verifica-se que o pior rendimento (5,07%) é obtido quando o valor de pressão e caudal se apresentavam no seu limite inferior, 25 MPa e 0,9E-03 kg/min, respetivamente. É também possível verificar que se obtiveram melhores rendimentos para os tempos de extração mais reduzidos, resultantes dos limites superiores de pressão, independentemente do caudal utilizado.

Na Figura 20 são apresentados os resultados da extração para as duas pressões e caudais, para uma temperatura de 313,15K. Os maiores rendimentos são obtidos para a pressão mais elevada, 40 MPa, em função do tempo de extração, como seria de esperar atendendo à maior densidade do CO₂ supercrítico e conseqüente aumento de poder de solvatação do óleo pelo mesmo. Contudo, para o caudal mais elevado, 2,7E-03 kg/min, a 25 MPa, o rendimento da extração é, igualmente, semelhante ao de 40 MPa, atingindo os mesmos valores máximos, para maiores tempos de extração. Para o caudal menor, 0,9E-03 kg/min, a 25 MPa esse rendimento também é praticamente alcançado, embora a cinética da

extração seja mais lenta, como se verifica pelo tempo de extração necessário para atingir o seu valor máximo que é, sensivelmente, o dobro.

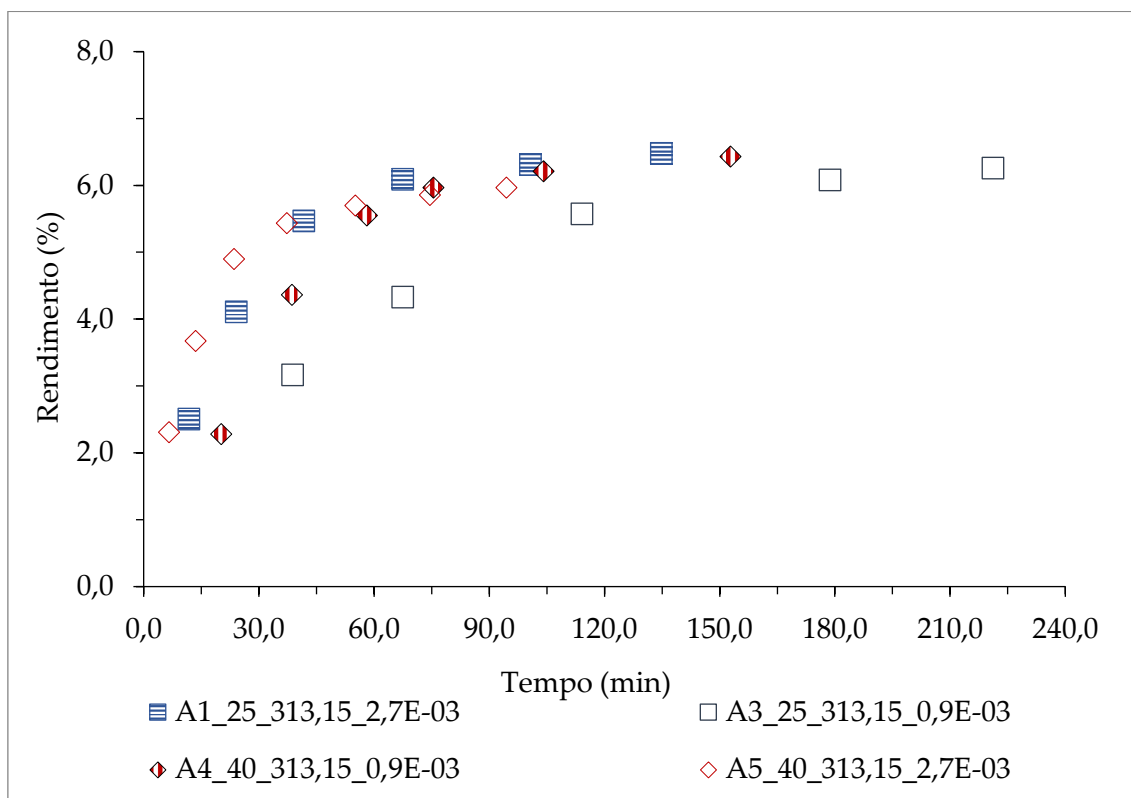


Figura 20 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma temperatura de 313,15K.

Comparando as tendências dispostas nas Figuras 19 e 20, para as mesmas pressões e temperaturas, confirma-se que quanto maior o caudal, mais elevada é a cinética da extração, diminuindo, consideravelmente, os tempos de extração para metade. Em média, observa-se a diminuição desses valores, aproximadamente, de 200 para 100 minutos.

Nas Figuras 21 e 22, representa-se o rendimento do extrato do farelo de arroz através da extração supercrítica com CO₂, em função do tempo, para as pressões de 25 e 40 MPa, respetivamente, para as duas temperaturas e caudais de trabalho utilizados.

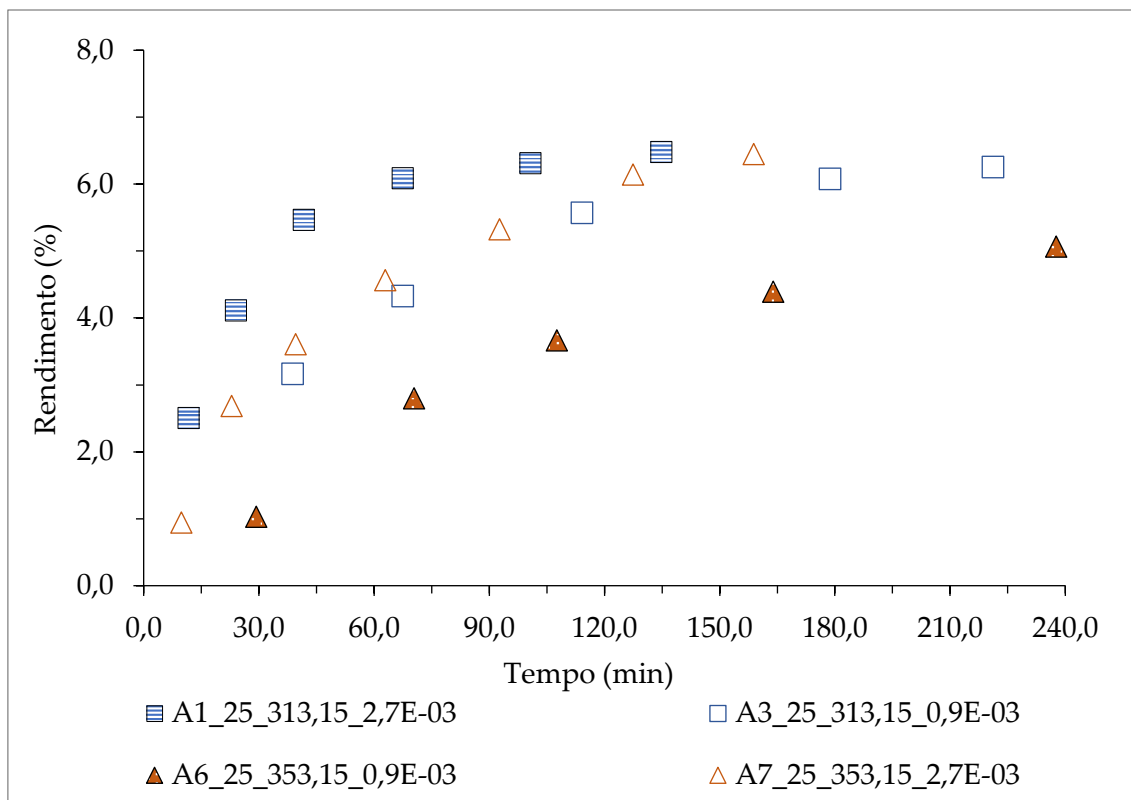


Figura 21 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma pressão de 25 MPa.

Através da Figura 21, verifica-se que para a pressão mais baixa, a influência da temperatura e caudal de CO₂ é mais significativa e notória, quando comparada com a Figura 22. O rendimento mais elevado é alcançado no ensaio A1 a 313,15K e 2,7E-03 kg/min. Este ensaio apresenta, ainda, uma cinética de extração maior, uma vez que, o tempo necessário para alcançar o valor mais elevado de rendimento é menor. Por outro lado, o aumento de temperatura e diminuição de caudal de CO₂ (ensaio A6), influência negativamente o processo de extração para a pressão de 25 MPa.

Para a pressão de 40 MPa (Figura 22), o efeito da temperatura e do caudal, faz-se igualmente notar, quer no valor final de rendimento quer no tempo para o alcançar, mas essa influência e diferenças de valores é menor. O maior valor de rendimento é alcançado para a temperatura de 353,15K com um caudal de 2,7E-03 kg/min (ensaio A8).

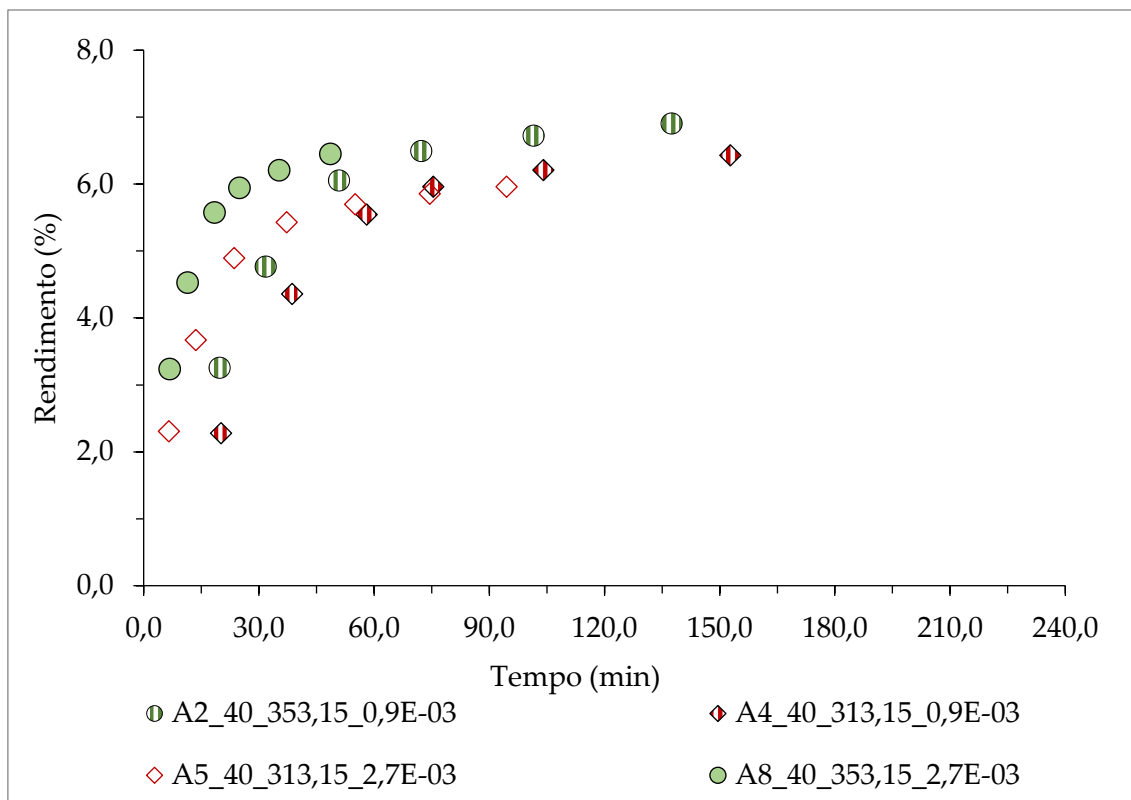


Figura 22 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma pressão de 40 MPa.

Assim, verifica-se que com fatores mais elevados de pressão, temperatura e caudal se obtêm melhores rendimentos, contribuindo cada um deles, de forma diferente, para se alcançarem esses valores num menor tempo possível. Numa fase mais adiantada, serão analisados em conjunto com outras respostas, utilizando a ANOVA.

Da análise das duas Figuras 21 e 22, em conjunto, verifica-se que para a pressão de 25 MPa, o aumento da temperatura para 353,15K diminui significativamente o rendimento da extração, e que para a pressão de 40 MPa, esse mesmo aumento de temperatura favorece o processo. Este fenómeno deve-se ao balanço entre o aumento da solubilidade dos compostos presentes no óleo do farelo de arroz, com a pressão, e, por outro lado, para a mesma pressão, o aumento da temperatura incrementa a pressão vapor dos compostos a extrair.

Com efeito, a solubilidade dos compostos no fluido supercrítico é função da densidade do solvente (pressão e temperatura) e da pressão de vapor dos compostos. Numa isoterma com o aumento de pressão, a densidade do solvente aumenta enquanto a pressão de vapor diminui. Por outro lado, o aumento da temperatura isobaricamente resulta numa diminuição da densidade do solvente e aumento da pressão de vapor do soluto. Os efeitos antagônicos destes

parâmetros ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, fenômeno conhecido como solubilidade retrograda. A inversão das curvas de extração (solubilidade) é resultado da predominância de um dos fatores acima citados (Coelho & Palavra, 2015).

Finalmente, o comportamento das curvas de extração, nomeadamente, a primeira fase do processo com uma variação linear do rendimento com tempo e, posteriormente, um decaimento progressivo pode ser interpretado, de acordo com, os seguintes pontos:

- Num processo de extração em leito fixo, a etapa inicial da extração caracteriza-se por uma concentração constante de soluto (óleo) na fase solvente. O valor dessa concentração pode variar, sendo influenciado pelo caudal de solvente. A solubilidade é um dado de equilíbrio que representa a máxima concentração de soluto na fase solvente e é obtida, experimentalmente, a partir da inclinação da etapa de taxa constante de extração. Assim, para a obtenção da solubilidade em processos de extração em leito fixo, o caudal de solvente apresenta-se como um dos parâmetros importantes a ser analisado, pois o mesmo deve ser tal que permita a saturação do solvente com os solutos a serem extraídos.
- Numa fase final de extração, a exaustão da matriz (farelo de arroz), leva a quantidades menores dos solutos presentes na mesma, diminuindo significativamente, os valores de solubilidade até à exaustão total da matriz e, conseqüentemente, atingir o patamar da curva de extração em função do tempo.

4.3. Caracterização da atividade antioxidante, flavonoides e polifenóis totais no óleo de farelo de arroz

Nesta fase de estudo, é necessário caracterizar os óleos obtidos através da extração supercrítica, para as diferentes condições experimentais, definidas pelo FFD. Para tal, escolheu-se como objeto de caracterização a atividade antioxidante, a quantidade de flavonoides e a quantidade total de polifenóis nos óleos, sendo estes dois últimos, fundamentais para a análise do desenho fatorial.

4.3.1. Comparação de diferentes curvas de calibração para o método do radical livre DPPH – influência dos solventes

Após a realização das extrações, por Soxhlet e por extração supercrítica, recorrendo ao primeiro planeamento experimental FFD, começou-se por proceder à caracterização dos óleos obtidos, nomeadamente, a quantificação da atividade antioxidante dos mesmos.

Contudo, atendendo a que óleos são constituídos, essencialmente, por triacilgliceróis (gorduras), a sua dissolução com solventes polares, como o metanol, não se apresenta fácil para a aplicação e métodos analíticos de quantificação. Usualmente, formam uma emulsão que impossibilita a análise com métodos espectrofotométricos (Uv-Vis) ou, de uma forma geral, podem tender a apresentar resultados erróneos.

Assim, para a determinação do DPPH nas amostras, efetuaram-se vários testes com diferentes solventes e técnicas da literatura, para se analisar as mesmas e verificar o(s) melhor(es) solvente(s) para a dissolução das amostras. Simultaneamente, procederam-se às diferentes curvas de calibração com trolox nos solventes testados, para além do que convencionalmente é utilizado - metanol- de acordo com os métodos usuais (Sharma & Bhat, 2009).

Um dos primeiros solventes a ser testados para solubilizar os óleos, foi a mistura 50% de metanol + 50% de isopropanol com 30 mM de tris, a partir da qual se prepara uma solução de 100 mM de DPPH (Prevc et al., 2013). Todos os ensaios foram executados com uma solução padrão de trolox e em microplacas de 96 poços, com as necessárias adaptações e de acordo com o descrito por Bobo et al. (Bobo-García et al., 2015), sendo as leituras efetuadas no Uv-Vis, a 515 nm.

Através de uma solução padrão trolox com uma concentração inicial de 1030,0 µg/mL, prepararam-se soluções entre 10,3 e 412,0 µg/mL. Os resultados destas são apresentados na figura seguinte, encontrando-se os valores da mesma no **Anexo C**.

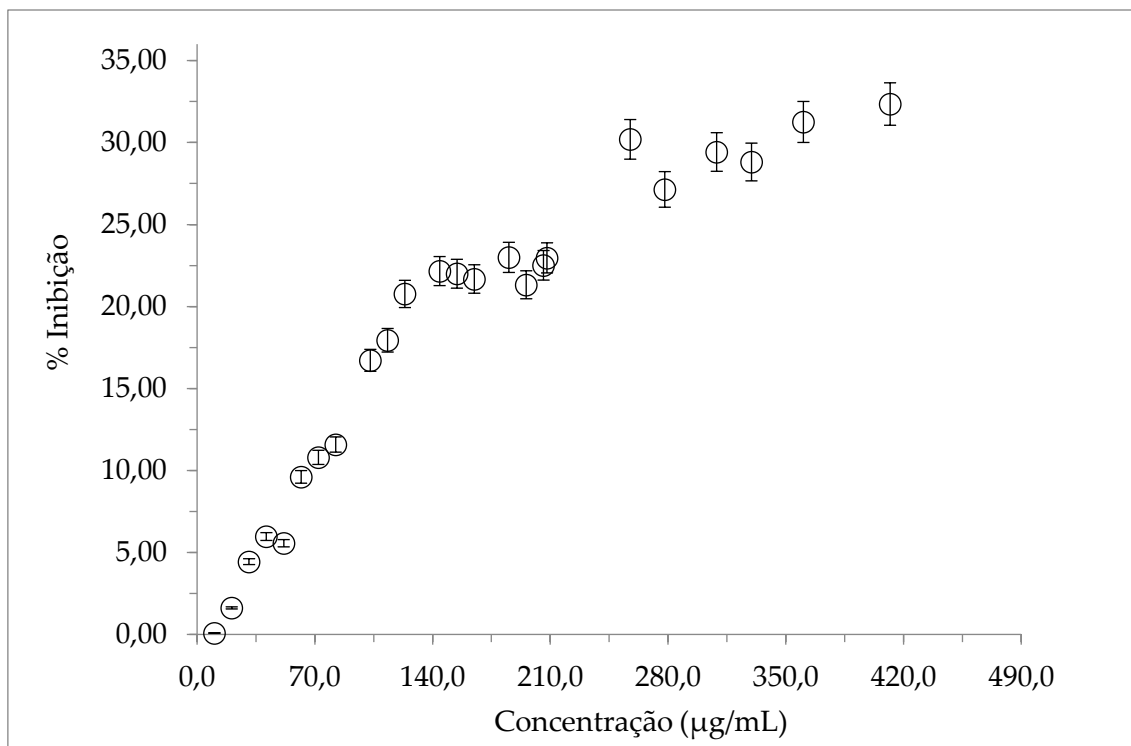


Figura 23 - Curva de calibração do trolox, o antioxidante usado, em 50% metanol com 50% isopropanol, tris e DPPH.

Verifica-se que para a concentração de trolox até 144,2 µg/mL na solução, a sua percentagem de inibição aumenta. Porém, a partir desta e até à concentração mais elevada testada (412,0 µg/mL), a variação apresenta-se inconsistente e praticamente não se altera. Na Figura 23, os resultados apresentados permitem verificar a impossibilidade de determinar o IC₅₀, na gama de concentrações estudadas.

Foram, ainda, efetuados dois ensaios com soluções de maior concentração, mas sem resultados conclusivos. De seguida, reduziu-se o composto tris na mistura de solventes antes estudada, de 30 mM para 10 mM, uma vez que, este pode funcionar como catalisador e poderia ter acelerado demasiado a reação entre o trolox e o DPPH, face ao pretendido. Contudo, os resultados não foram coerentes entre si e de difícil interpretação.

Considerando a boa solubilidade dos óleos de farelo de arroz obtidos na mistura metanol + isopropanol, preparou-se uma mistura de 50% de metanol e 50% de isopropanol com 100 mM de DPPH, removendo o composto tris. As soluções de trolox foram, então, preparadas neste mesmo solvente, tendo a solução uma concentração inicial de 1000 µg/mL, a partir da qual se preparou e testou as soluções da Figura 24. A figura seguinte, representa os valores referentes à Tabela 47, disponível no **Anexo C**.

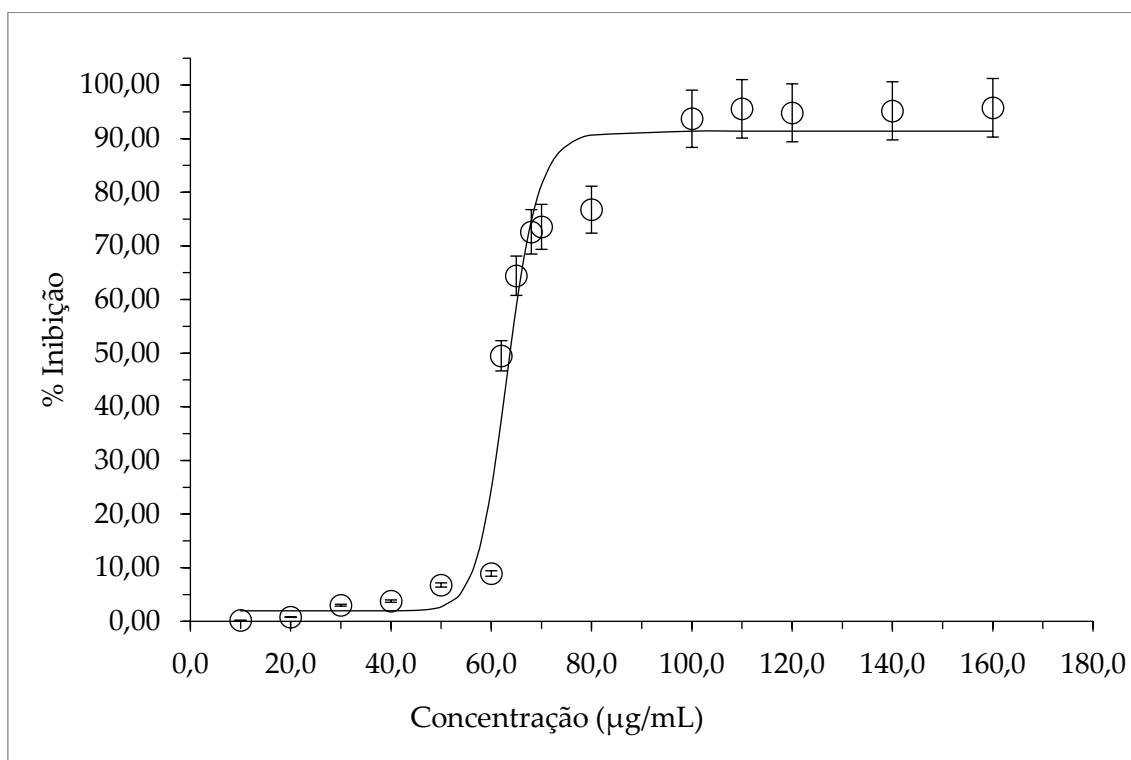


Figura 24 - Curva de calibração do trolox, com a mistura de 50% metanol 50% isopropanol, em DPPH.

A equação que melhor traduz os dados experimentais da figura anterior é representada por:

$$Y = d + \frac{(a - d)}{\left(1 + \frac{X}{c}\right)^b} \quad (38)$$

Com os coeficientes da tabela abaixo.

Tabela 13 – Parâmetros de coeficientes da equação para a curva de calibração, do trolox em DPPH, com a mistura de 50% metanol 50% isopropanol.

Coeficiente	
a	1,960 ± 3,629
b	20,396 ± 4,928
c	63,257 ± 0,785
d	91,396 ± 3,298
R quadrado	9,69E-01

Como se pode verificar, embora o comportamento do sistema tenda para 100% de inibição, como será normal, o mesmo não segue uma relação linear e apresenta um ajuste com quatro parâmetros, que não será o melhor para qualquer curva de calibração, uma vez que, implica a existência de uma maior quantidade de pontos experimentais para que, estatisticamente, os resultados tenham significado.

Assim, procuraram-se outros solventes mais utilizados e onde os óleos fossem solúveis, tendo-se deixado a mistura metanol + isopropanol. Mais, atendendo aos resultados que se estavam a obter, procedeu-se, de seguida, à usual curva de calibração com o metanol puro, uma vez que é o solvente tradicionalmente mais usado para estes estudos e, a partir do qual, pretendíamos verificar os resultados que estávamos a obter, quer para o reagente trolox, quer para o DPPH.

Apresenta-se, na figura a seguir, as concentrações finais das amostras estudadas e a % de inibição das mesmas.

