

DM

Resíduos da Indústria Agro-Alimentar Como Possíveis Fontes de Ácido Ferúlico

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pedro Diogo Ideia Freitas
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

janeiro | 2016

Resíduos da Indústria Agro-Alimentar Como Possíveis Fontes de Ácido Ferúlico

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pedro Diogo Ideia Freitas

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADORA

Paula Cristina Machado Ferreira Castilho



RESÍDUOS DA INDÚSTRIA AGRO-ALIMENTAR COMO POSSÍVEIS FONTES DE ÁCIDO FERÚLICO

Esta dissertação foi desenvolvida na linha de Produtos Naturais do Centro de Química da Madeira (CQM), sob a orientação da Professora Doutora Paula Cristina Machado Ferreira Castilho. Foi apresentada à Universidade da Madeira, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada.

Pedro Diogo Ideia Freitas

2016

Funchal, Madeira - Portugal

“A curiosidade é mais importante do que o conhecimento.”

Albert Einstein

Agradecimentos

À Empresa de Cervejas da Madeira (ECM), na pessoa do Sr. Engenheiro Nuno Branco, pelo fornecimento das amostras de dreche.

À Professora Doutora Paula Cristina Machado Ferreira Castilho, orientadora do presente projecto, por toda a orientação prestada ao longo dos meses de trabalho. Agradeço-lhe também a autonomia que incute aos seus alunos, obrigando-os a crescer pessoal e profissionalmente, embora que muitas vezes à força de “café, suor e lágrimas”.

Aos meus colegas de laboratório agradeço todo o suporte ao longo da execução do trabalho prático. Agradeço, em especial, à minha colega e amiga Joana Carolina Nunes Pinto, que me acompanha desde o primeiro ano no Ensino Superior e que assumiu um papel tão fundamental, através da sua calma, apoio e, acima de tudo, diversão e espírito de partilha.

À Doutora Rosa Perestrelo pela paixão que aplica em todo seu trabalho. Quero agradecer-lhe pela pessoa que é e pela ajuda no desenrolar deste trabalho, não só no campo laboratorial mas também pela revisão desta dissertação.

Ao Professor Doutor Pedro Filipe Duarte Louzeiro Pires, pelo auxílio no tratamento dos resultados referentes ao estudo da cinética de adsorção.

Às *Paulas* (Paula Andrade e Paula Sousa), técnicas de laboratório, pela prontidão na resposta aos (muitos) pedidos de materiais e reagentes, aos quais respondem sempre com um sorriso.

À empresa LANXESS pelo fornecimento da amostra de resina sintética utilizada no presente trabalho.

Ao Centro de Química da Madeira, pela utilização de materiais e equipamentos sem os quais a concretização deste trabalho não seria possível.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projecto PEst-OE/QUI/UI674/2013 (CQM, fundos do Governo Português) e da Rede Nacional de Espectrometria de Massa (RNEMREDE/1508/REM/2011).

Porque por vezes um pequeno gesto ou uma palavra de apreço ajudam a continuar motivado e focado, quero também cumprimentar o Sr. Coordenador do CQM, Professor Doutor João Manuel Cunha Rodrigues por quem nutro grande carinho e estima.

À Professora Doutora Helena Maria Pires Gaspar Tomás, regente da Unidade Curricular onde se insere a presente dissertação, quero igualmente cumprimentar.

Aos meus pais e ao meu irmão por, mesmo em momentos mais complicados ou decisivos, nunca me terem deixado desistir ou desmotivar. Agradeço-lhes profundamente o amor que me transmitiram e transmitem todos os dias e, também a eles, dedico o trabalho desenvolvido em prol desta dissertação.

Ao Ivo Miguel Sousa Ferreira que por muitas vezes me transmitiu a força necessária para ultrapassar diversos obstáculos não só a nível profissional mas também pessoal. A ele devo toda a ajuda e entrega prestada ao longo dos últimos anos.

Àqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a concretização desta etapa tão importante, muito obrigado!

Resumo

A indústria agro-alimentar produz anualmente uma grande quantidade de subprodutos, ainda tratados como desperdício. A indústria cervejeira, em particular, está associada à produção de vários resíduos, entre os quais o bagaço de malte, também designado bagaço de cerveja ou dreche. Sendo produzida numa razão de 20 kg por cada 100 litros de cerveja, só na Ilha da Madeira a produção de dreche ultrapassa as 2000 toneladas/ano.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de estudar a utilização da dreche como material de partida para a extracção de ácido ferúlico, um ácido hidroxicinâmico com elevada bioactividade e aplicações.