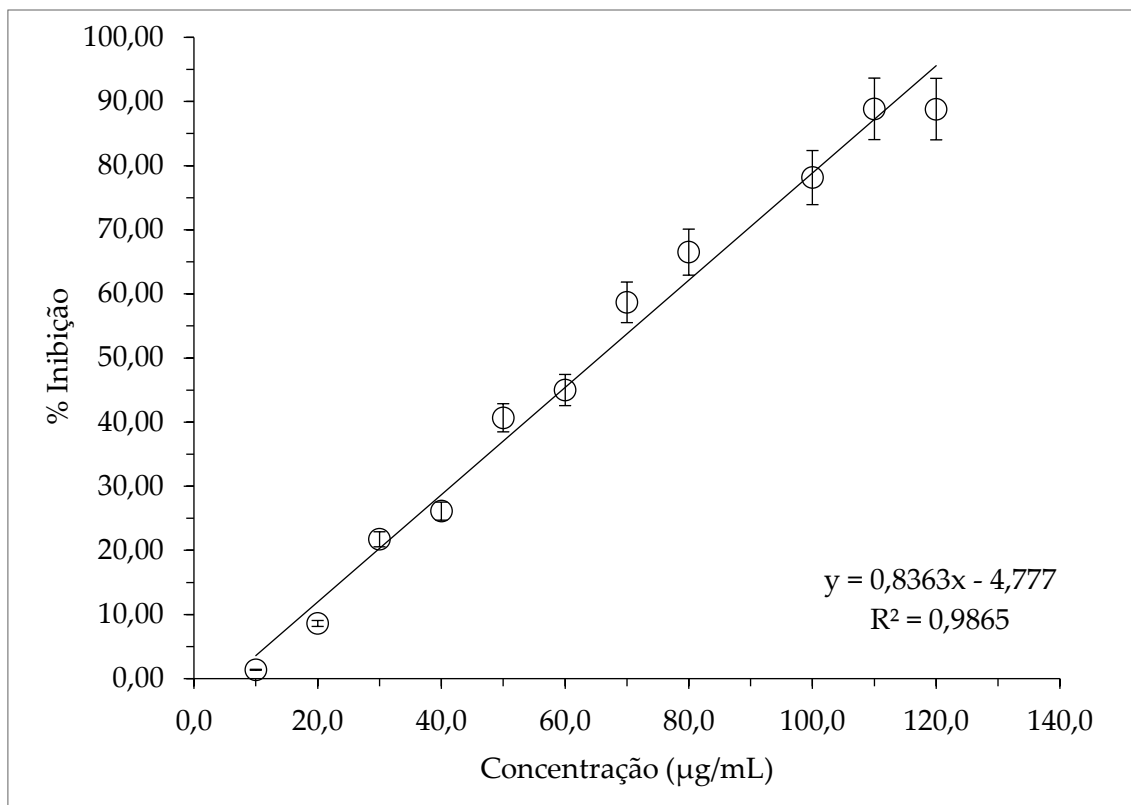


Figura 25 - Curva de calibração e sua reta para o trolox, o antioxidante usado, em metanol com 100 mM de DPPH.

Para a correlação da curva de calibração, demonstrada na Figura 25, não se usou os últimos dois pontos apresentados na Tabela 48, encontrada no **Anexo C**, uma vez que, os mesmos já se encontravam no patamar a tender para 100% de inibição.

Analisando a tendência da curva de calibração, apresentada na Figura 25, verificou-se que o metanol se comporta de forma esperada com o trolox e DPPH utilizados.

Os dados foram tratados através de uma análise de correlação, utilizando uma regressão ANOVA, tendo-se obtido parâmetros mais precisos, com os respectivos erros associados. Simultaneamente, determinaram-se os limites de detecção e quantificação a partir do desvio padrão dos resultados (Saadati et al., 2013).

Tabela 14 - Parâmetros da curva de calibração, através do método DPPH com o metanol puro, para o antioxidante trolox.

Y=a+bX	
Ordenada na origem (a)	-4,777 ± 5,31
Declive (b)	8,36E-01 ± 0,074
R quadrado	9,86E-01
Erro padrão da correlação (y/x)	3,806
Limite de deteção (LOD)	8,41 µg/ml
Limite de quantificação (LOQ)	28,05 µg/ml

O valor obtido para IC₅₀ do trolox é de 65,50 ± 3,81 mg/mL, sendo comparável com os obtidos por outros autores, 97,50 ± 6,65 mg/mL (Noreen et al., 2017) ou o valor de 57,02 ± 2,36 mg/mL (Cardoso, 2017). Contudo, foi necessário procurar outros solventes, como anteriormente mencionado, devido ao problema associado à solubilidade das amostras.

Efetuarão-se mais duas curvas de calibração, uma mistura de 50% de metanol com 50% de etanol e uma mistura de 50% de etanol com 50% de água.

Começou-se por executar a curva de calibração cujo solvente consistia numa mistura de 50%/50% (v/v) de metanol etanol. Na figura subsequente, encontram-se as concentrações finais das amostras e a sua % de inibição correspondente.

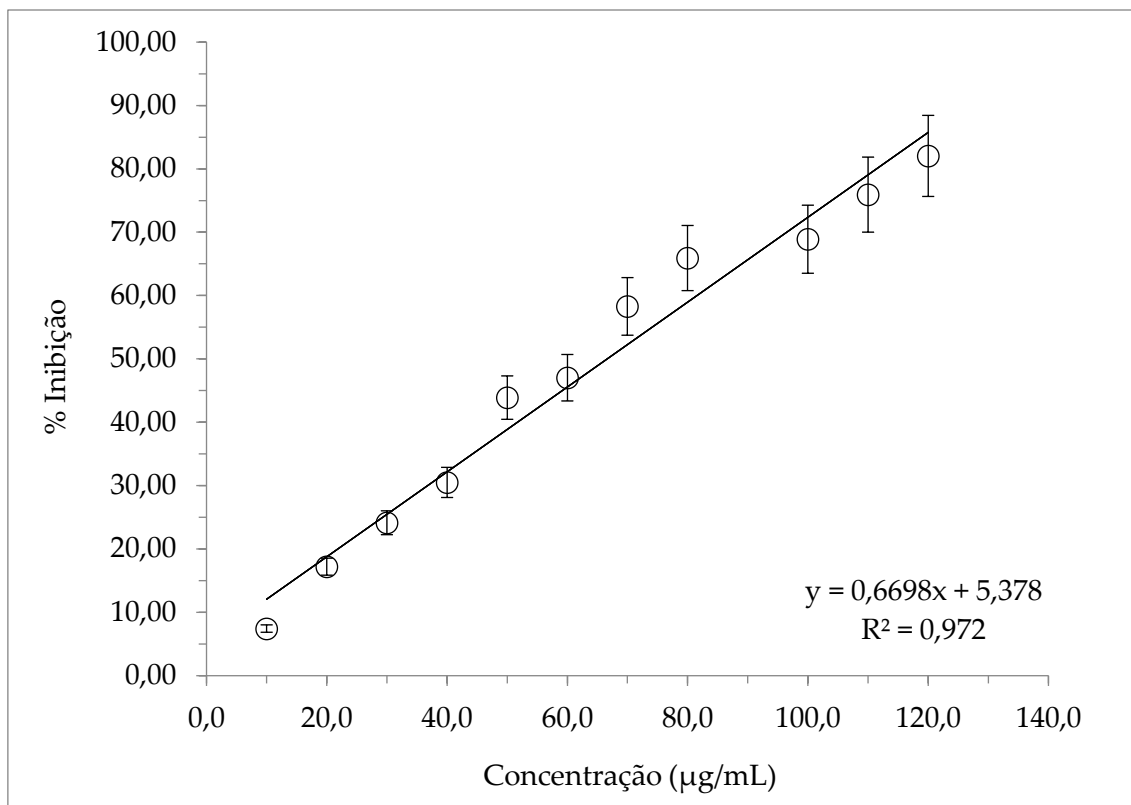


Figura 26 - Curva de calibração e sua reta para o trolox, o antioxidante usado, em 50% metanol com 50% etanol com 100 mM de DPPH.

Para a correlação da curva de calibração, demonstrada na figura anterior, não se recorreu aos últimos dois pontos apresentados na Tabela 49, do **Anexo C**, pelas razões descritas anteriormente.

Recorreu-se, de seguida, a uma análise de dados, nomeadamente, uma regressão ANOVA, sendo que esta está explicitada na tabela seguinte.

Tabela 15 - Parâmetros retirados da regressão ANOVA, através do método DPPH com 50% metanol e 50% etanol, para o antioxidante trolox.

Y=a+bX	
Ordenada na origem (a)	5,378 ± 6,17
Declive (b)	6,70E-01 ± 0,086
R quadrado	9,72E-01
Erro padrão da correlação (y/x)	4,423
Limite de deteção (LOD)	12,21 µg/ml
Limite de quantificação (LOQ)	40,70 µg/ml

Posteriormente, realizou-se a curva de calibração infra com a solução padrão de trolox, em 50%/50% (v/v) de etanol água. Destaca-se, que para a correlação desta se utilizou os primeiros oito pontos apresentados na Figura 50, disponível no **Anexo C**. Uma vez que, a partir daí, se verificou a existência de um patamar pelos restantes valores.

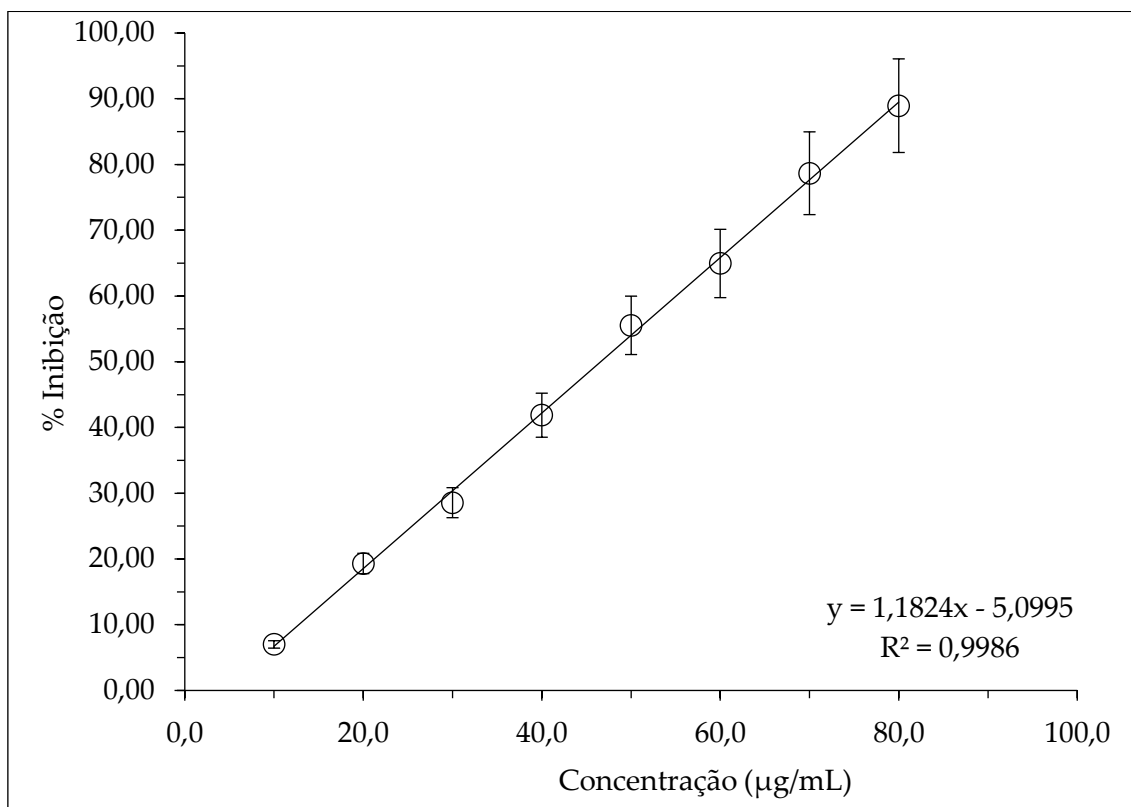


Figura 27 - Curva de calibração e sua reta de linearidade do trolox, o antioxidante usado, em 50% etanol com 50% água, em DPPH.

A análise de dados, através da ANOVA, permitiu obter os resultados da Tabela 16.

Tabela 16 - Parâmetros retirados da regressão ANOVA, através do método DPPH com 50% etanol e 50% água, para o antioxidante trolox.

Y=a+bX	
Ordenada na origem (a)	-5,100 ± 2,27
Declive (b)	1,18E+00 ± 0,045
R quadrado	9,99E-01
Erro padrão da correlação (y/x)	1,188
Limite de deteção (LOD)	2,35 µg/ml
Limite de quantificação (LOQ)	7,83 µg/ml

Na tabela seguinte encontram-se os valores de concentração para o IC₅₀, de acordo com os solventes utilizados, para a solução DPPH e onde, igualmente, foi preparado o padrão trolox.

Tabela 17 - IC₅₀ obtido para o trolox em diferentes solventes.

Solvente	IC₅₀ (µg/mL)
50% de etanol com 50% de água	46,60
50% de metanol com 50% de etanol	66,62
Metanol puro	65,50

Verificou-se, de acordo com a tabela anterior, que mediante o solvente utilizado, o valor IC₅₀ para o trolox apresenta variações, sendo, no entanto não significativas nos dois últimos casos.

Globalmente, constatou-se que as curvas elaboradas através do método redigido, no artigo Prevc et al. (Prevc et al., 2013), não exibiam uma razão linear. Consequentemente, ensaiaram-se curvas de calibração com outros solventes, nomeadamente, uma mistura de 50% de etanol com 50% água, 50% de metanol com 50% de etanol e metanol puro. Com estas três, conseguiram-se resultados razoáveis, tal como se constatou. No entanto, apesar do metanol ser o método mais clássico, acabou por ser excluído como solvente, devido à sua dificuldade em dissolver a amostra de óleo, não se conseguindo uma solução homogénea.

Entre as restantes curvas de calibração, selecionou-se a curva que apresenta como solvente uma solução de 50% metanol com 50% etanol, onde se

verificou ser mais eficaz a dissolução do extrato investigado, e onde o valor de IC₅₀ para o trolox é idêntico ao obtido com o metanol.

4.3.1.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH para as amostras

O método espectrofotométrico do radical livre DPPH quantificou a atividade antioxidante dos extratos obtidos nos ensaios delineados pelo programa Design Expert 11, em FFD (Fractional factorial designs).

Efetuararam-se as análises subsequentes para os óleos obtidos através da extração por Soxhlet e da extração supercrítica com CO₂, com concentrações na ordem dos 5000 a 6400 µg/mL, usando a curva de calibração em 50% de metanol e 50% de etanol.

Tabela 18 – Percentagem de inibição e equivalente em trolox para as amostras, obtidas através do método convencional e não convencional.

Amostra	Concentração de amostra (µg/mL)	% de Inibição	Equivalente em trolox (µg/mL)	Equivalente em trolox (µg/mg extrato)
A2	5000,0	6,32	1,41	0,28
A3	5833,3	5,23	-0,23	-0,04
A4	5900,0	7,96	3,86	0,65
A5	6400,0	7,78	3,58	0,56
A6	5000,0	2,61	-4,13	-0,83
A7	5037,0	3,89	-2,22	-0,44
A8	5000,0	6,05	1,00	0,20
A.B ET	6300,0	73,25	101,30	16,08
A.B HE	6200,0	6,15	1,15	0,19

Nota: A legenda “A.B ET” está associada ao extrato de etanol, e a “A.B HE” representa o extrato de hexano.

Na tabela anterior, verificou-se que os valores de inibição são relativamente baixos, com exceção do extrato obtido com etanol, em Soxhlet, apresentando então, um maior poder antioxidante e quantificável.

Quando se utiliza a curva de calibração efetuada com o trolox em (50/50)% de metanol/etanol, verifica-se que, com exceção do extrato A.B ET, os outros valores não têm significado atendendo aos parâmetros obtidos para a curva de calibração e em relação aos limites de deteção e quantificação.

O método de quantificação de DPPH demonstrou valores relativamente baixos face ao esperado nos extratos de SFE, pelo que, este não será aplicado a outros ensaios de extração. Contudo, efetuou-se ainda uma análise com o DPPH dissolvido em metanol puro, sendo que os extratos foram dissolvidos em metanol + etanol (M+E) ou metanol + isopropanol (M+I), (50/50)% com concentrações entre 10800 e 11600 µg/mL, conforme apresentado na tabela seguinte.

Tabela 19 - Percentagem de inibição e equivalente em trolox para as amostras, obtidas através do método não convencional, em metanol puro.

Amostra	Concentração de amostras (µg/mL)	% de Inibição	Equivalente em trolox (µg/mL)	Equivalente em trolox (µg/mg extrato)
A2 M+E	10800,0	10,03	17,71	1,64
A7 M+E	11600,0	5,00	11,69	1,01
A2 M+I	11600,0	9,88	17,54	1,51
A7 M+I	11400,0	4,35	10,92	0,96

Os resultados obtidos são igualmente baixos, por esse motivo, optou-se por não usar a técnica de DPPH nas amostras posteriores. No entanto, permitiu verificar a solubilidade dos extratos face aos solventes utilizados para os outros métodos de quantificação, o teor de polifenóis totais e o teor de flavonoides.

4.3.2. Determinação da quantidade de flavonoides

Para se definir o teor em flavonoides recorreu-se à curva de calibração da catequina, composto utilizado como referência. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 28 e Tabela 20.

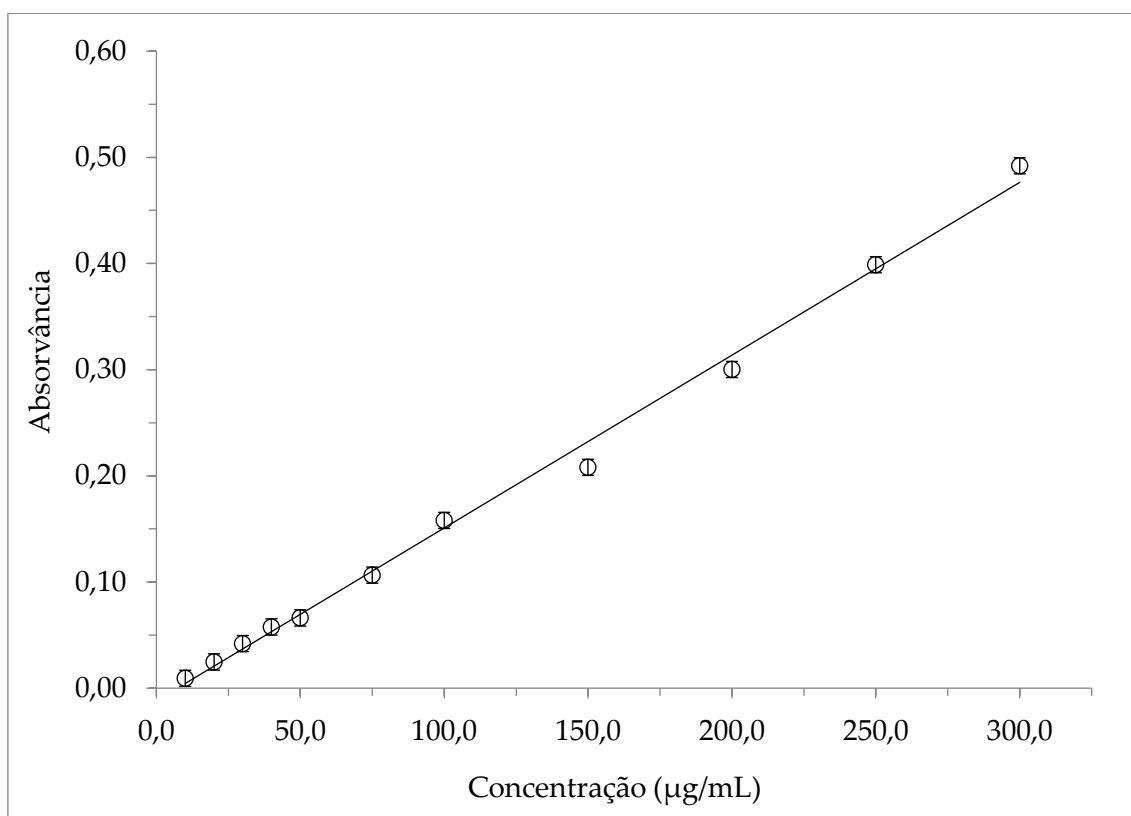


Figura 28 - Curva de calibração e regressão linear correspondente, usando como referência a catequina, para quantificação dos flavonoides.

Tabela 20 - Parâmetros retirados da regressão ANOVA, através do composto de referência da catequina, para quantificação dos flavonoides.

Y=a+bX	
Ordenada na origem (a)	-8,75E-03 ± 1,17E-02
Declive (b)	1,56E-03 ± 5,30E-05
R quadrado	9,97E-01
Erro padrão da correlação (y/x)	1,304E-02
Limite de detecção (LOD)	10,24 µg/ml
Limite de quantificação (LOQ)	34,13 µg/ml

Os resultados para as amostras são apresentados de uma forma global no capítulo infra (4.4).

4.3.3. Determinação dos polifenóis totais

Para a determinação do teor de polifenóis recorreu-se à curva de calibração do ácido gálico, composto usado como referência. Na Figura 29 e Tabela 21, apresentam-se os resultados obtidos.

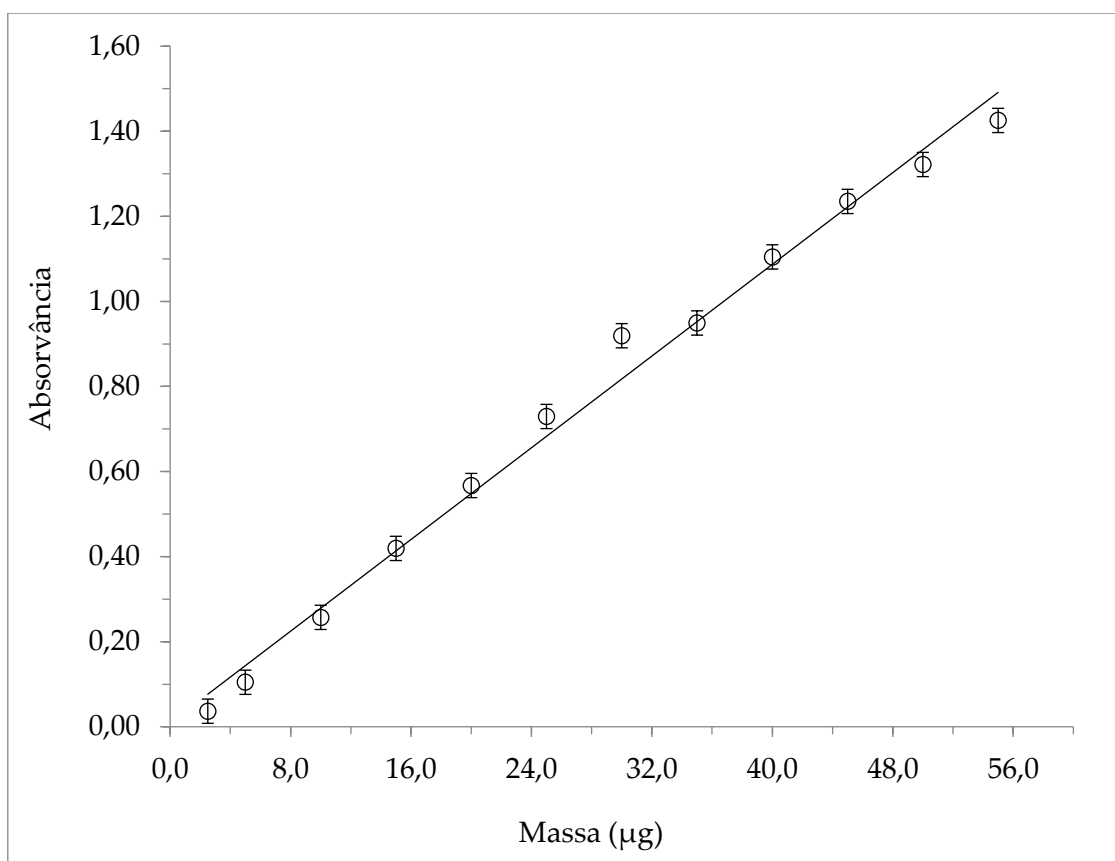


Figura 29 - Curva de calibração e regressão linear correspondente, usando como referência a ácido gálico, para os polifenóis totais.

Tabela 21 - Parâmetros retirados da regressão ANOVA, através do composto de referência do ácido gálico, para os polifenóis totais.

Y=a+bX	
Ordenada na origem (a)	9,01E-03 ± 1,80E-03
Declive (b)	1,70E-02 ± 5,86E-02
R quadrado	9,91E-01
Erro padrão da correlação (y/x)	4,047E-02
Limite de deteção (LOD)	2,92 µg
Limite de quantificação (LOQ)	9,75 µg

Os resultados para as amostras são apresentados de uma forma global no capítulo infra (4.4.).

4.4. Análise dos resultados da extração em Soxhlet e a extração supercrítica com CO₂, recorrendo ao desenho fatorial fracionário (FFD)

O estudo do FFD foi conduzido de forma a implementar um método científico que permita reduzir a variabilidade dos fatores, pressão, temperatura e caudal do fluido supercrítico (CO₂) nas respostas de rendimento, flavonoides e polifenóis totais.

Na tabela seguinte apresentam-se os rendimentos finais dos óleos obtidos mediante a razão percentual entre a massa total do óleo extraído e a massa introduzida na célula de extração, em conformidade com a Equação 37. Bem como, os valores para as respostas escolhidas.

Tabela 22 - Resultados planejados para o FFD, com os fatores das respectivas magnitudes, de forma a otimizar o desempenho de extração e respostas associadas.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (K)	Caudal (kg/min)	Rendimento (%)	Polifenóis ($\mu\text{mol EAG/g ext}$)	Flavonoides ($\mu\text{mol EC/g ext}$)
A.B HE	-	-	-	8,50	60,24 \pm 3,91	2092,19 \pm 78,97
A.B ET	-	-	-	4,51	139,38 \pm 9,08	647,49 \pm 66,64
A1*	25,0	313,15	2,7E-03	6,48	58,76 \pm 2,67	1538,99 \pm 97,96
A2*	40,0	353,15	0,9E-03	6,91	58,67 \pm 0,52	1547,83 \pm 78,21
A3*	25,0	313,15	0,9E-03	6,26	58,14 \pm 3,31	1765,87 \pm 29,90
A4*	40,0	313,15	0,9E-03	6,43	73,41 \pm 1,55	1863,10 \pm 124,90
A5*	40,0	313,15	2,7E-03	5,97	66,99 \pm 3,55	1902,88 \pm 105,60
A6*	25,0	353,15	0,9E-03	5,07	55,35 \pm 1,12	1314,32 \pm 79,87
A7*	25,0	353,15	2,7E-03	6,45	62,79 \pm 3,70	1536,78 \pm 174,03
A8*	40,0	353,15	2,7E-03	6,46	56,02 \pm 3,50	1670,11 \pm 81,74

* Os valores cumulativos registados dos respetivos ensaios localizam-se descritos no **Anexo B**.

Os gráficos referentes aos polifenóis totais e aos flavonoides encontram-se expostos no **Anexo D, para uma melhor compreensão dos resultados apresentados.

Nota: A legenda “A.B ET” está associada ao óleo obtido através da extração em Soxhlet, com o solvente etanol, e a “A.B HE” representa o óleo do solvente hexano.

Comparando os resultados com os obtidos em Soxhlet, com o solvente hexano, verifica-se que os valores de rendimento da extração em Soxhlet são superiores (8,81% e 8,32%), para um tempo de extração de 180 minutos. Contudo, para os minutos 45 (5,47%) e 90 (7,31%), regista-se valores mais comparáveis e da mesma ordem de grandeza, para os ensaios A5 (94,52 min) e A8 (48,58 min) bem como, para os valores cumulativos dos restantes, apresentados no **Anexo B**. Mediante os resultados analisados, confrontando os métodos, é vantajoso conseguir um rendimento superior para a extração supercrítica com o menor tempo estudado, 45 minutos.

Tanto o hexano como o CO₂ apresentam uma polaridade semelhante (apolares), conseguindo extrair a mesma quantidade de componentes apolares, sendo comparáveis em termos de trabalho realizado. Na comparação entre os extratos obtidos por Soxhlet, com o hexano, e por CO₂ supercrítico, quanto ao teor

de flavonoides e polifenóis totais, verifica-se que nas condições de pressão elevada e temperatura reduzida (40 MPa e 313,15k), os valores de flavonoides apresentam-se semelhantes aos obtidos por Soxhlet. Relativamente aos polifenóis totais, os valores conseguidos com o fluido supercrítico são superiores ou iguais aos do Soxhlet.

A extração supercrítica com CO₂ apresenta algumas vantagens, uma vez que, possui valores de flavonoides idênticos ao método em Soxhlet, com hexano, e é considerada uma “química verde”, promovendo produtos mais amigos do ambiente, com menor pegada ecológica. De salientar ainda que, o hexano obriga à realização de tratamentos adicionais no produto final para que este seja eliminado, uma vez que prejudica o ambiente por meio da sua toxicidade.

Por sua vez, o etanol apresenta uma maior polaridade comparativamente com os anteriores, conseguindo extrair componentes, essencialmente, mais polares. Assim, a utilização de um solvente polar após o hexano, demonstra que a quantidade de flavonoides extraída é menor, enquanto a quantidade de polifenóis demonstra ser significativa, apresentando potencialidades para um novo estudo num trabalho futuro.

Analisando os resultados das diferentes respostas para as diferentes condições e fatores, recorreu-se ao programa Design Expert 11, utilizando as ferramentas estatísticas disponíveis para se verificar a influência e a interação entre os fatores escolhidos. Foi usada a técnica estatística de análise de variância, designada por ANOVA, para a qual se vai considerar um nível de significância de 5%.

Começou-se por validar o modelo, mediante a avaliação dos seus termos (Standard error – erro padrão, Variance Inflation Factors, VIF – fator de inflação de variância, R² – coeficiente da correlação múltipla), do grau de liberdade (lack of fit – ajuste do modelo, pure error – erro) e das medidas da matriz (G Efficiency - Eficiência G).

Relativamente aos termos do modelo, aconselha-se que o erro padrão apresente valores o mais baixo possível, pois assim, são considerados melhores, e devem ser idênticos entre si (valor de 0,3536). Por sua vez, o fator de inflação de variância registou o valor ideal – 1,00 (este indica qual a percentagem da variância, ou seja, o erro padrão ao quadrado, que é aumentada para cada coeficiente). Consequentemente, o coeficiente de correlação múltipla foi um valor ideal, também – 0,00. Deste modo, demonstra-se a ortogonalidade do Planeamento Estatístico de Experiências, ou seja, possibilita o cálculo dos efeitos

dos fatores considerados mais relevantes e a interação entre si. Sendo que, neste caso, não existe multicolinearidade, não subsistindo nenhum relacionamento entre elas, isto é, são ortogonais.

De seguida, verificou-se o grau de liberdade associado ao modelo, indicando a falta de erro de ajuste deste, erro que ocorre quando a análise omite um ou mais termos ou fatores importantes do modelo do processo. Idealmente, o ajuste de modelo e o erro deveriam apresentar no mínimo, 3 e 4 graus de liberdade, respetivamente. Registou-se no ajuste de modelo 4 graus de liberdade, sendo considerado bom, no entanto, o erro assinalou 0, impossibilitando a validação através deste teste (lack of fit test).

No que concerne à Eficiência G, este obteve um valor de 100%. Sendo considerado muito bom.

O gráfico abaixo representa a superfície em 3D resultante do erro padrão relativo face a dois fatores, a saber:

- **A: Pressão (MPa)** - A pressão de extração;
- **B: Temperatura (K)** – A temperatura da célula de extração;

Nota: O caudal do fluido supercrítico (CO₂) apresenta um valor constante – 1,8E-03 kg/min. (**C: Caudal (kg/min)**).

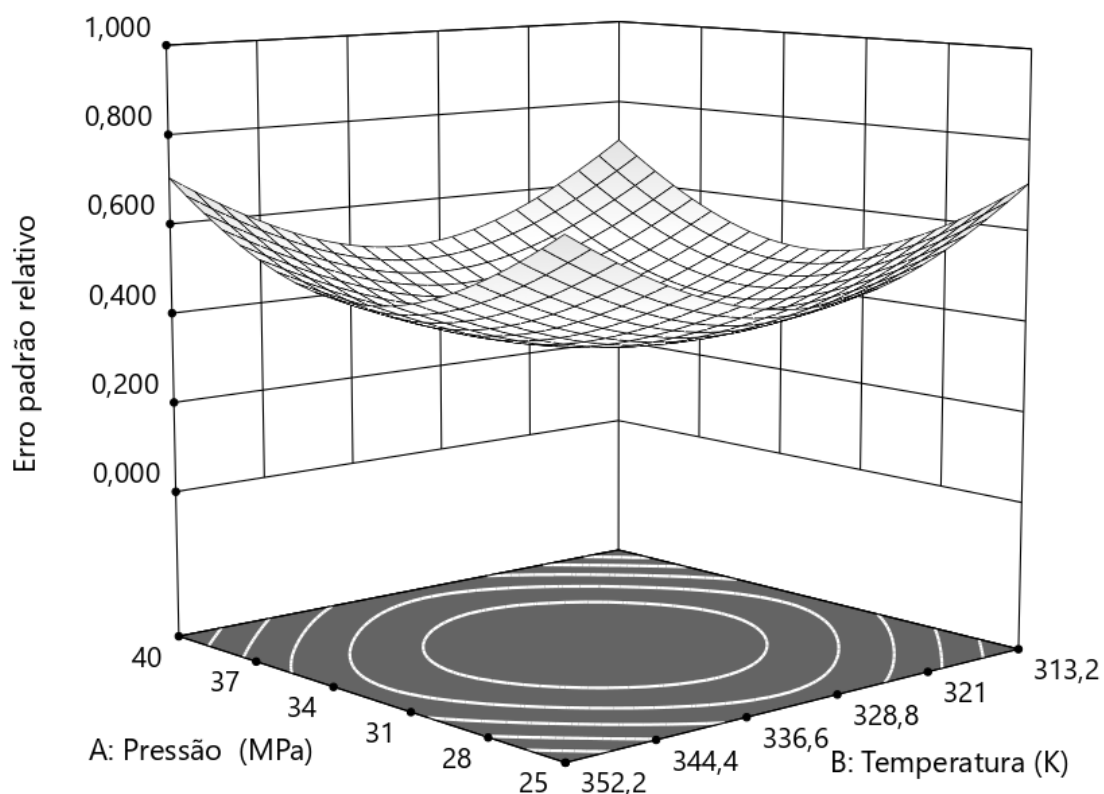


Figura 30 - Superfície obtida através do erro padrão relativo face a dois fatores da matriz FFD (A: Pressão - MPa e B: Temperatura - K), para um valor constante de caudal (1,8E-03 kg/min).

Observou-se o mesmo comportamento para os restantes gráficos de superfície em 3D, nas restantes interações dos fatores (AC - **A: Pressão (MPa)** com **C: Caudal (kg/min)** e BC - **B: Temperatura (K)** e **C: Caudal (kg/min)**).

A análise do modelo para os três fatores de resposta, rendimento, Y(%), flavonoides, ($\mu\text{mol EC/g ext}$) e quantidade total de polifenóis, TPC ($\mu\text{mol EAG/g ext}$), permitiu-nos obter as figuras seguintes, com os valores de coeficiente de determinação, R^2 , de 0,945, 0,921 e 0,996, respetivamente. Os valores previstos pelo modelo não se desviam muito dos valores reais, quanto maior for a proximidade entre os valores previstos e os valores reais, menor será o erro.

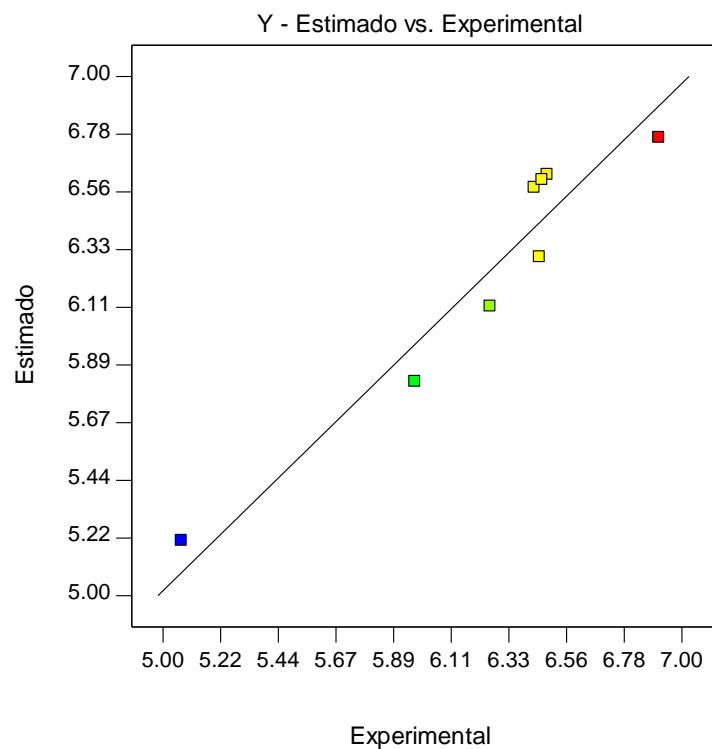


Figura 31 - Correlação entre os valores estimados (previstos) e experimentais para os valores de rendimento de óleo por extração supercrítica com CO₂, de acordo com as condições da Tabela 22.

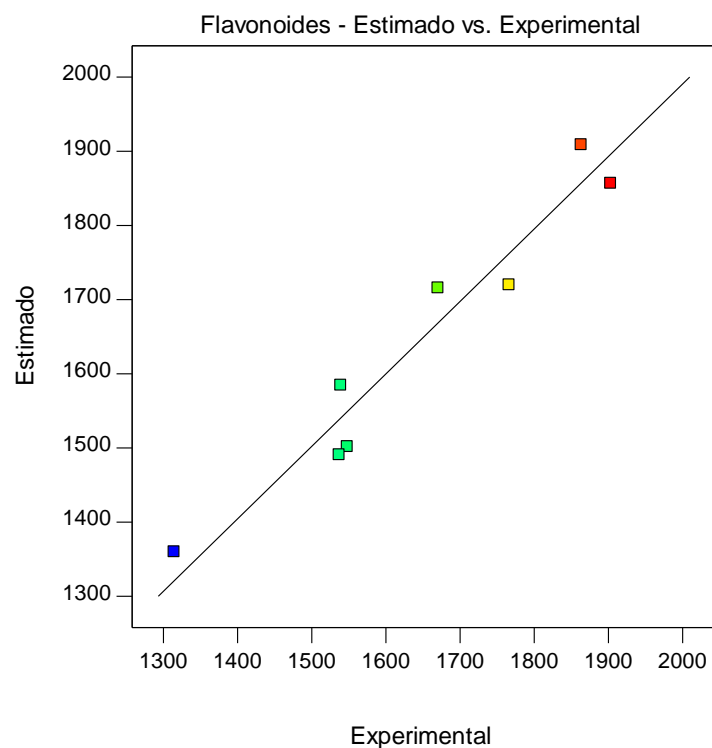


Figura 32 - Correlação entre os valores estimados (previstos) e experimentais para os valores de flavonoides no óleo por extração supercrítica com CO₂, de acordo com as condições da Tabela 22.

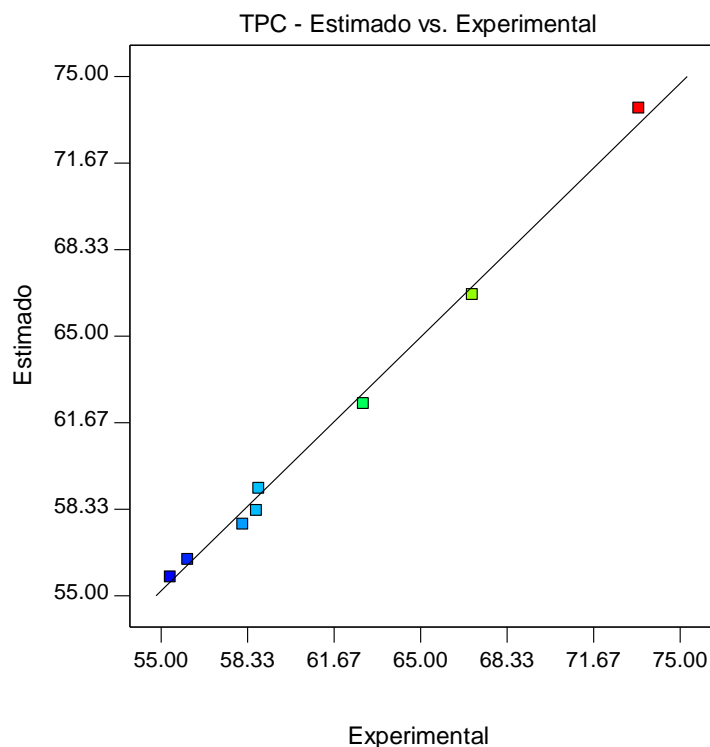


Figura 33 - Correlação entre os valores estimados (previstos) e experimentais para os valores de TPC no óleo por extração supercrítica com CO₂ e acordo com as condições da Tabela 22.

Contudo, considerando a análise ANOVA e os diversos parâmetros obtidos, verificou-se que, para um nível de significância de 5% (e até mesmo 10%), o modelo era não significativo. Por outro lado, todos os fatores analisados apresentavam valores superiores a $p > 0,050$, sendo que o valor das respostas que mais se afastava, para os flavonoides e TPC, foi o caudal de CO₂.

Ponderando os resultados obtidos através desta análise, não se considerou significativo efetuar uma análise mais exaustiva a este planejamento experimental.

Optou-se, de seguida, pelo desenho do composto central (CCD), com uma gama de **pressões** entre os 30 e 40 MPa, uma **temperatura** entre os 323,15 e os 353,15K e fixou-se o caudal de CO₂ num valor de 1,8E-03 kg/min.

4.5. Extração supercrítica com CO₂ do óleo do farelo de arroz através do desenho do composto central (CCD)

Nesta etapa reproduziu-se uma nova matriz de ensaios, através do método eficaz de ajuste de modelos de segunda ordem. Conseguindo um modelo

significativo e com bom ajuste, pôde-se analisar a relação entre as diversas variáveis explicativas, atingindo um resultado ótimo.

O desenho do composto central (CCD – Central Composite Design) representa-se através da resposta descrita pelo polinómio de segunda ordem, em conformidade com a seguinte equação (Daroz Gaudêncio et al., 2019; Almeida et al., 2018).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_{ii}x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii}x_i^2 + \sum_{i<j} \sum \beta_{ij}x_i x_j + \varepsilon \quad (39)$$

Em que Y traduz a resposta desejada, k simboliza o número de variáveis independentes, β os coeficientes determinados, x representa os parâmetros e ε o termo de erro correspondente.

Para o desenho dos compostos centrais (CCD – Central Composite Design) também se consideraram, as mesmas variáveis de resposta:

- **Resposta 1: Rendimento (%)** – O rendimento obtido no processo de extração supercrítica com CO₂;
- **Resposta 2: Polifenóis (µmol EAG/g ext)** – A quantidade total de polifenóis nos óleos de acordo com o método de *Folin-Ciocalteu*;
- **Resposta 3: Flavonoides (µmol EC/g ext)** – A quantidade total de flavonoides nos óleos de acordo com o método de cloreto de alumínio.

Assim, este procedimento experimental efetuou-se em 11 ensaios, numa gama de **pressões** entre os 300 e 400 bar (30 - 40 MPa), com uma **temperatura** entre os 50 e os 80°C (323,15 – 353,15K) e um **caudal** constante a 1,0 L/minuto (1,8E-03 kg/min). Escolheram-se estes intervalos de valores (de pressão e temperatura), mediante a análise dos resultados obtidos através do desenho fatorial fracionário (FFD). O procedimento executado nestes ensaios, encontra-se descrito no subcapítulo supra (4.2.).

Os gráficos abaixo traduzem o rendimento obtido versus tempo de extração, para as diversas combinações de pressão e temperatura utilizadas nas extrações supercríticas com CO₂. Agruparam-se os ensaios, para comparação, de acordo com valores constantes de temperatura a 338,15K, ou pressão a 35 MPa.

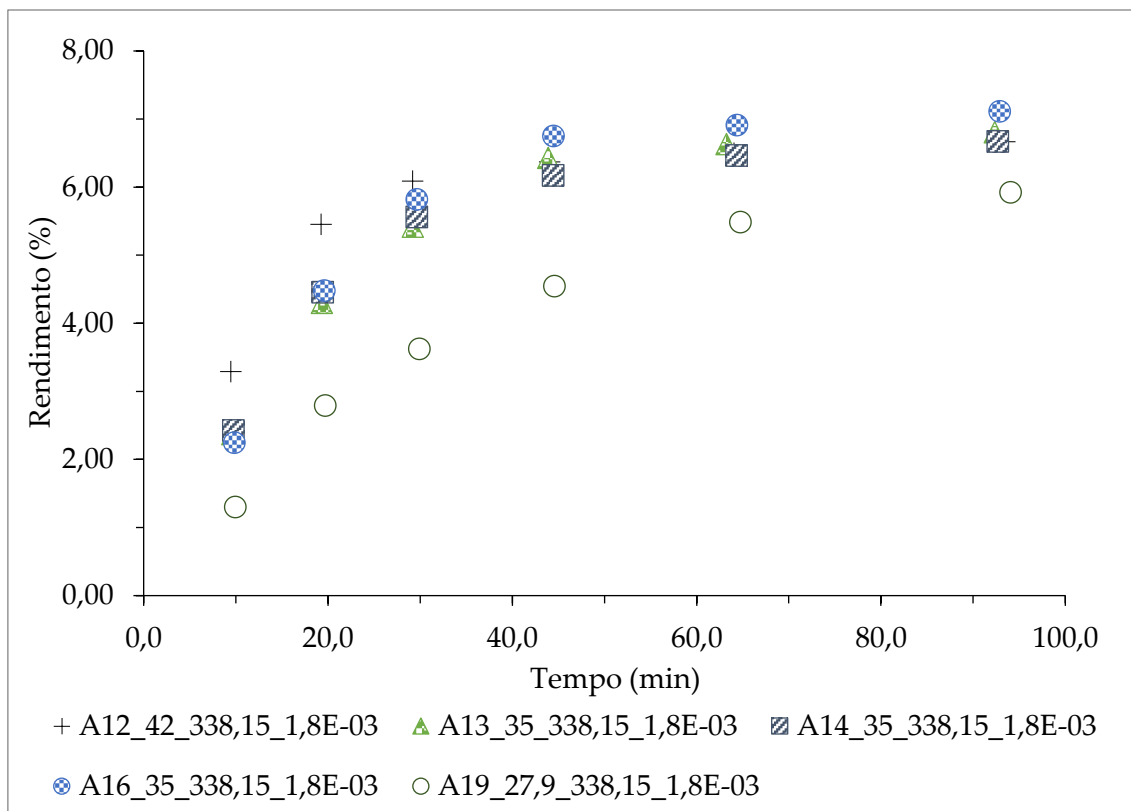


Figura 34 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma temperatura de 338,15K.

Observando a Figura 34, constata-se que as tendências dos ensaios se comportam de forma semelhante, à exceção do ensaio A19 a 27,9 MPa, cujo valor máximo de rendimento é atingido ao minuto 90. Para a pressão superior, 42 MPa, verifica-se que o valor máximo do ensaio A12 para o rendimento é próximo ao minuto 30, atingindo um valor de 95,56% de óleo extraído aos 45 minutos. Para os restantes ensaios, verificou-se a existência do máximo de extração para valores de tempo semelhantes, 45 minutos (92-95% de óleo retirado na extração). Assim, uma maior pressão promove a extração de uma maior quantidade de óleo num curto período (60 minutos), quando comparado com a extração em Soxhlet, e conseqüentemente, atinge-se mais rapidamente o ponto máximo da extração.

A análise do rendimento da extração permite verificar que, para uma mesma temperatura de 338,15K, existe um incremento no rendimento de 5,93% (ensaio A19) para 7,12% (ensaio A16), quando se aumentou a pressão de 27,9 MPa para 35 MPa, no entanto, para uma pressão de 42 MPa, esse aumento não sucede, registrando-se inclusive um ligeiro decréscimo no rendimento, 6,67% (ensaio A12).

Na figura seguinte é analisada a influência da temperatura para uma pressão de 35 MPa no rendimento do processo. Verifica-se que todos os ensaios apresentam comportamento semelhante, exibindo um maior crescimento até atingir o máximo de rendimento, aproximadamente ao minuto 45. Coincidindo com o descrito na Tabela 51, no **Anexo E**, onde a percentagem de extração conseguida neste tempo, se encontra dentro do intervalo de 91 a 95%. Os rendimentos finais obtidos são semelhantes, assim como a cinética do processo tendendo para o valor máximo de $6,76 \pm 0,30\%$.