A caracterização físico-química da dreche permitiu determinar um teor de humidade de aproximadamente 70% e um teor de cinzas de cerca de 3,6%. A distribuição granulométrica da dreche seca, revelou que cerca de 70% das partículas que a constituem têm dimensão entre 1 e 0,25 mm. A extracção com acetona produziu um extracto contendo 5 compostos de natureza fenólica, determinados por LC-MS.

A hidrólise alcalina – uma das técnicas que permitem a extracção de compostos como o ácido ferúlico a partir de matrizes lenhocelulósicas – foi estudada em amostras de dreche submetidas a tratamento prévio. O pré-tratamento com ácido diluído demonstrou ser eficiente na extracção do ácido ferúlico a partir da dreche.

A extracção em autoclave mostrou ser eficiente na extracção do ácido ferúlico [0,28% (m/m)] e uma simplificação do procedimento posterior à reacção de hidrólise alcalina fez aumentar o rendimento de extracção em cerca de 84%, comparativamente ao procedimento habitual. As condições óptimas de hidrólise alcalina em tubos autopressurizados aconteceram a 120 °C, por 1,5 horas, num rácio de 20 mL/g e NaOH (1,5%).

O processo de purificação do ácido ferúlico extraído por adsorção numa resina sintética resultou em percentagens de adsorção de 90,83% e de dessorção em torno dos 68,70%.

Palavras-chave: dreche, extracção, hidrólise alcalina, ácido ferúlico.

Abstract

The food industry produces a large amount of by-products every year. These by-products are still treated as waste due to the fact that they don't have direct applications. The brewing industry, in particular, is associated with the production of several residues, including brewer's spent grain (BSG). In Madeira Island only the BSG production exceeds 2,000 tons/year, produced at a rate of 20 kg per 100 liters of beer.

This work was carried out to study the use of BSG as starting material for extraction of ferulic acid (FA), a hydroxycinnamic acid with several bioactive properties and applications.

The physico-chemical characterization of BSG showed a moisture content of approximately 70% and an ash content of about 3.6%. The particle size distribution of the dry BSG revealed that about 70% of the particles have dimensions 1 and 0.25 mm. The extraction with acetone yielded an extract containing 5 compounds of phenolic compounds, as determined by LC-MS.

Alkaline hydrolysis - of the techniques that enable the extraction of compounds such as FA from lignocellulosic materials - was studied in BSG samples subjected to pretreatment. The pretreatment with dilute acid proved to be efficient in the extraction of FA from BSG.

The extraction in autoclave proved to be efficient in the extraction of FA [0.28% (w/w)] and a simplification of the procedure which followed the alkaline hydrolysis reaction increased the yield of extraction in about 84%. The optimal conditions for alkaline hydrolysis in auto pressurized tubes occurred at 120 °C for 1.5 hours in a ratio of 20 mL/g and NaOH (1.5%).

The extracted FA purification process by adsorption on a synthetic resin resulted in adsorption percentages of 90.8% and desorption around 68.7%.

Keywords: brewer's spent grain, extraction, alkaline hydrolysis, ferulic acid.

Índice Geral

Agradecimentos	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice Geral.....	xi
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas	xvii
Lista de abreviaturas	xix
Nota introdutória.....	1
I. Introdução	3
1. Dreche	5
1.1. Visão geral sobre os processos de maltagem e fabrico de cerveja	5
1.2. Composição química da dreche	8
1.3. Preservação e armazenamento	11
1.4. Aplicações.....	12
2. Ácidos hidroxicinâmicos	19
2.1. Estrutura química	19
2.2. Biossíntese	20
2.3. Fontes naturais e ocorrência em alimentos.....	20
2.4. Propriedades farmacocinéticas	23
2.5. Biodisponibilidade	25
3. Ácido ferúlico.....	27
3.1. Propriedades bioactivas	28
3.2. Aplicações.....	31
3.3. Extracção a partir de biomassa	32
3.4. Métodos de extracção de ácido ferúlico a partir da dreche.....	34
3.5. Purificação	37
II. Parte Experimental	41
1. Materiais e equipamentos	43