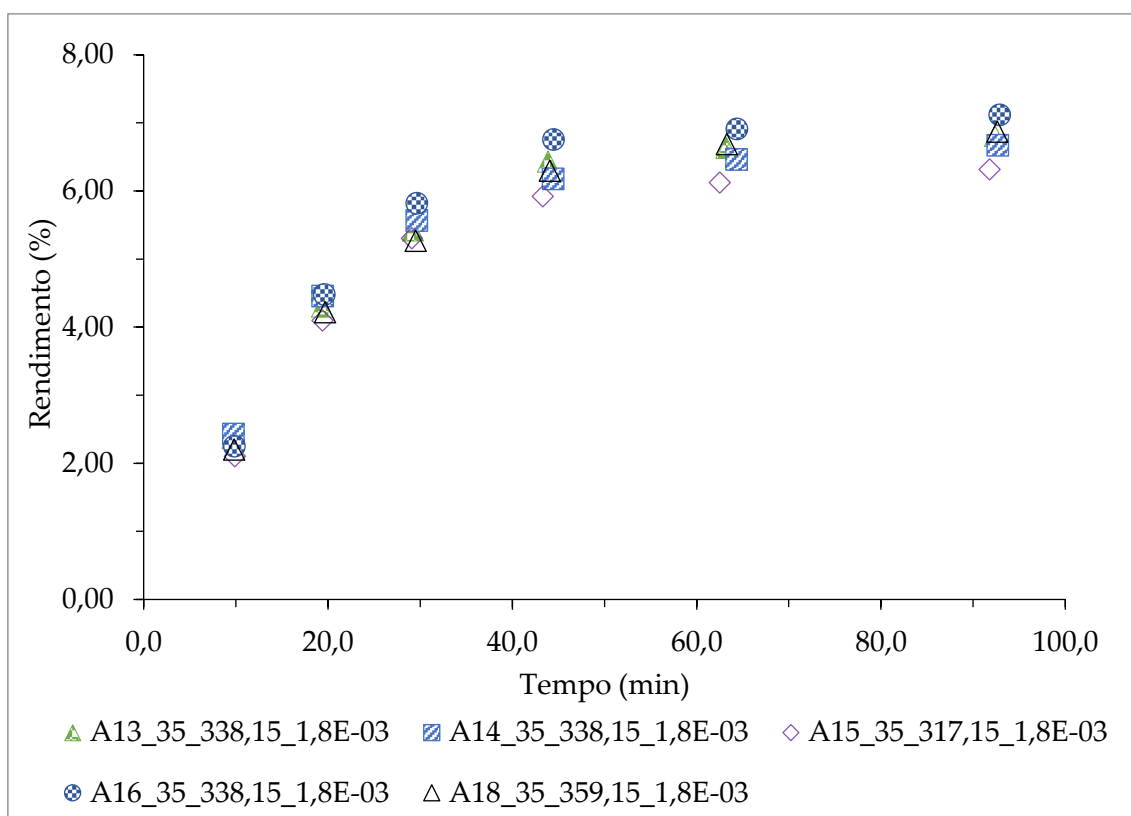


Figura 35 - Rendimento do óleo do farelo de arroz através da extração supercrítica, em função do tempo, para uma pressão de 35 MPa.

Na tabela seguinte encontram-se os resultados globais para os fatores impostos e respetivas respostas para os ensaios delineados, submetidos a caudal constante ($1,8E-03$ kg/minuto).

Tabela 23 - Resultados planejados para o CCD, com os fatores das respectivas magnitudes, de forma a otimizar o desempenho de extração e respostas associadas.

Ensaio*	Pressão (MPa)	Temperatura (K)	Rendimento (%)	Polifenóis (μmol EAG/g ext)	Flavonoides (μmol EC/g ext)
A9	30,0	323,15	5,72	59,98 ± 1,99	1537,24 ± 129,38
A10	40,0	323,15	6,50	62,21 ± 2,58	1565,42 ± 73,94
A11	30,0	353,15	6,57	53,38 ± 3,03	1636,68 ± 77,85
A12	42,0	338,15	6,67	60,04 ± 2,12	1707,95 ± 24,58
A13	35,0	338,15	6,81	68,58 ± 0,84	1641,84 ± 194,11
A14	35,0	338,15	6,67	65,89 ± 1,95	1631,53 ± 116,81
A15	35,0	317,15	6,32	63,27 ± 1,99	1907,39 ± 4,52
A16	35,0	338,15	7,12	60,78 ± 0,96	1831,15 ± 254,14
A17	40,0	353,15	6,91	54,98 ± 2,37	1683,09 ± 155,90
A18	35,0	359,15	6,87	63,01 ± 1,71	1751,05 ± 121,03
A19	27,9	338,15	5,93	61,97 ± 2,04	1771,49 ± 128,09

* Os valores cumulativos registados dos respetivos ensaios localizam-se descritos no Anexo B.

Constatou-se o melhor rendimento para uma pressão de 35 MPa, não se justificando aumentar acima deste valor, uma vez que, o rendimento não acompanha o crescimento da pressão.

De acordo com os dados apresentados por Sookwong e Mahatheeranont, para a extração supercrítica com CO₂, a 35 MPa e 313,15K, num período de 4 horas, verificou-se um rendimento de 17,5%. Com condições semelhantes, o ensaio A15 (35 MPa e 317,15K), alcançou um rendimento de 6,32% (Sookwong & Mahatheeranont, 2017). Por sua vez, Chen et al. registou um rendimento de 15,7%, em 8 horas, com dióxido de carbono supercrítico a 30 MPa e 313,15K. O ensaio A9, executado nas condições de 30 MPa com 323,15K, sendo o que mais se assemelha ao estudo, conseguiu um rendimento de 5,72% (Chen et al., 2008). Mediante as condições de 40 MPa e 333,15K da extração supercrítica com CO₂, Walter et al. obteve um rendimento de 18,5% e Yoon et al. cerca de 18%. Comparando com os ensaios A10 (40 MPa e 323,15K) e A12 (42 MPa e 338,15K) apresentaram rendimentos de 6,50% e de 6,67%, respetivamente (Bitencourt et al., 2016).

Os resultados conseguidos, nesta dissertação, revelam-se inferiores aos indicados pela literatura, tal pode ser justificado pela quantidade diferente de óleo disponível em cada variedade de farelo. Deve-se, também, ter em consideração a % de eficácia de extração do óleo presente no farelo de arroz, face ao extraído com o hexano (7,31%, ao minuto 90), que se apresenta entre 85 e 97%.

Procedeu-se à validação do modelo, apresentando-se na figura seguinte a superfície em 3D resultante do erro padrão relativo face a dois fatores, a saber:

- **A: Pressão (MPa)** - A pressão de extração;
- **B: Temperatura (K)** - A temperatura da célula de extração;

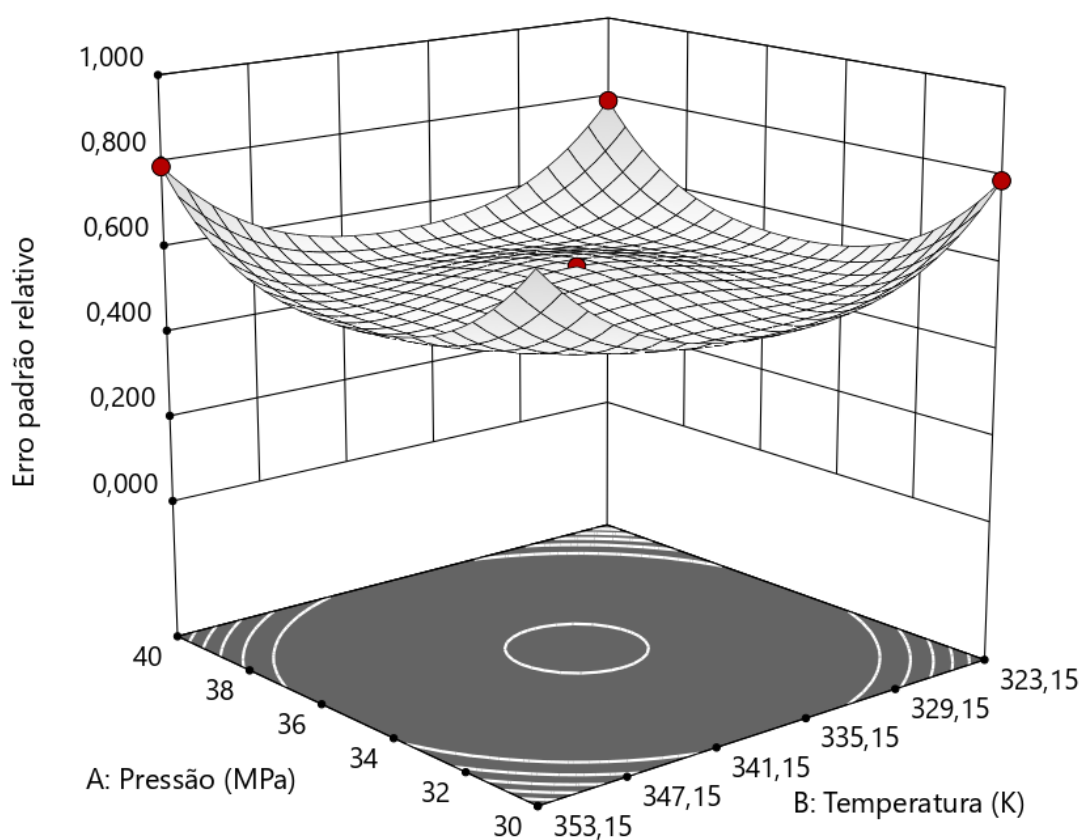


Figura 36 - Superfície obtida através do erro padrão relativo face a dois fatores da matriz CCD (A: Pressão - MPa e B: Temperatura - K).

No que concerne à Eficiência G, este obteve um valor de 87,27%, sendo considerado bom. Este valor manifesta uma tendência de redução quando se realizam repetições, neste caso efetuou-se a análise do ponto central três vezes.

A influência das variáveis independentes, pressão e temperatura, nas variáveis de resposta, apresentam comportamento diferentes, de acordo com, a

mesma. Sendo, no entanto, os modelos propostos todos significativos, mediante o software estatístico, Design Expert 11 (DX11) para as respostas analisadas.

A tabela seguinte apresenta os resultados obtidos através da análise ANOVA, referente à variável de resposta - rendimento.

Tabela 24 - Resultados da ANOVA para o desenho selecionado, CCD. Modelo de regressão estimado da relação entre uma variável de resposta e variáveis independentes.

Rendimento, Y (%)					
Fonte	^aDF	^bSS	^cMS	F-valor	p-valor
Modelo	5	1,6000	0,3206	15,32	0,0047
A-Pressão	1	0,5867	0,5867	28,04	0,0032
B-Temperatura	1	0,5191	0,5191	24,81	0,0042
AB	1	0,0484	0,0484	2,31	0,1888
A²	1	0,4342	0,4342	20,75	0,0061
B²	1	0,0951	0,0951	4,55	0,0862
Resíduo	5	0,1046	0,0209		
^d VIF	3	0,0307	0,0102	0,2775	0,8406
Erro	2	0,0739	0,0369	-	-
Total	10	1,71			

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de Liberdade; ^c Variância; ^d Valor de Inflação da Variância

De acordo com o valor de significância estabelecido (5%) todos os valores com $p < 0,0500$ são significativos. Da análise da tabela, verifica-se que os valores de p, para o modelo são significativos, e por outro lado, o valor de VIF não é significativo relativo ao Erro, existindo uma probabilidade de 84,06% de que uma falha de valor F, que possa ocorrer devido ao ruído, sendo esta combinação desejável para o modelo.

Verifica-se ainda, de acordo com o valor de p, que os valores de A – Pressão, B – Temperatura e A² – Pressão² são os termos mais significativos para o modelo.

Relativamente ao valor de R², sendo 0,9387, pressupõe que a eficiência da extração supercrítica com CO₂ seja de 93,87% sendo concedida às variáveis independentes, e por sua vez, 6,13% representa possíveis variações sem explicação, dadas pelo modelo sugerido. O valor de R² evidencia uma boa correlação com o valor ajustado de R² (0,8775), em que ambos não se diferenciam significativamente, dado que a diferença entre os mesmos é inferior a 0,2. Por outro lado, o valor ajustado de R² também denota uma boa correlação com o valor predito de R² (0,7746). Obtendo deste modo, bons indícios para se validar o modelo proposto, assim como um valor de R² >0,80 (80%) (Chen et al., 2012; Karazhiyan et al., 2011).

Apurou-se um coeficiente de variação (C.V.%) de 2,21 e mediu-se a relação sinal-ruído através da precisão adequada (*Adequate Precision*), sendo esta de 10,702, considerando-se um sinal adequado (ideal >4). Resultando num modelo confiável e reprodutível (Chen et al., 2012; Karazhiyan et al., 2011) consegue-se utilizar este, de forma a implementar o projeto de espaço com o intuito de se encontrar a resposta ótima.

A equação seguinte efetua previsões baseadas nas respostas introduzidas com a finalidade de se definir níveis para cada fator, com base nos fatores de codificação (-1 e 1 equivalem aos níveis menores e maiores dos mesmos, respetivamente).

$$\begin{aligned} \text{Rendimento (\%)} & & (40) \\ &= 6,84 + 0,27 \times A + 0,25 \times B - 0,11 \times AB \\ &\quad - 0,28 \times A^2 - 0,13 \times B^2 \end{aligned}$$

A Equação 40, sendo codificada, permite reconhecer a importância que cada fator possa desempenhar, comparando os coeficientes destes entre si.

Também foi possível elaborar uma equação em conformidade com os fatores atuais, a Equação 41:

$$\begin{aligned}
 \text{Rendimento (\%)} & & (41) \\
 &= -97,70 + 1,33 \times \text{Press\~{a}o} \\
 &+ 0,46 \times \text{Temperatura} \\
 &- 0,0015 \times (\text{Press\~{a}o} \times \text{Temperatura}) \\
 &- 0,011 \times \text{Press\~{a}o}^2 \\
 &- 0,00058 \times \text{Temperatura}^2
 \end{aligned}$$

Nota: Os termos AB – Press\~{a}o × Temperatura, B² – Temperatura² demonstraram ser pouco significativos.

Aplicando-se a equa\~{c}\~{a}o resultante da an\~{a}lise ANOVA, conseguiu-se desenhar o gr\~{a}fico do modelo para a vari\~{a}vel de resposta: rendimento (%), numa superf\~{i}cie 3D, sendo este apresentado na figura seguinte.

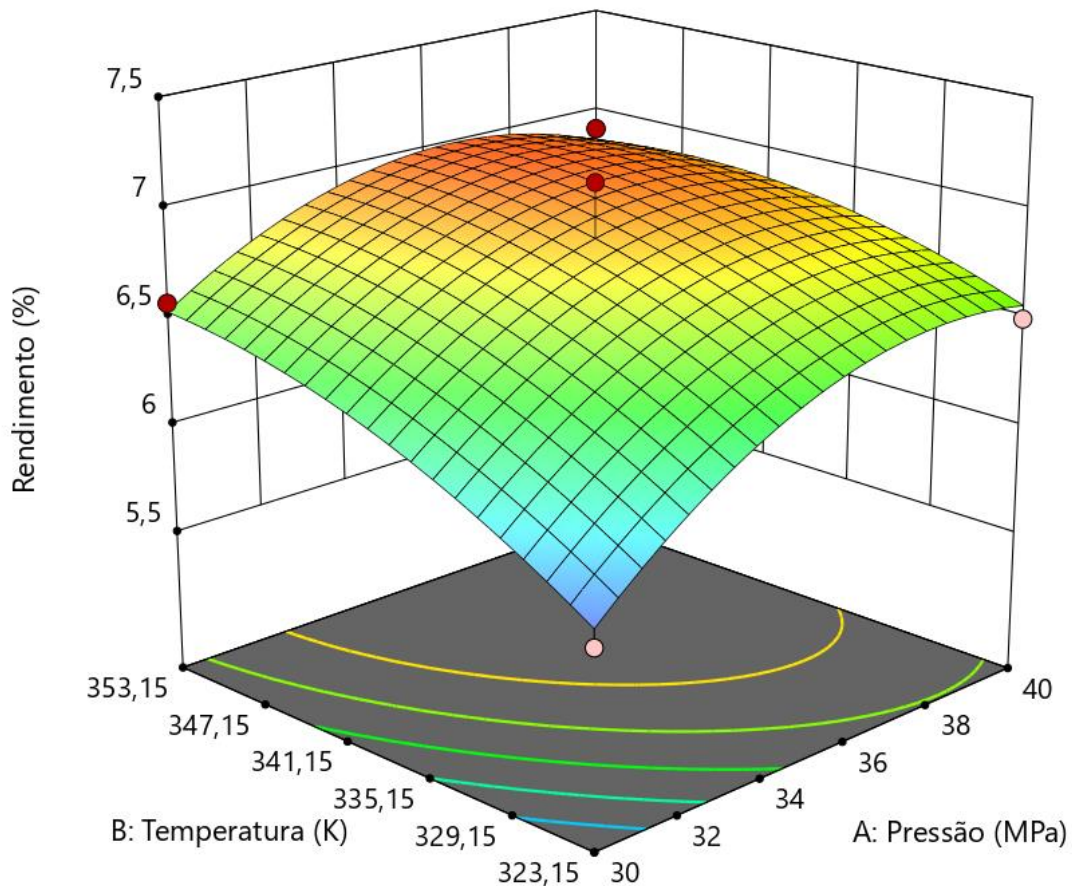


Figura 37 - Superf\~{i}cie obtida atrav\~{e}s do rendimento (%) face a dois fatores da matriz CCD (A: Press\~{a}o - MPa e B: Temperatura - K).

Com base na Figura 37, constatou-se que as zonas, vermelha e laranja, representam um rendimento mais elevado, conseq\~{u}ente da combina\~{c}\~{a}o de

pressões e temperaturas mais elevadas. Verifica-se que, sensivelmente, para temperaturas acima de 335K e pressões de 34 MPa, rendimentos máximos são alcançados no processo, como é notório, igualmente nas curvas de superfície. Comparativamente, às zonas, azul e verde, que refletem um rendimento inferior, por meio de pressões e temperaturas mais reduzidas.

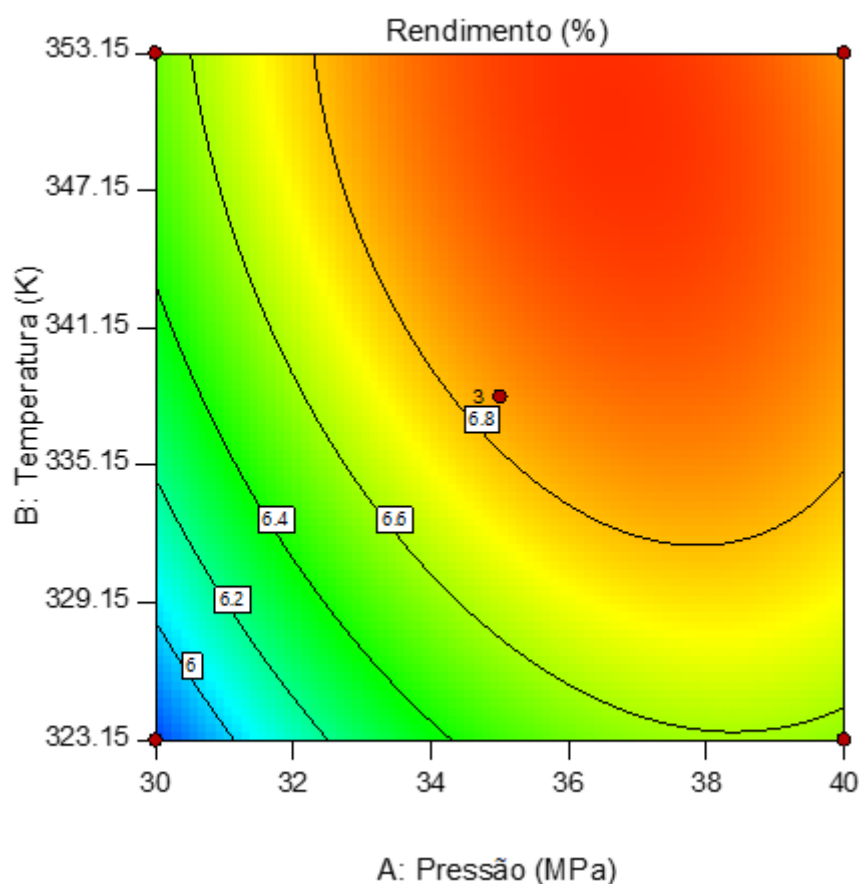


Figura 38 - Curvas de superfície obtidas pelo modelo polinomial quadrático para o rendimento do óleo obtido na extração supercrítica em função das variáveis independentes, temperatura e pressão.

Pode-se, ainda, apresentar e verificar os valores estimados (previstos) em função dos experimentais, Figura 39, e os pressupostos da análise de variância para a probabilidade normal de resíduos na Figura 40, que apresentam todos os requisitos necessários, para se garantir um bom modelo.

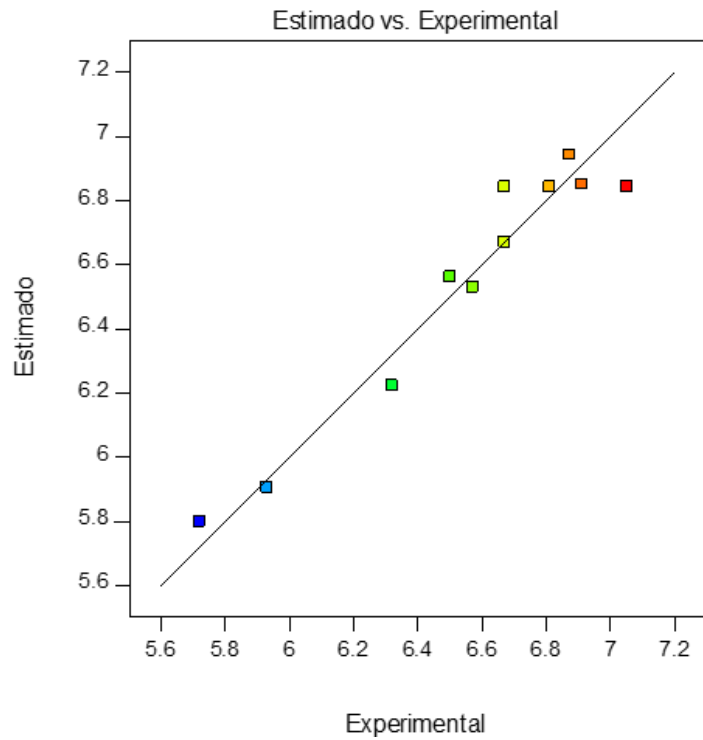


Figura 39 - Correlações obtidas entre os valores de rendimento previstos e experimentais.

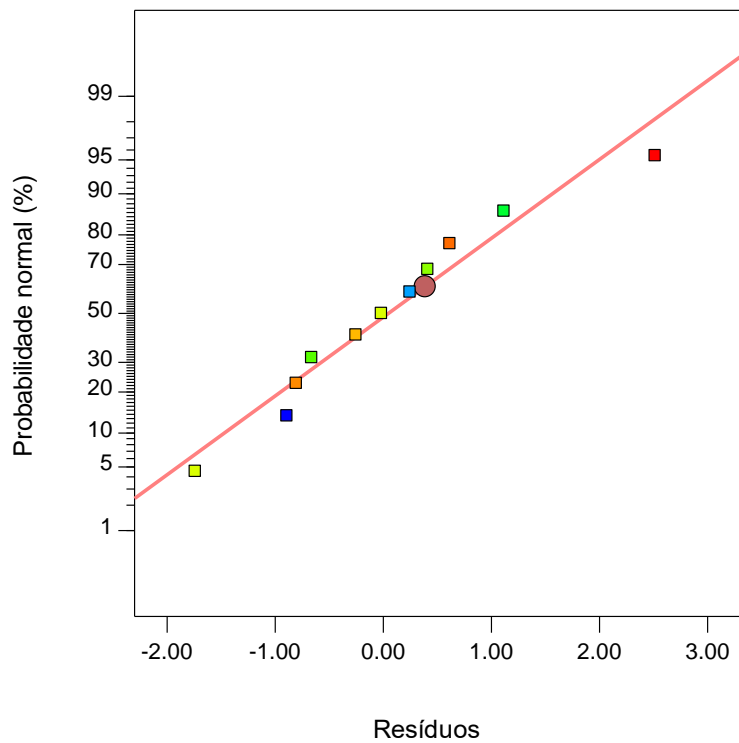


Figura 40 - Verificação do pressuposto da análise de variância para a probabilidade normal de resíduos, para a resposta: rendimento (%).

Relativamente aos flavonoides e polifenóis totais nos óleos, a influência da pressão e temperatura é muito mais simples, não implicando uma análise exaustiva de parâmetros estatísticos. Após uma breve análise da Tabela 23, verifica-se que os valores obtidos para estas duas respostas são muito semelhantes dentro do desvio padrão correspondente. Essa realidade reflete-se na análise ANOVA para as respostas, flavonoides e TPC, em que o modelo que melhor descreve a sua variação com a pressão e temperatura é, efetivamente, um valor médio, dado pelas Equações 42 e 43, respetivamente:

$$\text{Flavonoides} = 1696,80 \quad (42)$$

$$\text{TPC} = 61,28 \quad (43)$$

É possível verificar que os resíduos são normalmente distribuídos, Figuras 41 e 42, não existindo indícios de observações com tendências nem de afastamento à normalidade, uma vez que os valores dos resíduos estão uniformemente dispostos sobre a reta, para ambas as respostas.

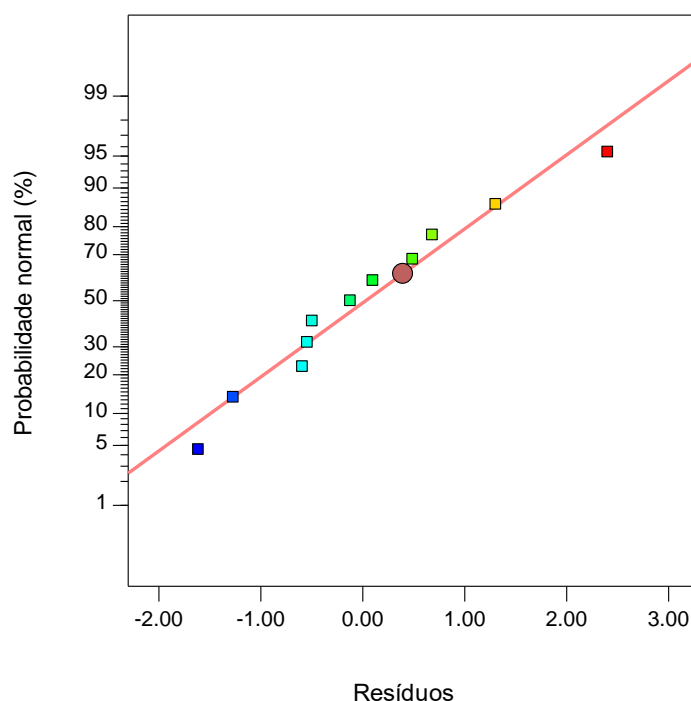


Figura 41 - Verificação do pressuposto da análise de variância para a probabilidade normal de resíduos, para a resposta: flavonoides ($\mu\text{mol EC/g ext}$).

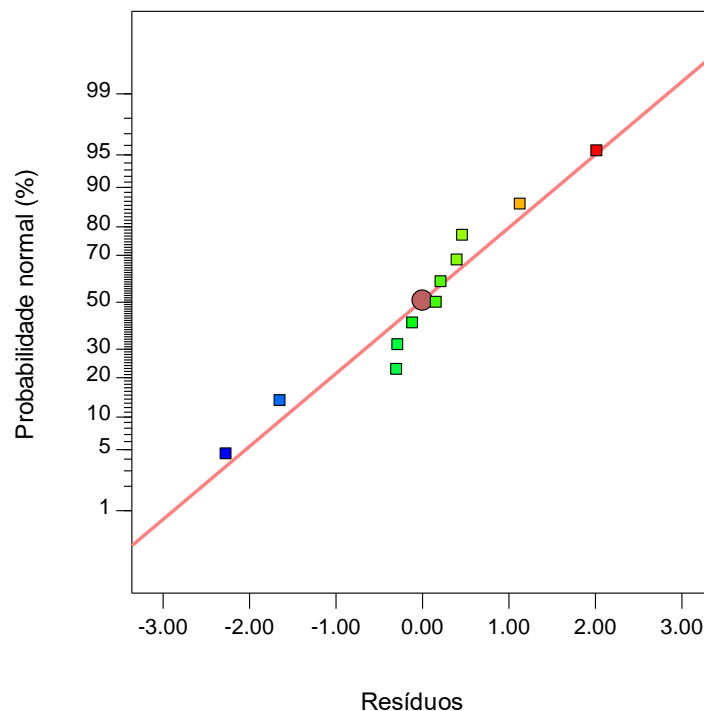


Figura 42 - Verificação do pressuposto da análise de variância para a probabilidade normal de resíduos, para a resposta: TPC - polifenóis totais ($\mu\text{mol EAG/g ext}$).

O desenho dos compostos centrais (CCD – Central Composite Design) para otimizar os dois fatores mais relevantes, previamente determinados, sugeriu como ponto central, um valor de pressão de 35 MPa e de temperatura igual a 338,15K.

Analisando os resultados alcançados, o modelo conseguiu prever que o ponto ideal seria de uma pressão a 35 MPa com uma temperatura de 338,15K, cujos valores dos fatores de resposta seriam 6,84% de rendimento, 1696,8 $\mu\text{mol EC/g ext}$ de flavonoides e 61,28 $\mu\text{mol EAG/g ext}$ de teor em polifenóis.

4.6. Modelação Matemática da transferência de massa

4.6.1. Modelação do processo de obtenção dos óleos do farelo de arroz

Realizou-se a modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais da extração supercrítica com CO₂, através dos métodos fundamentados no sistema de fluxo pistão (modelo I- Sovová 1994 e modelo II- Sovová 2005) e do método de dessorção em condições supercríticas (modelo III- Tan e Liou 1989). Todos os resultados experimentais obtidos a partir do planeamento FFD ou CCD foram analisados.

O modelo I, Sovová 1994, considerou a existência de dois processos de transferência de massa, sendo um processo controlado por meio da fase sólida (k_s) e o outro por meio da fase fluida (k_f). Posteriormente, o modelo II, Sovová 2005, assumiu a junção dos dois processos anteriores, pelo que o k_s inclui k_f . Por sua vez, o modelo III, Tan e Liou 1989, utilizou um parâmetro único (k_i) assumindo uma cinética de dessorção linear, com recurso à expressão de Arrhenius.

Na tabela seguinte apresentam-se os resultados obtidos para a modelação matemática da extração supercrítica com CO₂ do óleo de farelo de arroz, mediante os três métodos analisados, em concreto, o de Tan e Liou 1989, o de Sovová 1994 e o de Sovová 2005, referindo os respetivos coeficientes de transferência de massa, interno e externo, e o correspondente desvio padrão (%), indicando o erro associado entre os resultados experimentais e os calculados pelo respetivo modelo. São também dispostos, a velocidade linear (u) e a densidade (ρ) do fluido supercrítico, a concentração da fase fluida de equilíbrio (C_o), os números adimensionais característicos de um processo de transferência de massa através da convecção forçada, nomeadamente, o número de Reynolds (Re), o número de Schmidt (Sc) e o número de Sherwood (Sh), o coeficiente de difusão de Wilke-Chang e a correlação de Wakao e Kaguei (1982).

Tabela 25 - Resultados obtidos através da modelação matemática e coeficientes de transferência de massa para a extração supercrítica do óleo do farelo de arroz.

Ensaio	P (MPa)	T (K)	Caudal f (kg/s)	V _{linear} u (m.s ⁻¹)	Densidade r (kg.m ⁻³)	C _o (kg/kg)*10 ²	Tan e Liou 1989 k _i x10 ⁸ (m.s ⁻¹)	Sovová 1994 k _s x10 ⁸ (m.s ⁻¹) / k _i x10 ⁶ (m.s ⁻¹)	Sovová 2005 k _s x10 ⁸ (m.s ⁻¹)	Re	Sc	Sh	D ₁₂ (m ² .s ⁻¹)	k _f x10 ⁶ (m.s ⁻¹)
A1 (FFD)	25,0	313,15	4,49E-05	3,32E-04	879,49	1,30	4,126 (8,98%)	0,609 / 0,201 (3,42%)	1,87 (3,86%)	10,11	34,29	8,33	2,872E-09	7,971E-06
A3 (FFD)	25,0	313,15	1,62E-05	1,19E-04	879,49	1,30	1,142 (10,74%)	0,0432 / 0,0876 (5,52%)	0,444 (3,26%)	3,62	34,29	3,55	2,872E-09	3,401E-06
A6 (FFD)	25,0	353,15	1,58E-05	1,49E-04	686,22	0,60	0,564 (6,76%)	0,0376 / 0,0924 (10,5%)	0,444 (3,24%)	5,47	16,30	3,91	5,008E-09	6,534E-06
A7 (FFD)	25,0	353,15	4,57E-05	4,32E-04	686,22	0,60	1,476 (7,97%)	0,0942 / 0,230 (7,82%)	0,790 (4,41%)	15,87	16,30	9,47	5,008E-09	1,581E-05
A19 (CCD)	27,9	338,15	3,08E-05	2,53E-04	791,01	1,10	2,540 (4,77%)	0,492 / 0,188 (4,40%)	2,85 (2,21%)	8,55	23,20	6,37	3,826E-09	8,120E-06
A9 (CCD)	30,0	323,15	3,12E-05	2,33E-04	870,43	1,60	3,255 (8,97%)	0,304 / 0,155(1,56%)	1,49 (4,59%)	7,18	32,14	6,13	3,029E-09	6,193E-06
A11 (CCD)	30,0	353,15	3,08E-05	2,69E-04	745,6	1,20	3,032 (6,00%)	1,099 / 0,196 (4,87%)	3,94 (1,24%)	9,43	19,47	6,52	4,397E-09	9,551E-06
A13 (CCD)	35,0	338,15	3,12E-05	2,40E-04	844,57	2,20	4,631 (5,12%)	1,572 / 0,137 (2,87%)	4,66 (2,63%)	7,62	28,04	6,16	3,37E-09	6,92E-06
A14 (CCD)	35,0	338,15	3,09E-05	2,38E-04	844,57	2,20	4,815 (7,62%)	1,627 / 0,126 (3,13%)	4,60 (3,69%)	7,56	28,04	6,12	3,368E-09	6,870E-06
A16 (CCD)	35,0	338,15	3,11E-05	2,40E-04	844,57	2,20	4,911 (6,27%)	1,711 / 0,134 (3,77%)	4,48 (4,77%)	7,62	28,04	6,16	3,368E-09	6,918E-06
A15 (CCD)	35,0	317,15	3,15E-05	2,22E-04	920,68	2,00	4,032 (8,30%)	0,948 / 0,117 (1,90%)	2,40 (4,13%)	6,35	40,21	5,96	2,609E-09	5,185E-06
A18 (CCD)	35,0	359,15	3,10E-05	2,62E-04	766,68	2,10	4,421 (4,80%)	1,769 / 0,135 (2,13%)	4,71 (2,81%)	8,98	20,59	6,37	4,251E-09	9,034E-06
A4 (FFD)	40,0	313,15	1,61E-05	1,09E-04	956,07	2,10	1,846 (8,71%)	0,148 / 0,0521 (1,13%)	0,867 (4,29%)	2,94	47,66	3,33	2,337E-09	2,590E-06
A5 (FFD)	40,0	313,15	4,64E-05	3,15E-04	956,07	2,10	5,105 (16,33%)	0,424 / 0,181 (4,13%)	1,65 (5,11%)	8,49	47,66	8,02	2,337E-09	6,250E-06
A10 (CCD)	40,0	323,15	3,11E-05	2,19E-04	923,32	2,30	5,040 (12,67%)	0,821 / 3,126 (1,80%)	3,98 (7,99%)	6,24	39,92	5,86	2,639E-09	5,156E-06
A17 (CCD)	40,0	353,15	3,13E-05	2,47E-04	823,16	2,30	5,797 (9,22%)	1,412 / 1,361 (3,19%)	7,74 (5,47%)	8,01	25,13	6,19	3,683E-09	7,599E-06
A8 (FFD)	40,0	353,15	4,59E-05	3,62E-04	823,16	2,90	7,720 (10,03%)	1,677 / 0,217 (2,21%)	7,00 (4,37%)	11,73	25,13	8,50	3,683E-09	1,044E-05
A2 (FFD)	40,0	353,15	1,60E-05	1,26E-04	823,16	2,90	2,548 (9,91%)	0,310 / 0,0691 (1,48%)	1,97 (4,98%)	4,08	25,13	3,54	3,683E-09	4,346E-06
A12(CCD)	42,0	338,15	3,06E-05	2,25E-04	883,65	2,60	5,602 (12,63%)	1,063 / 2,357 (2,52%)	8,51 (6,02%)	6,79	32,54	5,88	3,057E-09	5,987E-06

De uma forma geral, verifica-se uma melhor capacidade de ajuste, com valores de desvios menores, para o modelo de Sovová 2005, sendo que o modelo de Tan & Liou 1989 evidencia uma capacidade menor de ajuste. A formulação mais antiga e baseada exclusivamente numa cinética de dessorção, limita a sua capacidade de modelação dos resultados experimentais, principalmente num processo de extração supercrítica em que as interações entre os potenciais solutos (óleo) e fluido supercrítico são mais complexas de acordo com a natureza da matriz natural (farelo de arroz). Em grande parte destes processos, a solubilidade do soluto, a sua disponibilidade nas superfícies da matriz e interação com o fluido supercrítico, têm de ser consideradas.

No caso dos modelos de Sovová foram delineados e estudados para o caso de extração supercrítica, nomeadamente, de matrizes em que os principais componentes a extrair são frações lipídicas como óleos, onde se toma em conta a natureza do soluto e as propriedades específicas dos fluidos supercríticos.

A concentração da fase fluida de equilíbrio é considerada como a solubilidade inicial (aparente) do soluto no solvente, C_0 , sendo esta a quantidade de óleo do farelo de arroz que se extrai na quantidade de CO_2 . Esta é obtida através dos valores tangentes à reta na primeira zona de transição da curva, totalmente linear, sendo que a do primeiro ponto é considerada a mais aproximada à solubilidade verdadeira.

No coeficiente de difusão de Wilke-Chang, D_{AB} , considera-se como componente A, a trioleína, e como componente B, o CO_2 . A trioleína representa o óleo extraído, uma vez que, este é composto, maioritariamente (+ 80%), pela junção dos três ácidos gordos do ácido oleico (trioleína). As propriedades físicas desta (por exemplo, volume, volume molar, densidade) se encontram amplamente referenciadas na literatura. Este coeficiente de difusão apresenta como vantagem, não necessitar de inúmeras propriedades para que possa ser determinado.

Consideram-se como propriedades constantes no coeficiente de difusão de Wilke-Chang, D_{AB} , a massa do CO_2 e o volume molar da trioleína. Por sua vez, a viscosidade do CO_2 depende das condições de temperatura e de pressão a que se realiza a extração. Posto isto, o D_{AB} depende da temperatura e da pressão. Relativamente ao D_{AB} , este aumenta com o incremento da temperatura.

A correlação de Wakao e Kaguei 1982, k_f , relaciona o coeficiente de difusão de Wilke-Chang, D_{AB} , com o número adimensional de Sherwood, Sh . A subida destes implicam valores superiores desta correlação de Wakao e Kaguei.

A capacidade dos modelos para se ajustarem aos dados experimentais das diferentes extrações é mais notória nas figuras seguintes, as quais apresentam o rendimento obtido em função do tempo, para as diversas combinações de pressão, temperatura e caudal das extrações supercríticas com CO₂ efetuadas, bem como os resultados obtidos para os modelos mencionados anteriormente.

Agruparam-se os ensaios realizados usando valores constantes de temperatura (313,15; 338,15; 353,15K) ou pressão (35 MPa), pretendendo-se comparar não só o modelo III, mais antigo, com os mais recentes, modelos I e II, como também compará-los com os resultados obtidos laboratorialmente.

Para a temperatura de 313,15K, a figura seguinte reproduz os resultados obtidos na cinética da extração do processo.

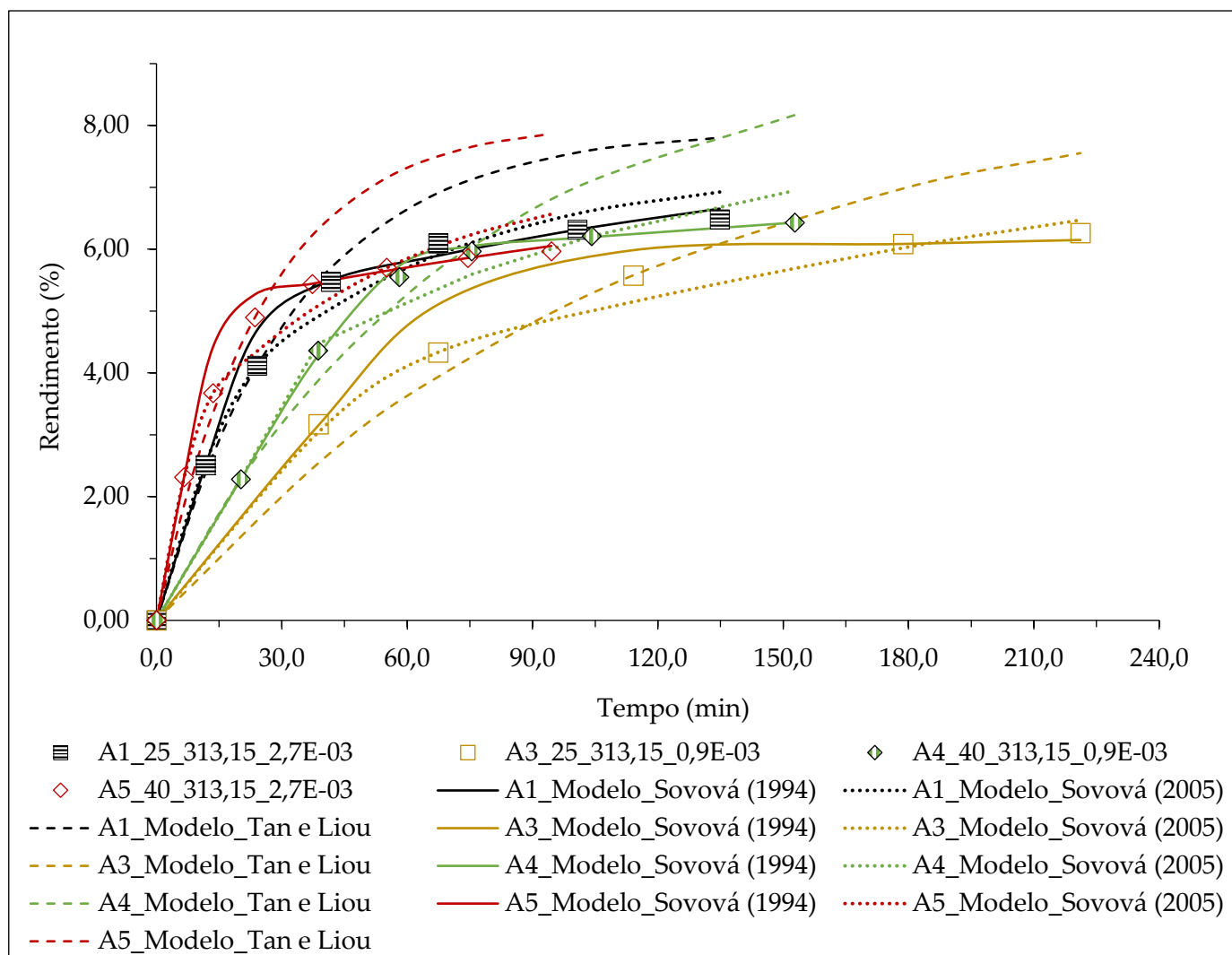


Figura 43 - Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais com FFD, para uma temperatura de 313,15K, através de três modelos (Sovová 1994, Sovová 2005, Tan e Liou 1989).

Verifica-se que o modelo de Tan e Liou, até cerca do minuto 45, regista um comportamento aproximado ao experimental. Apresenta, no restante tempo, valores de rendimento superiores. Na fase inicial da extração, a matriz ainda contém razoáveis quantidades de soluto, pelo que a sua cinética de dessorção, consegue descrever, em parte, o fenómeno experimental. Contudo, quando a quantidade de óleo disponível na matriz diminui consideravelmente, o modelo falha, seguindo uma cinética que não é compatível com a experiência.

Os modelos de Sovová, que consideram o decréscimo natural de soluto na matriz, reproduzem globalmente melhor o fenómeno de extração supercrítica deste tipo de matrizes. A comparação dos dois modelos, apresenta melhores resultados para o modelo com um único parâmetro a ajustar (Sovová 2005). Contudo, tal nem sempre sucede. Para o ensaio A4, verifica-se que o modelo I, Sovová 1994, consegue simular os resultados laboratoriais, com grande exatidão.

Este comportamento para algumas curvas de extração, onde o modelo I de Sovová consegue reproduzir melhor o comportamento global da extração, pode dever-se exclusivamente a uma questão de capacidade do programa de ajustar melhor alguns parâmetros em determinadas condições supercríticas. Por outro lado, a existência de dois parâmetros para ajustar em simultâneo, necessita sempre de mais pontos experimentais, do que um ajuste de um parâmetro, facilitando o ajuste, neste último caso.

Na Figura 44, relativamente ao ensaio A6, é notório que o modelo II, Sovová 2005, se molda, de uma forma mais assertiva, aos resultados experimentais. O modelo I, Sovová 1994, tem a mesma tendência verificada em laboratório até ao minuto 30. Porém, apresenta valores inferiores num intervalo entre este e o minuto 180, e posteriormente, superiores.

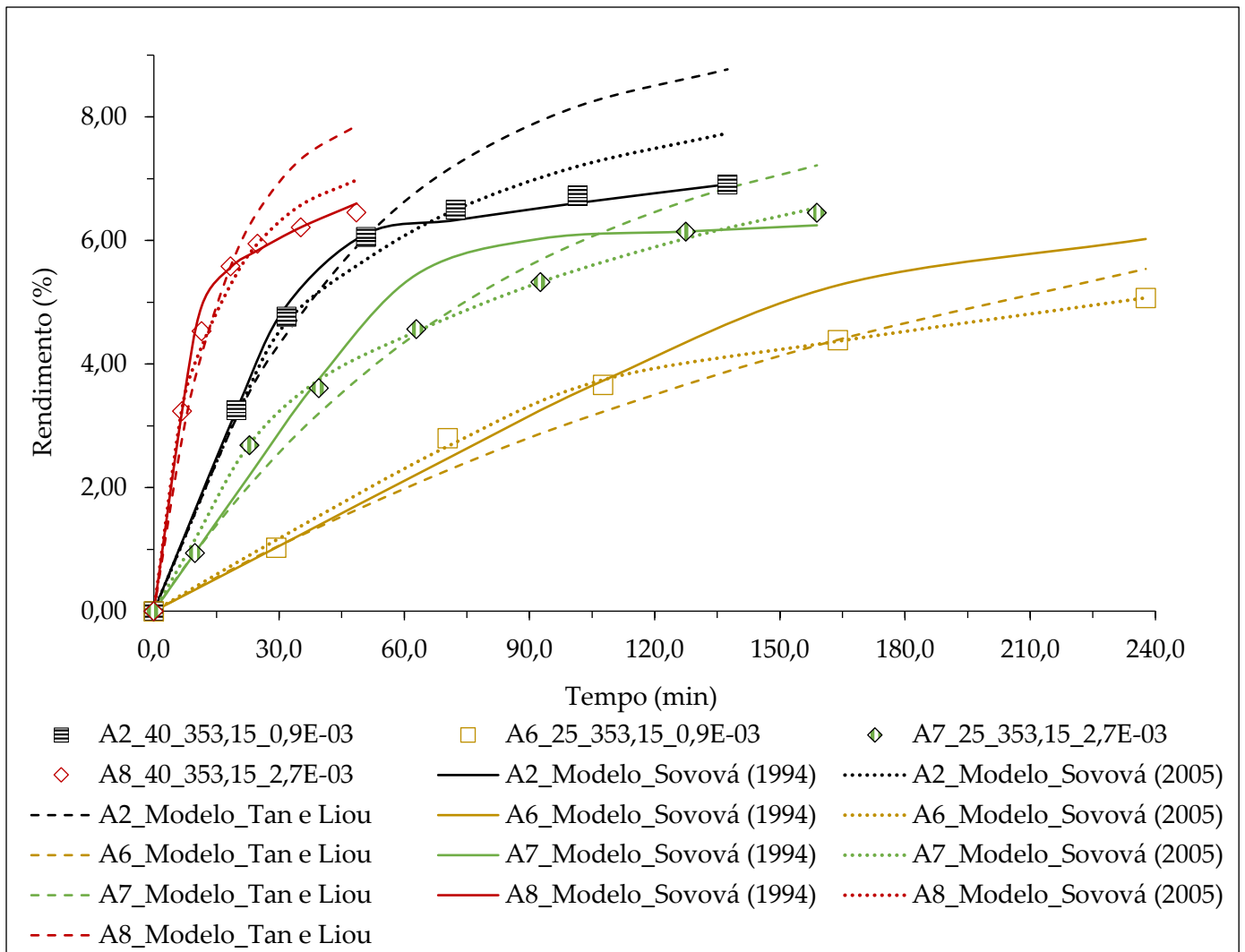


Figura 44 - Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais com FFD, para uma temperatura de 353,15K, através de três modelos (Sovová 1994, Sovová 2005, Tan e Liou 1989).

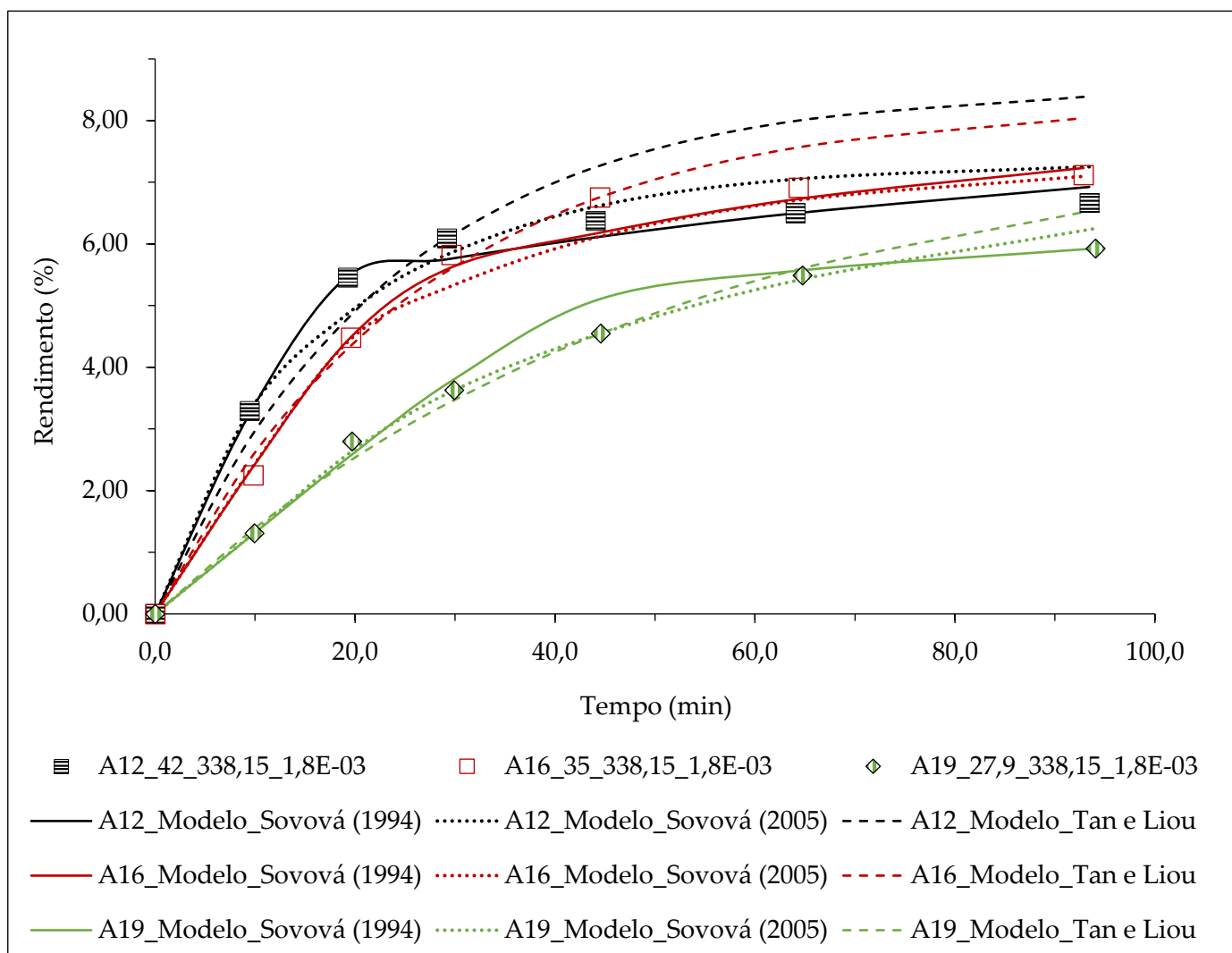


Figura 45 - Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais com CCD, para uma temperatura de 338,15K, através de três modelos (Sovová 1994, Sovová 2005, Tan e Liou 1989).

Na Figura 45, para uma temperatura de 338,15K, verifica-se que o modelo matemático que melhor se ajusta aos resultados do ensaio A12 é o I, Sovová 1994. Os restantes modelos, II e III, Sovová 2005 e Tan e Liou demonstram uma tendência idêntica nos primeiros 10 minutos. Estes registam uma diferença menor de valores de rendimento, e apenas a partir do minuto 30 é que se atinge valores superiores aos apresentados em laboratório, sendo que o que se mais afasta dos resultados laboratórios é o modelo III, Tan e Liou.

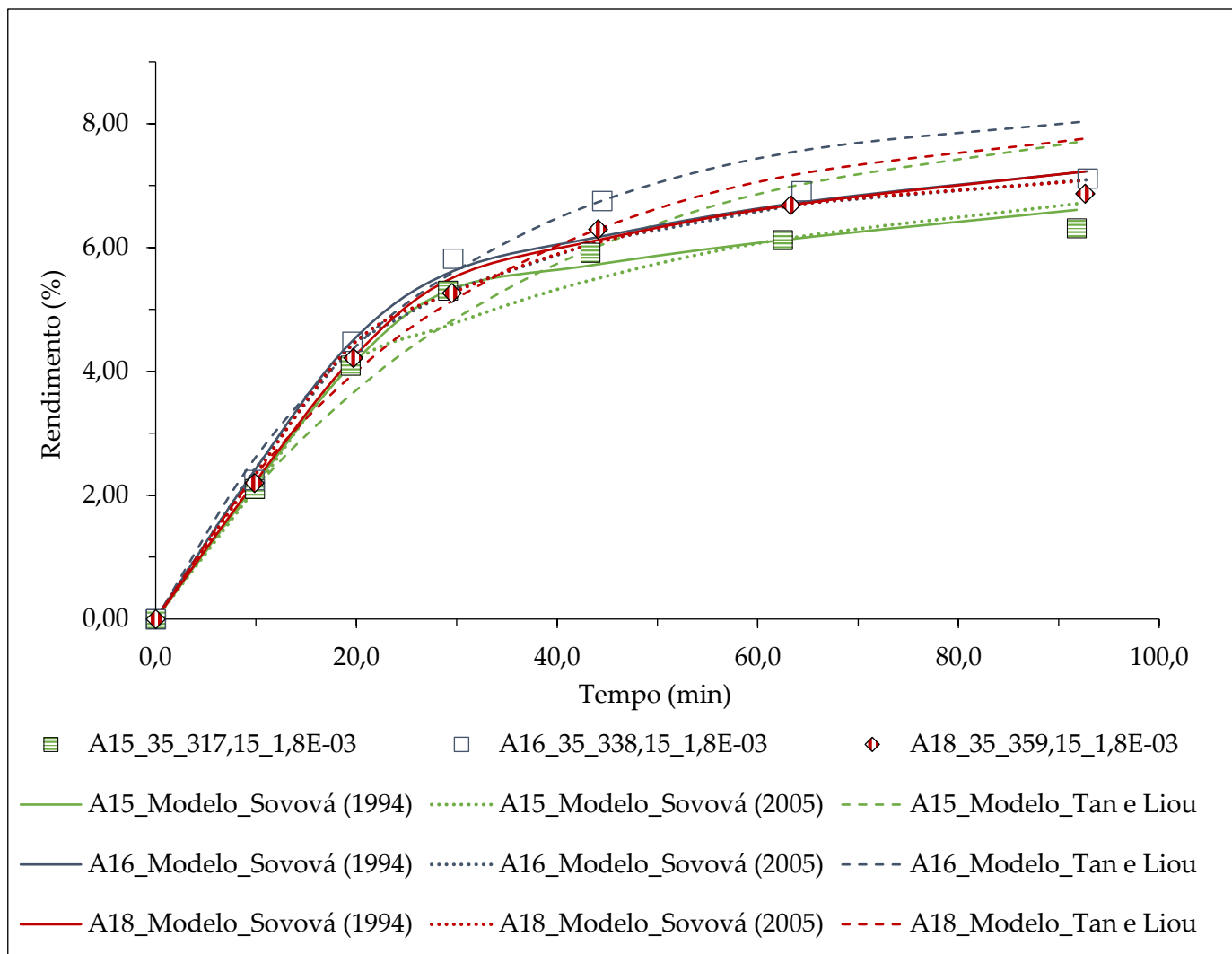


Figura 46 - Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais com CCD, para uma pressão de 35 MPa, através de três modelos (Sovová 1994, Sovová 2005, Tan e Liou 1989).

Por fim, para a mesma pressão e temperaturas diferentes, na Figura 46, verifica-se comportamentos semelhantes aos descritos, sendo que pontualmente o modelo I ajusta melhor os resultados experimentais. Embora, o modelo II seja mais reprodutível globalmente, como se pode verificar pelos desvios da Tabela 25.

O método fundamentado no sistema de fluxo pistão, Sovová 1994, contempla as duas resistências de transferência de massa, externa e interna. Em que o primeiro coeficiente, o de transferência de massa externo, k_f , retrata o período inicial de equilíbrio da extração supercrítica com CO_2 , onde o óleo se encontra mais acessível. Sendo que, o coeficiente de transferência de massa interno, k_s , é mais significativo, na fase final da extração, uma vez que, o óleo se encontra menos acessível.

Na maioria dos ensaios obteve-se valores inferiores a 10% no desvio padrão. Assim, os modelos apresentam uma boa solução para os ajustes dos resultados experimentais. O modelo que melhor simula os dados laboratoriais é o Sovová 2005, sendo que o Sovová 1994 também apresenta bons resultados. O Tan e Liou 1989 apresenta maiores desvios padrão evidenciando uma menor capacidade de simulação face aos modelos estudados.

4.6.2. Análise dos parâmetros adimensionais nos resultados de modelação

Da relação do número de Reynolds com a velocidade linear, na Figura 47, verifica-se que o escoamento é laminar (número de Reynolds, $Re < 2000$), sendo este característico para fluidos mais viscosos, como o óleo extraído a partir do farelo de arroz.

Sabe-se que a densidade e a viscosidade se mantêm constantes, perante iguais condições de pressão e temperatura. Constata-se que o número de Reynolds, Re , para este escoamento varia significativamente, uma vez que, apresenta ser diretamente proporcional ao aumento da velocidade linear.

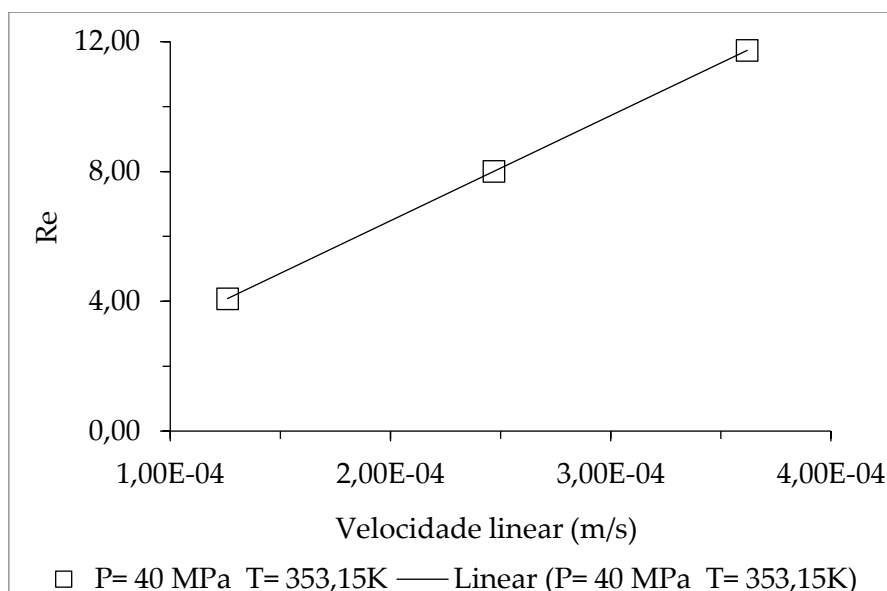


Figura 47 - Número de Reynolds em função da velocidade linear, para uma pressão de 40 MPa e uma temperatura de 353,15K.

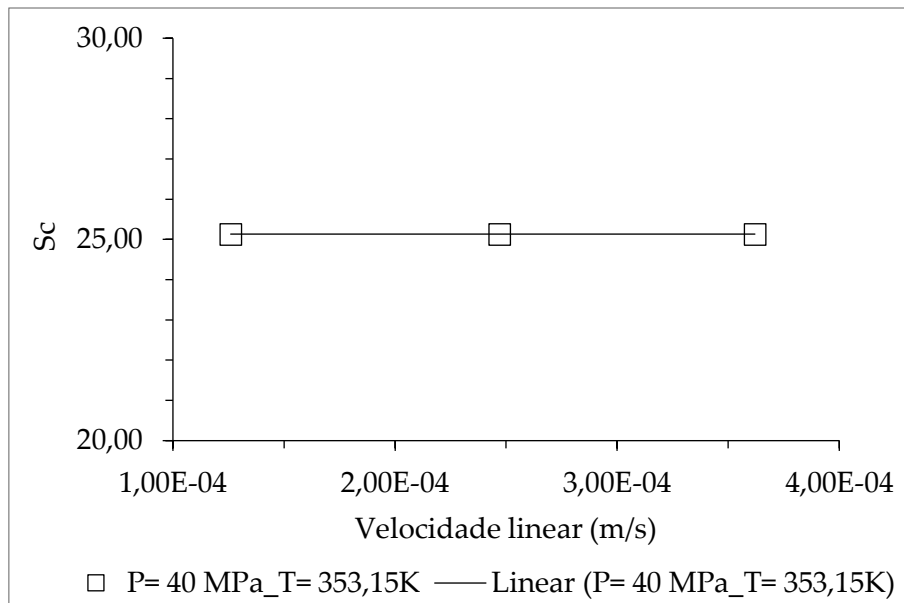


Figura 48 - Número de Schmidt em função da velocidade linear, para uma pressão de 40 MPa e uma temperatura de 353,15K.

Recorrendo à Figura 48, averigua-se que o número de Schmidt, Sc , é constante – 25,13 – como seria de esperar, pois este não depende da velocidade linear.

O número de Schmidt, característico de um processo onde ocorre transferência de massa por meio de convecção forçada, relaciona as propriedades físicas do fluido supercrítico (CO_2). Uma diminuição do mesmo, implica uma diminuição da viscosidade e um aumento da densidade e do coeficiente de difusão, D_{AB} .

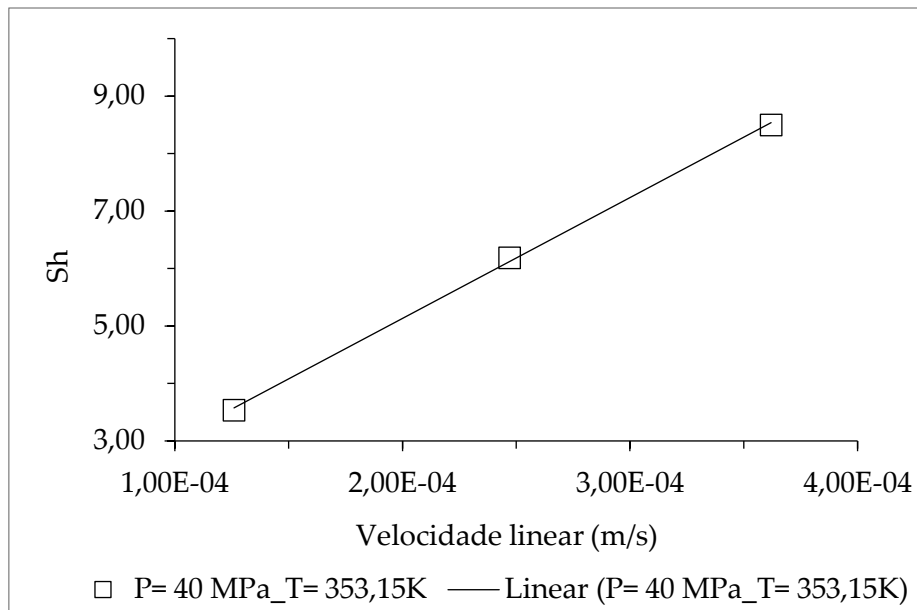


Figura 49 - Número de Sherwood em função da velocidade linear, para uma pressão de 40 MPa e uma temperatura de 353,15K.

O número de Sherwood, Sh , reflete o incremento da transferência de massa através da “convecção” (movimento do fluido supercrítico) em relação à transferência de massa, a nível molecular, por meio de difusão.

Verifica-se que o número de Sherwood, é diretamente proporcional ao aumento da velocidade linear.

Capítulo 5

5. Conclusões e perspectivas futuras

5.1. Conclusões

Os resultados obtidos através da contemporânea dissertação, acrescentam um conhecimento na área da extração supercrítica, caracterização e modelação do óleo de farelo de arroz, potencializando e viabilizando uma maior aplicabilidade na alimentação e cosmética. Pretende-se, então, a sua aplicação nestes setores, uma vez que apresenta ser rico em antioxidantes, exibindo uma evidente vantagem, o facto de ser bastante nutritivo. Assim, valoriza-se um novo percurso para o resíduo do segundo cereal mais produzido a nível mundial (revestimento dos grãos de arroz).

A eficácia da obtenção de óleos e extratos do farelo de arroz é condicionada mediante a técnica executada, os solventes aplicados, e a polaridade dos mesmos. A constituição do óleo (componentes a extrair) também desempenha um papel fundamental no sucesso da extração, uma vez que estes possuem propriedades físicas e químicas complexas que devem ser consideradas. Assim, o método convencional, a extração em Soxhlet, com solventes, hexano e etanol, alcançou rendimentos na ordem de 8,50% e 4,50%, respetivamente. Por sua vez, o método não convencional, a extração supercrítica com CO₂, conforme o desenho fatorial fracionário (FFD) obteve rendimentos entre os 5,07 e os 6,91% e, após uma melhor otimização com o desenho do composto central (CCD) o intervalo de valores de rendimento encontrou-se entre 5,72 e 7,12%.

A caracterização dos óleos obtidos através do método espectrofotométrico do radical livre DPPH, quantificou a atividade antioxidante dos extratos obtidos nos ensaios delineados pelo programa Design Expert 11, em FFD (Fractional factorial designs). Contudo, os resultados não foram coerentes entre si e apresentaram-se de difícil interpretação, impossibilitando a quantificação destes por este método.

Uma outra perspectiva para efetuar a caracterização dos óleos obtidos, através da extração supercrítica com CO₂, foi a quantificação de flavonoides e a quantidade total de polifenóis, que permitiu, assim, compreender que estes

extratos possuem teores semelhantes aos registados nos óleos, com a extração em Soxhlet. Com recurso à extração supercrítica, consegue-se eliminar solventes orgânicos no processo, substituindo-os por solventes ambientalmente sustentáveis e, uma redução substancial de tempo, para metade, com uma tecnologia considerada verde (CO₂ supercrítico).

Através do auxílio da ferramenta estatística, Planeamento Estatístico de Experiências (DOE), aplicada à extração supercrítica com dióxido de carbono (CO₂), tem-se em vista um estudo mais eficaz de interação entre os diversos fatores e os respetivos resultados nas respostas escolhidas. Este permite uma otimização dos fatores, pressão (MPa), temperatura (K) e caudal (kg/min) mediante os resultados alcançados das variáveis de resposta, rendimento (%), teor de flavonoides (μmol EC/g ext) e teor de polifenóis totais (μmol EAG/g ext), possibilitando, o melhor conjunto de resultados para o estudo. O modelo prevê que o ponto ideal é atingido para as condições de 34,36 MPa a 339,49K, com um rendimento de 6,84%, 1696,8 μmol EC/g ext de flavonoides e 61,28 μmol EAG/g ext de polifenóis totais.

A modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais, obtidos na extração supercrítica com CO₂, por intermédio dos métodos fundamentados no sistema de fluxo pistão (modelo I- Sovová 1994 e modelo II- Sovová 2005) e do método de dessorção em condições supercríticas (modelo III- Tan e Liou 1989), apresentam uma boa solução para os ajustes dos resultados experimentais. Relativamente aos coeficientes de transferência de massa interna e externa dos modelos, verifica-se que estes evidenciam equivalente ordem de grandeza. Na maioria dos ensaios obteve-se valores inferiores a 10% no desvio padrão, manifestando uma boa capacidade de simulação face aos modelos estudados. Apesar disso, o modelo de Tan e Liou 1989 regista uma menor capacidade para a modelação dos resultados experimentais quando comparativamente aos de Sovová 1994 e 2005, sendo menos viável para a aplicação no sistema de extração com fluidos supercríticos. A capacidade de simulação do processo para diversas condições aplicadas ao sistema, como a temperatura, a pressão e o caudal de CO₂, ou a informação do regime de trabalho (laminar ou turbulento), tornam estes modelos numa ferramenta útil.

Priorizou-se, na análise efetuada, o efeito do rendimento da extração supercrítica com CO₂, nas frações de óleo de farelo de arroz enriquecidas com antioxidantes, com recurso ao software de estatística, Design Expert 11 (DX11), aplicando-se o método de escolha - desenho fatorial fracionário (FFD – Fractional

Factorial Design). Num contexto de dimensionamento industrial, p. ex., deve considerar-se diversos fatores, como o aumento do caudal para uma redução de tempo, mesmo que se obtivesse um rendimento menor, ou ainda, diminuir a pressão, promovendo uma redução nos gastos do processo, embora se aumentasse a duração da reação e se reduzisse o rendimento. Sempre numa ótica de maximizar o lucro bruto do processo, também se tem em conta, o custo das matérias-primas, da energia elétrica, da manutenção de equipamentos, etc. (Operação), o custo dos equipamentos da fábrica (Investimento) e a venda de produtos e de eletricidade produzida (Receitas).

Com o método eficaz de ajuste de modelos de segunda ordem - desenho do composto central (CCD – Central Composite Design), se privilegiou o rendimento da extração, finalizando os ensaios realizados quando este atingia o patamar. No entanto, numa perspetiva de ambiente fabril, deve ser ponderado reduzir o tempo de extração, pois conseguiu-se extrair, aproximadamente, 94% do óleo de farelo de arroz, aos 40 minutos, na maioria dos ensaios efetuados, como se verifica na Tabela 51, em **Anexo E**. Não compensaria, então, realizar a extração com uma duração superior, pelo simples facto que acrescentando mais 50 minutos, apenas se extrairia mais 5% do óleo, adicionando custos ao processo que impossibilitaria um retorno financeiro.

Indicar-se-ão, no subcapítulo seguinte, mais estudos que ainda poderão ser desenvolvidos, continuando o trabalho que já foi executado até aqui, com o intuito de aperfeiçoar a sua utilidade e avaliar o óleo de farelo de arroz.

5.2. Perspetivas futuras

No corrente trabalho final de mestrado extraiu-se produtos através de tecnologias mais verdes, de forma a valorizar o farelo de arroz. Assim, sugere-se outras abordagens de trabalho, promovendo uma continuidade deste:

(1) Como estudo complementar com o fluido supercrítico CO₂, poder-se-ia recorrer ao auxílio de co-solventes. Por exemplo, etanol (solvente polar) devido à quantidade significativa de polifenóis totais extraída no trabalho de investigação ou metanol, uma vez que, estes componentes promovem ao incremento da polaridade do fluido supercrítico utilizado, garantindo uma extração superior de componentes mais polares existentes na matriz (Ajila et al., 2011). Sendo que nestes últimos solventes, a sua toxicidade pode limitar a aplicação para a indústria alimentar e cosmética.

(2) Optar-se por uma extração com outros fluidos supercríticos (propano, p.ex.).

(3) Recomenda-se, também, aprimorar o estudo através de outras técnicas verdes, como por exemplo, a extração por micro-ondas, hidrodestilação (extração ultrassónica), ou extração por líquido pressurizado.

(4) Proceder-se à realização de mais métodos referentes à atividade antioxidante, nomeadamente, o do radical catião ABTS⁺ ou o do poder de redução do ião Fe³⁺, com o intuito de conseguir resultados mais conclusivos.

(5) Num ponto de vista de valorização, estudar a caracterização de propriedades microbiológicas, através de leveduras e bactérias gram-positivas ou gram-negativas, por exemplo.

(6) Avaliar a atividade enzimática, recorrendo à capacidade de inibição de enzimas, tendo como exemplo, a AChE e a TyrE.

(7) De forma a identificar componentes no extrato ao nível de metabolitos secundários, será importante recorrer a técnicas como, HPLC ou GC-MS.

Contribuições

Através da execução deste trabalho final de mestrado originaram-se duas comunicações em painel:

- Coelho, J. P., Fernandes, I. M., Neng, N. R., Sardinha, J. M., Nogueira, J. M.; *“Supercritical carbon dioxide extraction of Portuguese rice bran oil”*, 1.º Encontro Ibérico de Fluidos Supercríticos, 18-20 de Fevereiro de 2020, Santiago de Compostela, Espanha
- Fernandes, I. M., Coelho, J. P.; *“Extração de produtos e valorização do farelo de arroz com tecnologias mais verdes”*, 7.º Ifeqb – Fórum de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 11-13 de Maio de 2021, Lisboa, Portugal

Referências Bibliográficas

- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valéro, J. R. (2011). Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 227–249. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
- Almeida, A. S., & Marques, P. (2013). A importância da cultura do arroz em Portugal e no Mundo. In *INIAV, Oeiras*.
- Amaral, F. F., Almeida, F. A. de, Costa, S. C., Leme, R. C., & Paiva, A. P. de. (2018). Aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta para Otimização do Processo de Solda a Ponto no Aço Galvanizado AISI 1006. *Soldagem & Inspeção*, 23(2), 129–142. <https://doi.org/10.1590/0104-9224/si2302.02>
- Ambiente, A. E. do. (2020). *Poluição Atmosférica*. Agência Europeia Do Ambiente. <https://www.eea.europa.eu/pt/themes/air/intro>
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957–998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>
- Aparroz. (2017). *Variedades que produzimos*. Agrupamento de Produtores de Arroz Do Vale Do Sado Lda. <https://aparroz.com/>
- Ara, K. M., Karami, M., & Raofie, F. (2014). Application of response surface methodology for the optimization of supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction of Capparis spinosa seed oil. *Journal of Supercritical Fluids*, 85, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.10.016>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Berna, A., Cháfer, A., & Montón, J. B. (2001). High-pressure solubility data of the system resveratrol (3) + ethanol (2) + CO₂ (1). *Journal of Supercritical Fluids*, 19(2), 133–139. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(00\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(00)00088-7)
- Bitencourt, R. G., Filho, W. A. R., Paula, J. T., Garmus, T. T., & Cabral, F. A. (2016). Solubility of γ -oryzanol in supercritical carbon dioxide and extraction from rice bran. *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.009>

- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Marín-Arroyo, M. R., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Borges, J. A. Z. A. (2014). *Estudo de Novas Variedades de Arroz Carolino para o Baixo Mondego*. Instituto Politécnico de Coimbra - Escola Superior Agrária.
- Cardoso, A. (2017). Extração supercrítica do *Agastache foeniculum* (Lamiaceae) Caracterização dos Extratos e Modelação Andreia Alexandra Santos Cardoso. In *Instituto Superior de Engenharia de Lisboa*.
- Chen, C. R., Wang, C. H., Wang, L. Y., Hong, Z. H., Chen, S. H., Ho, W. J., & Chang, C. M. J. (2008). Supercritical carbon dioxide extraction and deacidification of rice bran oil. *Journal of Supercritical Fluids*, 45(3), 322–331. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.01.006>
- Chen, W., Wang, W. P., Zhang, H. S., & Huang, Q. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 614–619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.029>
- Coelho, J. P., Cristino, A. F., Matos, P. G., Rauter, A. P., Nobre, B. P., Mendes, R. L., Barroso, J. G., Mainar, A., Urieta, J. S., Fareleira, J. M. N. A., Sovová, H., & Palavra, A. F. (2012). Extraction of volatile oil from aromatic plants with supercritical carbon dioxide: Experiments and modeling. *Molecules*, 17(9), 10550–10573. <https://doi.org/10.3390/molecules170910550>
- Coelho, J.A.P., & Palavra, A. A. M. F. (2015). Supercritical Fluid Extraction of Compounds from Spices and Herbs. In T. Fornari & R. P. Stateva (Eds.), *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing* (Springer, pp. 357–396). Springer. <https://doi.org/10.1007/987-3-319-10611-3>
- Coelho, José A.Paixão, & Palavra, A. M. F. (2015). Supercritical Fluid Extraction of Compounds from Spices and Herbs. In T.; Fornari & R. . Stateva (Eds.), *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing* (Springer, pp. 357–396). https://doi.org/10.1007/978-3-319-10611-3_10

- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>
- Croteau, R., Kutchan, T. M. , & Lewis, N. G. . (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In B. . Buchanan, W. . Grisse, & R. . Jones (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Dabbs, D. M., Mulders, N., & Aksay, I. A. (2006). Solvothermal removal of the organic template from L 3 (“sponge”) templated silica monoliths. *Journal of Nanoparticle Research*, 8(5), 603–614. <https://doi.org/10.1007/s11051-005-9063-4>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dalmolin, I., Mazutti, M. A., Batista, E. A. C., Meireles, M. A. A., & Oliveira, J. V. (2010). Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 42(6), 797–801. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2010.02.003>
- Daroz Gaudêncio, J. H., de Almeida, F. A., Turrioni, J. B., da Costa Quinino, R., Balestrassi, P. P., & de Paiva, A. P. (2019). A multiobjective optimization model for machining quality in the AISI 12L14 steel turning process using fuzzy multivariate mean square error. *Precision Engineering*, 56(December 2018), 303–320. <https://doi.org/10.1016/j.precisioneng.2019.01.001>
- de Almeida, F. A., Gomes, G. F., de Paula, V. R., Corrêa, J. E., de Paiva, A. P., Gomes, J. H. de F., & Turrioni, J. B. (2018). A weighted mean square error approach to the robust optimization of the surface roughness in an AISI 12L14 free-machining steel-turning process. *Journal of Mechanical Engineering*, 64(3), 147–156. <https://doi.org/10.5545/sv-jme.2017.4901>
- Duda, S. C., Mărghițaș, L. A., Dezmirean, D., Duda, M., Mărgăoan, R., & Bobiș, O. (2015). Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Industrial Crops and Products*, 77, 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.045>
- Eurostat. (2020). European Union (EU). https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/APRO_CPSH1__custom_1247406/default/table?lang=en

- Figuerola, L. A., Navarro, L. B., Vera, M. P., & Petricevich, V. L. (2014). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents, and cytotoxicity evaluation of *Bougainvillea xbuttiana*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 497–502.
- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987–9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>
- Georgieva, S. S., Coelho, J. A. P., Campos, F. C., Robalo, M. P., & Stateva, R. P. (2018). Green extraction of high added value substances from spent coffee grounds: Preliminary results. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 53(4), 640–646. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1492914>
- Grosso, C., Coelho, J. P., Pessoa, F. L. P., Fareleira, J. M. N. A., Barroso, J. G., Urieta, J. S., Palavra, A. F., & Sovová, H. (2010). Mathematical modelling of supercritical CO₂ extraction of volatile oils from aromatic plants. *Chemical Engineering Science*, 65(11), 3579–3590. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.02.046>
- Grosso, Clara. (2009). *Supercritical fluid extraction of plant compounds with interest for the food, pharmaceutical and agrochemical industries*. Instituto Superior Técnico.
- Grosso, Clara, Figueiredo, A. C., Burillo, J., Mainar, A. M., Urieta, J. S., Barroso, J. G., Coelho, J. A., & Palavra, A. M. F. (2009). Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus*. *Journal of Separation Science*, 32(18), 3215–3222. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900350>
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Hassan, S. M., Aqil, a a Al, Attimarad, M., Al Aqil, A. A., & Attimarad, M. (2013). Determination of crude saponin and total flavonoids content in guar meal. *Advancement in Medicinal Plant Research*, 1(1), 24–28.
- Hernández-Abreu, O., Torres-Piedra, M., García-Jiménez, S., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., Montes, S., Rembao, D., & Estrada-Soto, S. (2013). Dose-dependent antihypertensive determination and toxicological studies of tilianin isolated from *Agastache mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.029>

- Huang, Z. (2015). Mass Transfer Models for Supercritical Fluid Extraction. In T. Fornari & R. P. Stateva (Eds.), *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing* (pp. 77–115). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10611-3_3
- Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A. ., & Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In M. . Hayes (Ed.), *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications* (Vol. 9781461412). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2_2
- Juliano, B. O., & Hicks, P. A. (1996). Rice functional properties and rice food products. In *Food Reviews International* (Vol. 12, Issue 1, pp. 71–103). Marcel Dekker, Inc. <https://doi.org/10.1080/87559129609541068>
- Karazhiyan, H., Razavi, S. M. A., & Phillips, G. O. (2011). Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 915–920. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.022>
- Karimi, E., & Jaafar, H. Z. E. (2011). HPLC and GC-MS determination of bioactive compounds in microwave obtained extracts of three varieties of *labisia pumila benth.* *Molecules*, 16(8), 6791–6805. <https://doi.org/10.3390/molecules16086791>
- Kopcak, U., & Mohamed, R. S. (2005). Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures. *Journal of Supercritical Fluids*, 34(2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.11.016>
- Li, W. J., Cheng, X. L., Liu, J., Lin, R. C., Wang, G. L., Du, S. S., & Liu, Z. L. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activities of *Liriope muscari*. *Molecules*, 17(2), 1797–1808. <https://doi.org/10.3390/molecules17021797>
- Liu, H. M., Wang, F. Y., Li, H. Y., Wang, X. De, & Qin, G. Y. (2015). Subcritical butane and propane extraction of oil from rice bran. *BioResources*, 10(3), 4652–4662. <https://doi.org/10.15376/biores.10.3.4652-4662>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

- Marquez, U. M. L. (2010). *Benefícios do Arroz Integral: mitos e verdades*. <https://docplayer.com.br/8169111-Seminario-arroz-porque-faz-bem.html>
- Martins, D. C. S., & Paganini-costa, P. (2011). Uma Xícara (chá) de Química. *Revista Virtual de Química*, 3(1), 27–36. <https://doi.org/10.5935/rvq.v3i1.113>
- Mechergui, K. K., Jaouadi, W. W., Coelho, J. J. P., Serra, M. C., Marques, A. V, Palavra, A. M. F., Khouja, M. M. L., & Boukhchina, S. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of Tunisian *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and volatile oil obtain by supercritical CO₂ extraction. *International Journal of Advanced Research*, 2(12), 337–343.
- Mendes, R. L., Nobre, B. P., Cardoso, M. T., Pereira, A. P., & Palavra, A. F. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 328–334. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00363-3](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00363-3)
- Miller, J. C., & Miller, J. N. (2005). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (fifth edit). Pearson Education Limited.
- Miller, K., & Phillips, T. (2020). *A NASA-supported scientist is learning how to use carbon dioxide--the main gas in Mars' atmosphere--to harvest rocket fuel and water from the red planet*. Science@NASA. <https://www.nasa.gov/vision/earth/technologies/harvestingmars.html?fbclid=IwAR3WIWCRHZc1ZxVWpSago5zcGNNBuy7p7-peuLKqecEPfpPh9aNY7vGLSBw>
- Mohammed, M. T., Sura Mohammed Kadhim, A. M. N., & Abbas, J. and S. I. (2015). Free Radicals and Human Health. *International Journal of Innovation Science and Research*, 4(6), 218–223. <http://www.ijisr.com/sites/default/files/issues-pdf/101.pdf>
- Molyneux, P. (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219. <https://doi.org/10.1287/isre.6.2.144>
- Montgomery, D. C. (2013). Design and analysis of experiments. In *Arizona State University* (eighth). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9783527809080.catatz11063>
- Noreen, H., Semmar, N., Farman, M., & McCullagh, J. S. O. (2017). Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 792–801. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.024>

- Palavra, A. M. F., Coelho, J. P., Barroso, J. G., Rauter, A. P., Fareleira, J. M. N. A., Mainar, A., Urieta, J. S., Nobre, B. P., Gouveia, L., Mendes, R. L., Cabral, J. M. S., & Novais, J. M. (2011). Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from microalgae and volatile oils from aromatic plants. *Journal of Supercritical Fluids*, 60, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.04.017>
- Pelozo, M. I. D. G., Cardoso, M. L. C., & De Mello, J. C. P. (2008). Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(3), 447–451. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000300002>
- Prevc, Tjaša, Šegatin, N., Poklar Ulrih, N., & Cigić, B. (2013). DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, 109, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.046>
- Prevc, Tjasa, Segatin, N., Ulrih, N. P., & Cigic, B. (2013). DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, 109, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.046>
- Rajasekaran, M., & Kalaimagal, C. (2011). In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of a medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(9), 1427–1433.
- Reis, F. S., Pereira, E., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2011). Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. *Molecules*, 16(6), 4328–4338. <https://doi.org/10.3390/molecules16064328>
- Riera, E., Golás, Y., Blanco, A., Gallego, J. A., Blasco, M., & Mulet, A. (2004). Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11(3–4), 241–244. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.019>
- Saadati, N., Abdullah, M. P., Zakaria, Z., Sany, S. B. T., Rezayi, M., & Hassonizadeh, H. (2013). Limit of Detection and Limit of Quantification Development Procedures for Organochlorine Pesticides Analysis in Water and Sediment Matrices. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-63>
- Saichuk, J. K. (2005). *Long, Medium and Short Grain Types*. LSU AgCenter. https://www.lsuagcenter.com/topics/crops/rice/cultural_practices/long-medium-and-short-grain-types
- Santos, M. P. (2014). *Extração e caracterização de extratos de *Jatropha gossypifolia* L. Avaliação da sua atividade antimicrobiana e antioxidante*. 147.

- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2008). Natural product isolation. In S. D. Sarker, Z. Latif, & A. I. Gray (Eds.), *Natural Product Reports* (2 nd, Vol. 25, Issue 3, pp. 517–554). Humana Press Inc., Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1039/b700306b>
- Schijlen, E. G. W. M., Ric De Vos, C. H., Van Tunen, A. J., & Bovy, A. G. (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65(19), 2631–2648. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.07.028>
- Seidel, V. (2006). Initial and Bulk Extraction. In S. D. . Sarker, Z. . Latif, & A. I. . Gray (Eds.), *Natural Products Isolation* (Issue July). Humana Press Inc., Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1385/1-59259-955-9:27>
- Setiawan, B., Sulaeman, A., Giraud, D. W., & Driskell, J. A. (2001). Carotenoid Content of Selected Indonesian Fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(2), 169–176. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0969>
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Shtereva, L., Vassilevska-Ivanova, R., Stancheva, I., Geneva, M., & Stoyanova, E. (2016). Evaluation of antioxidant activity of Agastache foeniculum and Agastache rugosa extracts. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare Des Sciences*, 69(3), 295–302.
- Singh, D., & Rao, P. V. (2007). A surface roughness prediction model for hard turning process. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 32(11–12), 1115–1124. <https://doi.org/10.1007/s00170-006-0429-2>
- Singleton, V. L., Rossi, J. A., & JR. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Phenolics Determination*, 144–148.
- Soffiati, A. (2021). *Rios de Portugal – I*. Campos Magazine News.
- Sookwong, P., & Mahatheeranont, S. (2017). Supercritical CO2 extraction of rice bran oil – the technology, manufacture, and applications. *Journal of Oleo Science*, 66(6), 557–564. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17019>
- Sovova, H. (1994). Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO2—I. Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Science*, 49(3), 409–414.

- Subra, P., & Jestin, P. (2000). Screening design of experiment (DOE) applied to supercritical antisolvent process. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 39(11), 4178–4184. <https://doi.org/10.1021/ie990940w>
- Tan, C.-S., & Liou, D.-C. (1989). Modeling of Desorption at Supercritical Conditions. *AIChE Journal*, 35(6), 1029–1031.
- Tenorio, A., Gordillo, M. D., Pereyra, C. M., & Martínez De La Ossa, E. J. (2007). Relative importance of the operating conditions involved in the formation of nanoparticles of ampicillin by supercritical antisolvent precipitation. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46(1), 114–123. <https://doi.org/10.1021/ie0606441>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borràs, E., & Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7143–7172. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.030>
- Veiga, J. (2016). *Extração e caracterização de extratos de plantas: comparação entre meios convencionais e fluidos supercríticos*. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
- Voormeij, D. A., & Simandl, G. J. (2002). Geological, ocean, and mineral CO₂ sequestration options: A technical review. *Geological Fieldwork*, 1, 265–277.
- Yener, M. E. (2015). Supercritical Fluid Processing for the Recovery of Bioactive Compounds from Food Industry By-Products. In T. Fornari & R. P. Stateva (Eds.), *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing* (Issue 1, pp. 305–355). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10611-3_9

ANEXOS

ANEXO A – Dados estatísticos relativos ao arroz produzido na União Europeia, em 2020

Tabela 26 - Valores de produção, área e respetiva produtividade do arroz nos países da União Europeia, no ano de 2020 (Eurostat, 2020).

Países	Produção (ton)	Área (ha)	Produtividade (ton/ha)
Bulgária	66,2	12,40	5,31
Grécia	189,1	26,60	7,45
Espanha	774,4	102,02	7,59
França	76,9	14,91	5,16
Itália	1497,8	220,91	6,78
Hungria	11,5	2,99	3,85
Portugal	137,5	26,00	5,29
Roménia	31,1	7,02	4,44
Suíça	0,4	0,09	4,86
Macedónia Norte	19,5	0,31	6,14

ANEXO B – Medições realizadas para a extração do óleo supercrítico

Tabela 27 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A1 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao FFD (25 MPa, 313,15K, 2,7E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	11,75	17,33	0,3772	2,51
2	24,08	35,18	0,6188	4,11
3	41,71	61,72	0,8227	5,47
4	67,44	99,63	0,9165	6,09
5	100,71	149,59	0,9500	6,32
6	134,79	199,83	0,9751	6,48

Tabela 28 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A2 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao FFD (40 MPa, 353,15K, 0,9E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	19,83	10,02	0,4915	3,26
2	31,80	17,07	0,7196	4,77
3	50,87	27,15	0,9142	6,06
4	72,35	38,47	0,9805	6,50
5	101,55	53,49	1,0152	6,73
6	137,47	73,54	1,0425	6,91

Tabela 29 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A3 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao FFD (25 MPa, 313,15K, 0,9E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	38,72	19,88	0,4780	3,17
2	67,40	34,90	0,6533	4,33
3	114,08	59,88	0,8409	5,58
4	178,71	94,92	0,9175	6,09
5	221,16	118,64	0,9441	6,26

Tabela 30 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A4 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao FFD (40 MPa, 313,15K, 0,9E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	20,18	10,07	0,3439	2,28
2	38,65	20,13	0,6577	4,36
3	58,12	30,16	0,8369	5,55
4	75,44	40,22	0,8997	5,97
5	104,12	55,25	0,9370	6,21
6	152,79	80,28	0,9699	6,43

Tabela 31 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A5 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao FFD (40 MPa, 313,15K, 2,7E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	6,60	10,19	0,3467	2,31
2	13,55	20,65	0,5512	3,67
3	23,57	35,95	0,7349	4,90
4	37,29	56,89	0,8153	5,43
5	55,12	84,24	0,8553	5,70
6	74,53	114,32	0,8790	5,86
7	94,52	144,52	0,8950	5,97

Tabela 32 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A6 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao FFD (25 MPa, 353,15K, 0,9E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	29,35	15,21	0,1547	1,03
2	70,43	35,23	0,4209	2,80
3	107,63	55,26	0,5505	3,67
4	163,93	85,34	0,6594	4,39
5	237,66	125,38	0,7613	5,07

Tabela 33 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A7 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao FFD (25 MPa, 353,15K, 2,7E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,85	15,06	0,1427	0,94
2	22,92	35,12	0,4059	2,69
3	39,59	60,23	0,5458	3,61
4	62,94	95,30	0,6902	4,57
5	92,68	139,55	0,8050	5,33
6	127,48	189,74	0,9285	6,14
7	158,89	235,62	0,9751	6,45

Tabela 34 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A8 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao FFD (40 MPa, 353,15K, 2,7E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	6,77	10,12	0,4874	3,24
2	11,45	17,28	0,6816	4,53
3	18,42	27,51	0,8396	5,58
4	24,88	37,58	0,8950	5,95
5	35,25	53,08	0,9345	6,21
6	48,58	73,21	0,9709	6,46

Tabela 35 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A9 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (30 MPa, 323,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,62	9,88	0,2725	1,80
2	19,12	19,89	0,5378	3,56
3	28,32	29,91	0,6854	4,54
4	42,50	44,94	0,7877	5,21
5	62,05	64,96	0,8350	5,53
6	91,43	94,98	0,8640	5,72

Tabela 36 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A10 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (40 MPa, 323,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,70	10,02	0,4563	3,02
2	19,13	20,04	0,7826	5,19
3	28,68	30,07	0,8609	5,71
4	43,37	45,09	0,9038	5,99
5	62,33	65,11	0,9394	6,23
6	91,52	95,12	0,9802	6,50

Tabela 37 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A11 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (30 MPa, 353,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,75	10,02	0,2079	1,38
2	19,50	20,04	0,4942	3,29
3	28,88	30,05	0,6295	4,19
4	43,55	45,07	0,7566	5,03
5	63,37	65,08	0,9106	6,06
6	92,07	95,10	0,9871	6,57

Tabela 38 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A12 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (42 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,47	10,02	0,4941	3,29
2	19,27	20,04	0,8192	5,46
3	29,18	30,05	0,9142	6,09
4	44,05	45,07	0,9567	6,37
5	64,05	65,07	0,9756	6,50
6	93,43	95,09	1,0011	6,67

Tabela 39 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A13 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,63	10,02	0,3562	2,37
2	19,35	20,04	0,6454	4,30
3	29,22	30,05	0,8131	5,42
4	43,90	45,07	0,9650	6,43
5	63,23	65,09	0,9949	6,63
6	92,35	95,11	1,0214	6,81

Tabela 40 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A14 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,72	10,01	0,3646	2,43
2	19,40	20,03	0,6690	4,46
3	29,62	30,07	0,8351	5,57
4	44,43	45,09	0,9269	6,18
5	64,33	65,11	0,9703	6,47
6	92,67	95,15	1,0013	6,67

Tabela 41 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A15 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 317,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,90	10,02	0,3157	2,10
2	19,42	20,04	0,6145	4,09
3	29,12	30,06	0,7960	5,30
4	43,32	45,08	0,8883	5,92
5	62,50	65,11	0,9187	6,12
6	91,78	95,12	0,9477	6,32

Tabela 42 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A16 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,82	10,01	0,3384	2,25
2	19,58	20,03	0,6740	4,48
3	29,63	30,46	0,8756	5,82
4	44,47	45,47	1,0159	6,76
5	64,35	65,48	1,0397	6,91
6	92,87	95,48	1,0704	7,12

Tabela 43 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A17 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (40 MPa, 353,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,57	10,01	0,4664	3,10
2	19,13	20,02	0,7993	5,32
3	28,93	30,03	0,9206	6,13
4	43,43	45,08	0,9714	6,47
5	62,90	65,09	1,0090	6,72
6	92,23	95,10	1,0379	6,91

Tabela 44 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A18 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (35 MPa, 359,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,83	10,01	0,3309	2,20
2	19,70	20,03	0,6347	4,22
3	29,52	30,04	0,7922	5,27
4	44,07	45,05	0,9469	6,30
5	63,28	65,07	1,0057	6,69
6	92,63	95,08	1,0333	6,87

Tabela 45 – Resultados acumulativos dos parâmetros do ensaio A19 da Extração Supercrítica com CO₂ recorrendo ao CCD (27,9 MPa, 338,15K, 1,8E-03 kg/min).

Ponto medido	Tempo (min)	V CO₂ (L)	m Óleo (g)	Rendimento (%)
1	9,92	10,01	0,1963	1,31
2	19,70	20,03	0,4203	2,80
3	29,92	30,40	0,5448	3,63
4	44,57	45,43	0,6831	4,55
5	64,75	65,44	0,8247	5,49
6	94,07	95,47	0,8902	5,93

ANEXO C – Medições realizadas para as curvas de calibração com uma solução padrão trolox

Tabela 46 - Curva de calibração, em 50% metanol com 50% isopropanol, tris e 100 mM de DPPH, variação da percentagem de inibição em função da concentração de trolox.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Inibição
1	10,3	0,09
2	20,6	1,62
3	30,9	4,44
4	41,2	5,97
5	51,5	5,56
6	61,8	9,61
7	72,1	10,80
8	82,4	11,58
9	103,0	16,72
10	113,3	17,94
11	123,6	20,77
12	144,2	22,16
13	154,5	22,00
14	164,8	21,68
15	185,4	23,00
16	195,7	21,32
17	206,0	22,51
18	208,1	22,96
19	257,5	30,19
20	278,1	27,14
21	309,0	29,42
22	329,6	28,81
23	360,5	31,26
24	412,0	32,35

Tabela 47 - Curva de calibração, em 50% metanol com 50% isopropanol e 100 mM de DPPH, variação da percentagem de inibição em função da concentração de trolox.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Inibição
1	10,0	0,17
2	20,0	0,78
3	30,0	3,01
4	40,0	3,76
5	50,0	6,78
6	60,0	8,92
7	62,0	49,51
8	65,0	64,44
9	68,0	72,63
10	70,0	73,55
11	80,0	76,76
12	100,0	93,71
13	110,0	95,56
14	120,0	94,81
15	140,0	95,18
16	160,0	95,75

Tabela 48 - Curva de calibração, em metanol puro, variação da porcentagem de inibição em função da concentração de trolox.

Amostra	Concentração (µg/mL)	% de Inibição
1	10,0	1,38
2	20,0	8,61
3	30,0	21,73
4	40,0	26,12
5	50,0	40,68
6	60,0	45,01
7	70,0	58,69
8	80,0	66,51
9	100,0	78,14
10	110,0	88,86
11	120,0	88,82
12	140,0	96,00
13	160,0	96,37

Tabela 49 - Curva de calibração, em 50% metanol com 50% etanol, variação da percentagem de inibição em função da concentração de trolox.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% de Inibição
1	10,0	7,44
2	20,0	17,21
3	30,0	24,14
4	40,0	30,51
5	50,0	43,89
6	60,0	47,03
7	70,0	58,29
8	80,0	65,92
9	100,0	68,89
10	110,0	75,94
11	120,0	82,04
12	140,0	94,60
13	160,0	94,48

Tabela 50 - Curva de calibração, em 50% etanol com 50% água, variação da percentagem de inibição em função da concentração de trolox.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% de Inibição
1	10,0	7,00
2	20,0	19,32
3	30,0	28,56
4	40,0	41,87
5	50,0	55,54
6	60,0	64,95
7	70,0	78,67
8	80,0	88,95
9	100,0	92,58
10	110,0	93,68
11	120,0	93,23
12	140,0	93,19
13	160,0	93,77

Anexo D – Caracterização da quantidade de flavonoides e dos polifenóis totais existentes no óleo supercrítico

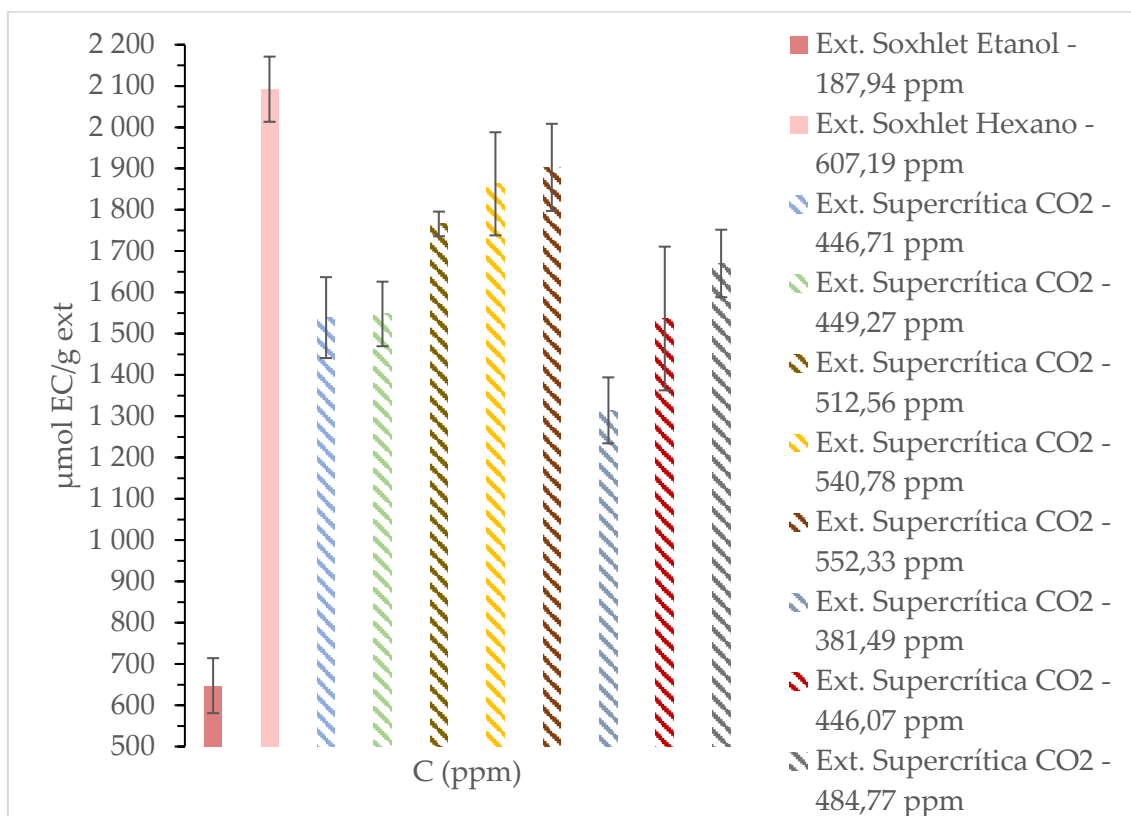


Figura 50 - Teor de flavonoides, em $\mu\text{mol EC/g ext}$, através do método de microplaca a 415 nm, do extrato do farelo de arroz obtido pelas extrações - Soxhlet e Supercrítica com CO₂ - em ordem à concentração, em ppm.

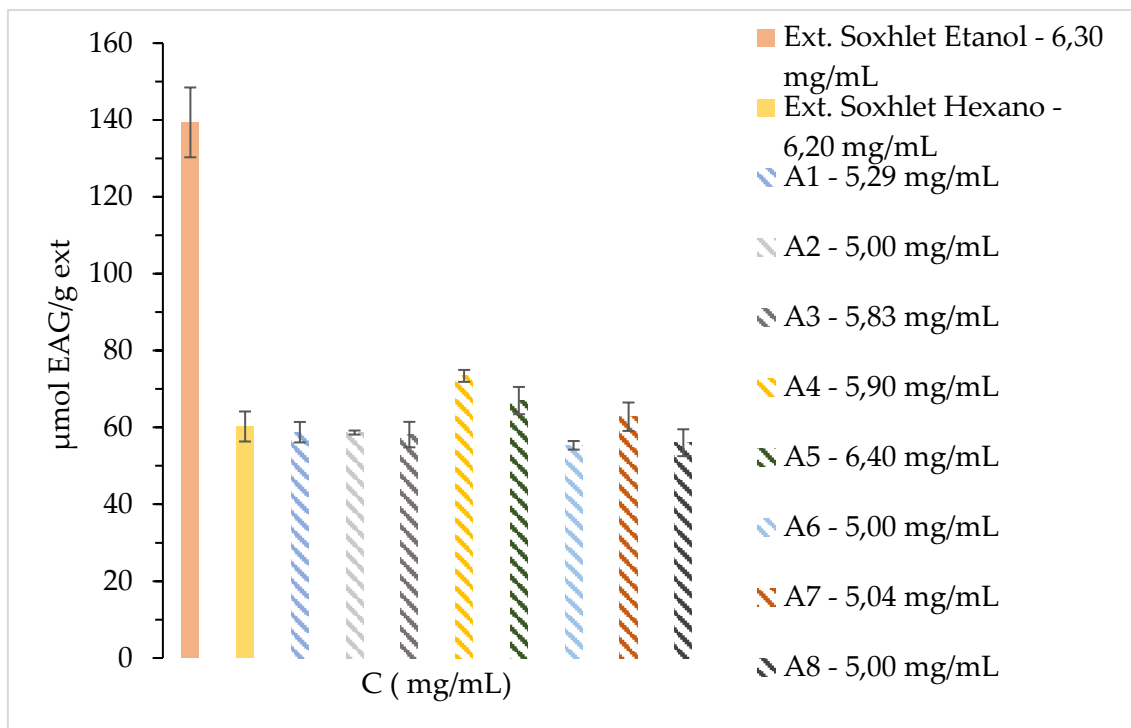


Figura 51 - Teor de polifenóis totais, em $\mu\text{mol EAG/g ext}$, através do método de microplaca a 655 nm, do extrato do farelo de arroz obtido pelas extrações - Soxhlet e Supercrítica com CO_2 - em ordem à concentração, em mg/mL.

Anexo E – Valores obtidos de rendimento a dois tempos no desenho experimental CCD, e respetiva % de extração


Tabela 51 - Resultados planeados para o CCD com os fatores com respetivas magnitudes para otimizar o desempenho de extração e respostas associadas.

Ensaio*	Pressão (MPa)	Temperatura (K)	CO2 (L)	Óleo (g)	Tempo:		Extração (%)
					45min	90min	
A9	30,0	323,15	94,98	0,86	5,21	5,72	91,17
A10	40,0	323,15	95,12	0,98	5,99	6,50	92,21
A11	30,0	353,15	95,10	0,99	5,03	6,57	76,65
A12	42,0	338,15	95,09	1,00	6,37	6,67	95,56
A13	35,0	338,15	95,11	1,02	6,43	6,81	94,48
A14	35,0	338,15	95,15	1,00	6,18	6,67	92,57
A15	35,0	317,15	95,12	0,95	5,92	6,32	93,73
A16	35,0	338,15	95,48	1,07	6,76	7,12	94,91
A17	40,0	353,15	95,10	1,04	6,47	6,91	93,59
A18	35,0	359,15	95,08	1,03	6,30	6,87	91,64
A19	27,9	338,15	95,47	0,89	4,55	5,93	76,74

* Os valores cumulativos registados dos respetivos ensaios localizam-se descritos no Anexo B.

Notou-se que à medida que a pressão aumenta, a percentagem de extração apresenta a mesma tendência, ou seja, pressões mais elevadas promovem, num curto período, uma maior quantidade de óleo extraído. Como se constata no ensaio A19, a 27,9 MPa, onde se extraiu apenas 76,74% do óleo em 45 minutos (rendimento: 4,55% - 45 minutos; 5,93% - 90 minutos), comparativamente ao ensaio A12, a 42 MPa, retirou-se 95,56% de óleo no mesmo período (rendimento: 6,37% - 45 minutos; 6,67% - 90 minutos).

Anexo F – Contribuições Científicas



FEQB

Extração de produtos e valorização do farelo de arroz com tecnologias mais verdes

Fernandes, I. M. 1*, Coelho, J. P. 1,2

ICIEQB/ISEL - Instituto Politécnico de Lisboa, 1959-007 Lisboa, Portugal.
2CQE, IST, Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal.
*a41117@alunos.isel.pt

De acordo com a Agência Europeia do Ambiente (AEA)¹ estima-se que, aproximadamente, 90% dos cidadãos europeus estão sujeitos a poluentes prejudiciais à sua saúde. A valorização e reutilização de biomassa com antioxidantes naturais é um tópico atual, pois estes compostos apresentam capacidade de captar radicais livres, resultantes das mais diversas origens, incluindo as dos poluentes. Os compostos presentes no óleo do farelo de arroz, funcionam como antioxidantes naturais, fornecendo ao mesmo uma maior resistência à oxidação ou à deterioração. Depois do milho, o arroz é o segundo cereal mais produzido a nível mundial, produz-se anualmente, cerca de 730 milhões de toneladas (Mt). Na Europa, a produção de arroz atinge os 4,4 Mt por ano².

Neste trabalho, pretende-se explorar a viabilidade de valorização do óleo obtido do farelo de arroz, mediante tecnologias mais verdes, usando solventes ambientalmente sustentáveis.

Utilizando a extração supercrítica e um planeamento experimental inicial, plano fatorial completo de 2 níveis, onde os ensaios experimentais incluem todas as combinações destes, foi possível verificar e delinear as combinações dos fatores, pressão, temperatura e caudal de CO₂ para as respostas de rendimento, flavonoides e polifenóis totais^{3,4}. Estes valores foram comparados com os obtidos pela técnica convencional (Soxhlet com os solventes hexano e etanol). Os resultados obtidos mostraram que o farelo de arroz possui uma satisfatória quantidade de antioxidantes com aplicabilidade em contexto real. Foram obtidos rendimentos entre 5,07 e 6,91% em relação à massa inicial de carga no extrator, valores de flavonoides entre 1314,3 ± 79,8 a 1902,9 ± 105,6 (µmol EC/g ext) e para os polifenóis totais entre 55,35 ± 1,12 a 73,41 ± 1,55 (µmol EAG/g ext). A eliminação de solventes orgânicos no processo, recorrendo a solventes ambientalmente sustentáveis, CO₂ supercrítico, assim como os valores obtidos das respostas no processo permite abrir boas perspectivas para a aplicação de uma tecnologia considerada verde.

Agradecimentos: H2020-MSCA-RISE-2017 Project 778168 "IProPBio". À Aparroz – Agrupamento de Produtores de Arroz do Vale do Sado Lda, pela disponibilidade do farelo de arroz.

REFERÊNCIAS

[1] EEA. European Environment Agency. 2020 Disponível: <https://www.eea.europa.eu/pt/themes/air/intro>
[2] Almeida, A.S.; Marques, P.: "A importância da cultura do arroz em Portugal e no Mundo". 30 de Maio de 2013 Auditório do Centro de Formação DNIAV, Oeiras.
[3] Reis, F.S.; Pereira, E.; Barros, L.; Sousa, M.J.; Martins, A.; Ferreira, I. *Molecules*, 2011, 16(6), 4328-4338
[4] Bobbo-Gasrcia, G.; David-Pardo, G. *J.Sci.Food.Agric.*, 2015, 95(1), 204-209

13

Figura 52 - Resumo da comunicação em painel no Fórum de Engenharia Química de Lisboa, 11-13 de Maio de 2021.

Supercritical carbon dioxide extraction of Portuguese rice bran oil

José P. Coelho^{a,b*}, Inês M. Fernandes^a, Nuno R. Neng^c, José M. Sardinha^{d,e}, José M. Nogueira^c

^a CIEQB/ISEL - Instituto Politécnico de Lisboa, 1959-007 Lisboa, Portugal.

^b CQE, IST, Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal.

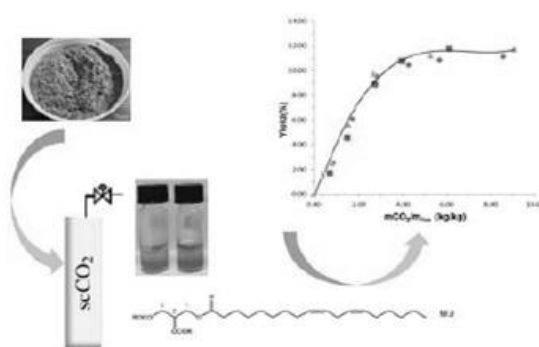
^c CQE, FC, Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa, Portugal

^d Department of Chemical Engineering, IST, Universidade de Lisboa, 1049-001, Lisboa, Portugal.

^e CERENA, IST, Universidade de Lisboa, 1049-001, Lisboa, Portugal

* jcoelho@deq.isel.ipl.pt

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Rice bran is a by-product (about 8 % of rice paddy) originated from the rice grinding process in which the outer layers of the rice kernel are removed. Rice bran consists of 11–15% proteins, 34–62% carbohydrates, 7–11% crude fibers, 7–10% ashes and 15–20% lipids, which are a by-product of the rice-refining process [1]. Supplement of rice bran in various foods provides to the progress of value-added foods or functional foods that now are of increasing benefit to the society. Rice bran has been profitably enhanced in bread, cakes, noodles, pasta, and ice creams without any negative effect on their functional and textural properties [2]. Supercritical carbon dioxide extraction, scCO₂, of oils from samples of rice bran, 16 g, was carried out in the flow apparatus, from Applied Separations, (Spe-ed™ SFE) at temperatures

Figura 53 – Resumo da comunicação em painel no 1.º Encontro Ibérico de Fluidos Supercríticos em Santiago de Compostela, 18-19 de Fevereiro de 2020.

from 313.2 to 333.2 K, pressures up to 40.0 MPa and CO₂ flow rates from 0.12 kg/h to 0.32 kg/h [3].

Analysis of the extracted oils by GC-FID, revealed the composition of the oils being oleic acid 52%, the main compound, followed linoleic acid 29%, palmitic acid 15%, and stearic acid 1.6%. To estimate the susceptibility to oxidation of oils, the allylic position equivalent (APE) and bis-allylic position equivalent (BAPE) [4] indexes and oxidizability (OX) [5] were calculated using the content of each fatty acid. Moreover, there was a slight difference in extraction kinetics in the relative percentage of the total unsaturation index (UI).

A discussion of the modelling of our data on supercritical fluid extraction of rice bran oil was carried out. The results obtained at different extraction conditions using only one [6] or two [7] adjustable parameter, provided a fairly good agreement between the model curves and the experimental data, which evidence the capability of these models.

ACKNOWLEDGEMENTS

J.P. Coelho acknowledge the funding received from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement N° 778168 and are thankful for the financial support from Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal, under projects UID/QUI/00100/2019.

REFERENCES

- [1] B.O. Juliano, P.A. Hicks, *Food Rev. Int.* 12, 71–103, 1996.
- [2] P. Sookwong, S. Mahatheeranont, *J. Oleo Sci.* 66(6), 557-564, 2017
- [3] J.P.Coelho, A.F. Mendonça, A.F. Palavra, R.P. Stateva, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 50, 4618-4624, 2011.
- [4] G. Knothe, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 847-854, 2002.
- [5] M. Kumar, M.P. Sharma, *J. Renew. Sust. Energy Rev.* 44, 814-823, 2015.
- [6] H. Sovová, *Chem. Eng. Sci.* 49(3), 409-414, 1994.
- [7] H. Sovová, *J. Supercritical Fluids* 33(1), 35-52, 2005.

Figura 53 (continuação) - Resumo da comunicação em painel no 1.º Encontro Ibérico de Fluidos Supercríticos em Santiago de Compostela, 18-19 de Fevereiro de 2020.

Anexo G – Modelação matemática de transferência de massa dos resultados experimentais

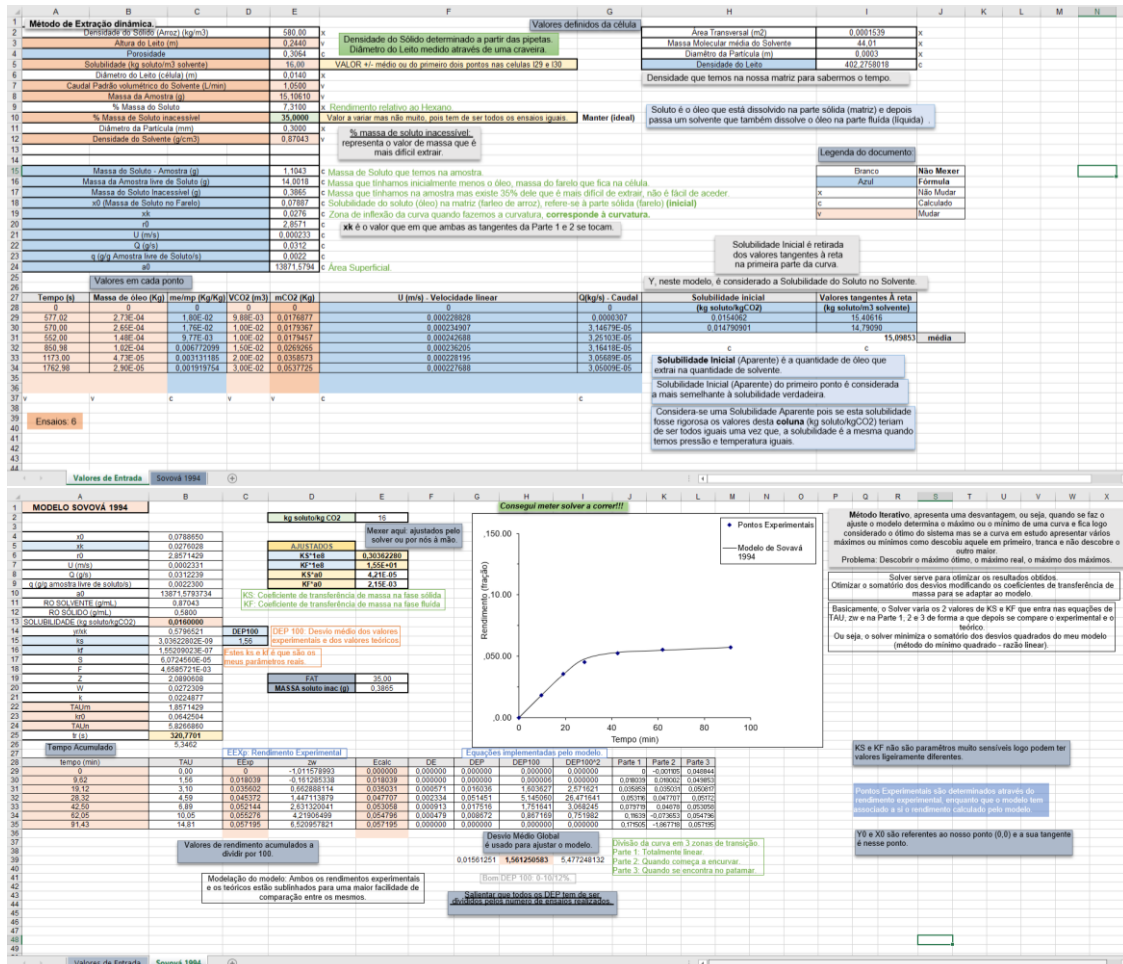


Figura 54 - Exemplo de um documento em Microsoft Excel referente ao modelo I, de Sovová 1994.

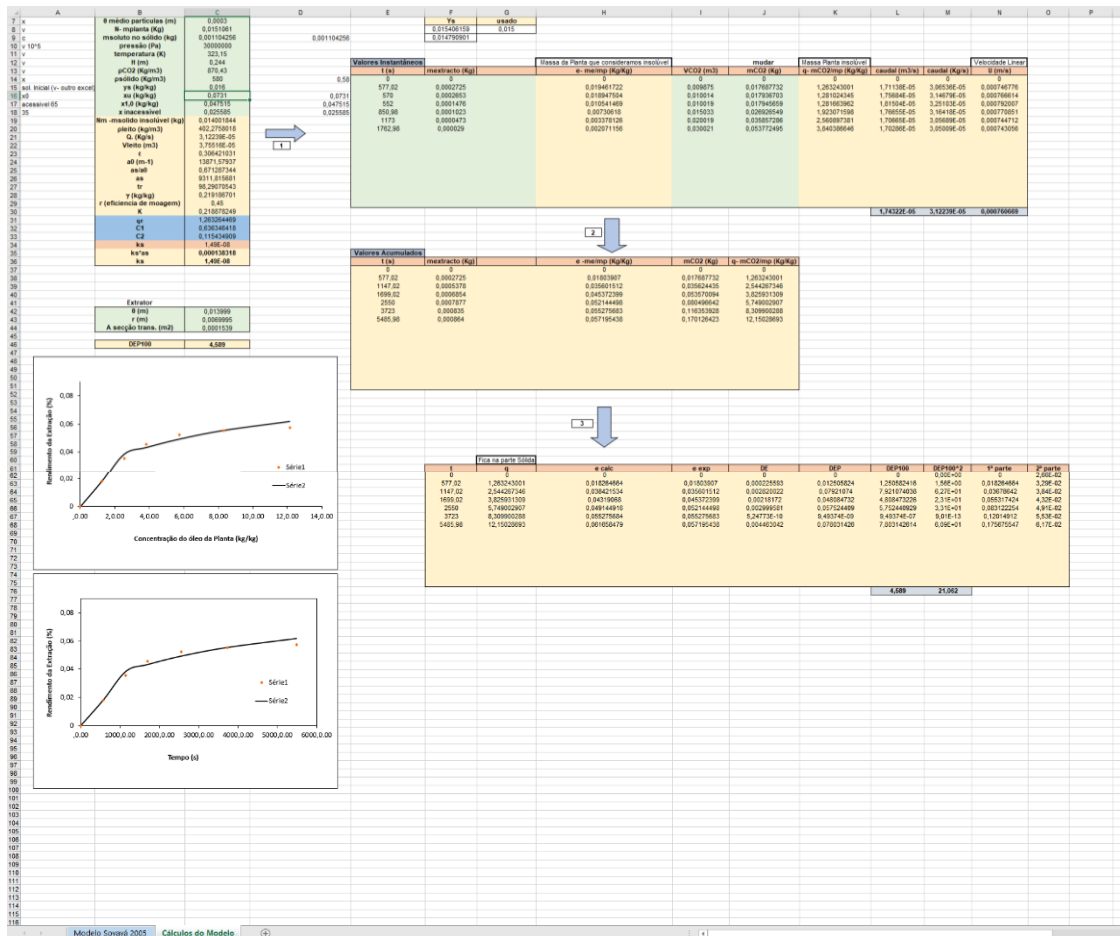


Figura 55 - Exemplo de um documento em Microsoft Excel referente ao modelo II, de de Sovová 2005.

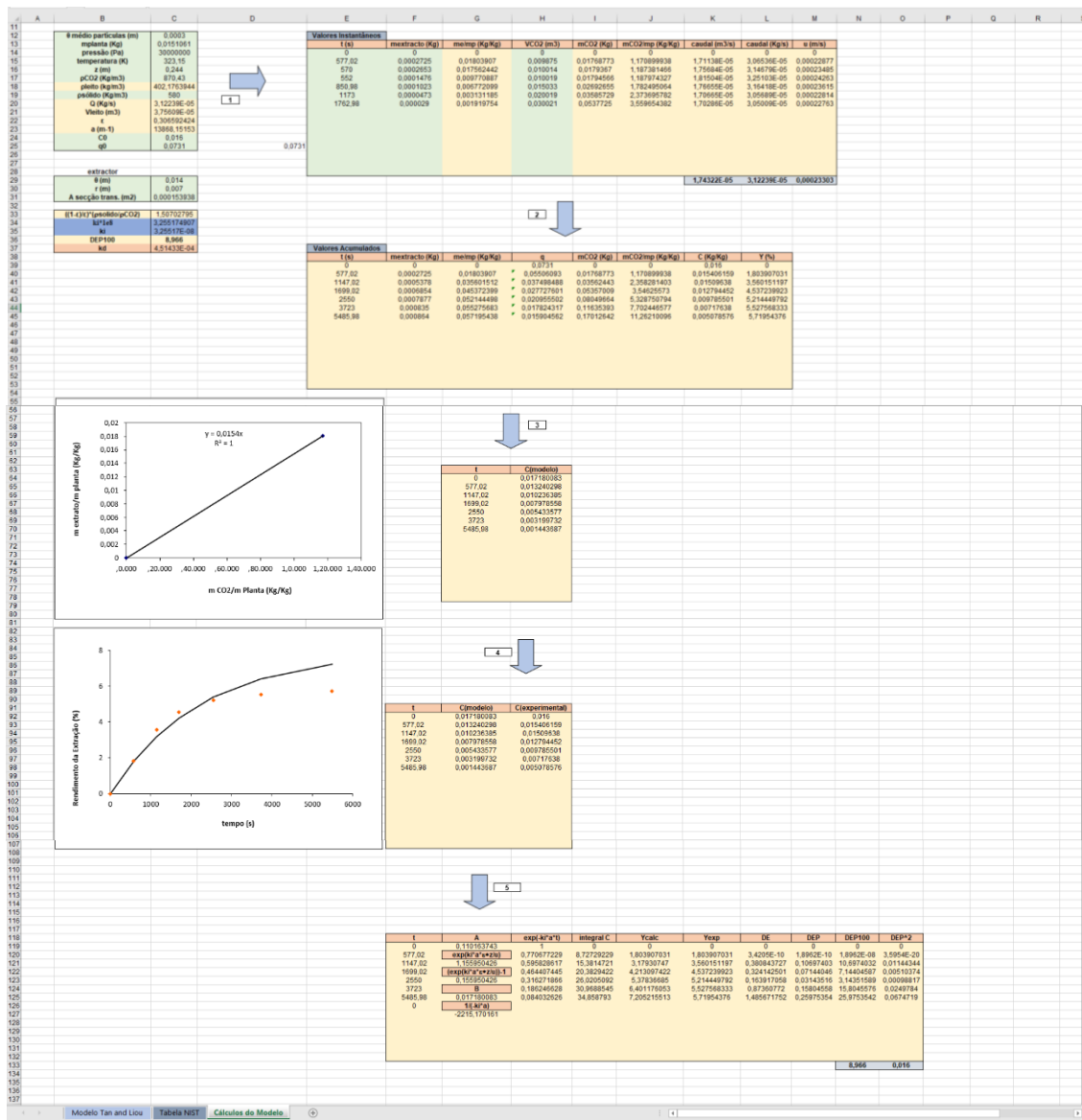


Figura 56 - Exemplo de um documento em Microsoft Excel referente ao modelo III, o de Tan e Liou 1989.