1.1.	Dreche	43
1.2.	Reagentes, compostos de referência e equipamentos	43
2.	Caracterização físico-química da dreche.....	43
2.1.	Determinação do teor de humidade	43
2.2.	Determinação do teor de cinzas	43
2.3.	Determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix)	43
2.4.	Determinação da distribuição granulométrica.....	44
2.5.	Determinação do teor de extractáveis	44
3.	Hidrólise alcalina	46
3.1.	Efeito do tratamento prévio das amostras de dreche	48
3.2.	Efeito da extracção por autoclave	48
3.3.	Simplificação do procedimento subsequente à hidrólise alcalina	49
3.4.	Análise dos extractos obtidos.....	51
3.5.	Optimização das condições de hidrólise alcalina por variação individual dos parâmetros experimentais	52
4.	Quantificação de ácido ferúlico nas amostras por HPLC-DAD	53
4.1.	Preparação das amostras	53
4.2.	Preparação das soluções-padrão.....	53
4.3.	Análise por HPLC-DAD	53
5.	Estudo de adsorção em resina Lewatit VPOC1064 MD PH®.....	54
5.1.	Activação da resina.....	54
5.2.	Estudos de equilíbrio e cinética de adsorção	54
5.3.	Recuperação do material adsorvido	55
5.4.	Reciclagem da resina.....	55
5.5.	Estudo sobre a adsorção de açúcares	55
5.6.	Purificação do extracto resultante da hidrólise alcalina	56
III.	Resultados e Discussão	59
1.	Caracterização físico-química da dreche.....	61
1.1.	Determinação do teor de humidade	61

1.2.	Determinação do teor de cinzas	61
1.3.	Determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix)	61
1.4.	Determinação da distribuição granulométrica.....	61
1.5.	Determinação do teor de extractáveis	63
2.	Hidrólise alcalina	66
2.1.	Efeito do tratamento prévio das amostras de dreche	66
2.2.	Efeito da extracção por autoclave	69
2.3.	Simplificação do procedimento subsequente à hidrólise alcalina	72
2.4.	Optimização das condições de hidrólise alcalina por variação individual... 73	
3.	Estudo de adsorção em resina Lewatit VPOC1064 MD PH®	76
3.1.	Estudos de equilíbrio e cinética de adsorção	76
3.2.	Reciclagem da resina.....	82
3.3.	Estudo sobre a adsorção de açúcares	83
3.4.	Purificação do extracto resultante da hidrólise alcalina	83
IV.	Conclusões e Perspectivas Futuras	87
V.	Referências	93
VI.	Anexos	105
	Anexo A: Reagentes e compostos de referência.....	107
	Anexo B: Equipamentos.....	108
	Anexo C: Rectas de calibração	109

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema sobre os processos de maltagem e fabrico de cerveja, a partir dos quais se obtém a dreche. Traduzido e adaptado de Mussatto <i>et al.</i> (2006) [2]. ...	7
Figura 2 - Estrutura dos monossacarídeos que compõem a hemicelulose. Adaptado de Fengel e Wegener (1989) [12].	9
Figura 3 - Ligações (éster e éter) entre a lenhina e polissacáridos nas paredes celulares vegetais. Adaptado de Krause <i>et al.</i> (2003) [13].	10
Figura 4 - Complexo lenhina/fenólico-hidrato de carbono. Adaptado de [14], revisto por [15].	10
Figura 5 – Anatomia de um grão de cereal, com realce para o pericarpo, endosperma e embrião. Adaptado de [39].....	18
Figura 6 - Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos.	19
Figura 7 - Ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico).	19
Figura 8 – Biossíntese de ácidos hidroxicinâmicos a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina em plantas. Adaptado de Zhao e Moghadasian (2008) [43].....	20
Figura 9 - Absorção transepitelial do ácido clorogénico. Adaptado de Konishi e Kobayashi (2004) [52]......	24
Figura 10 - Estabilização por ressonância do radical ferúlico. Fonte: Paiva <i>et al.</i> (2003) [54].	27
Figura 11 – Estrutura e constantes de dissociação do ácido ferúlico, determinadas potenciométricamente por Ozkorucuklu <i>et al.</i> (2009) [57].	28
Figura 12 – Teor de ácido ferúlico em diferentes tipos de dreche, usando a extracção assistida por microondas. Adaptado de Moreira <i>et al.</i> (2012) [78].....	33
Figura 13 - Hidrólise alcalina da lenhina (complexo lenhina/fenólico-hidrato de carbono). Adaptado de Kato e Nevins (1985) [80],	34
Figura 14 - Estrutura do ácido ferúlico esterificado à unidade de arabinose do arabinoxilano. Adaptado de Martins <i>et al.</i> (2011) [82].	35
Figura 15 - Clivagem da ligação éter, entre a lenhina e o ferulato, com formação de uma quinona. Adaptado de Harmsen <i>et al.</i> (2010) [85]......	36
Figura 16 - Esquema geral para o procedimento do tratamento aos hidrolisados obtidos por hidrólise alcalina, também ilustrada.	47
Figura 17 - Esquema do procedimento de tratamento dos hidrolisados obtidos por hidrólise alcalina. A Parte A (inserida no rectângulo a inteiro) corresponde ao procedimento habitual, com separação da lenhina insolúvel e posterior precipitação e separação da fracção de hemicelulose. A Parte B (inserida no rectângulo a tracejado) corresponde à proposta de simplificação do procedimento,	

em que a precipitação da hemicelulose (promovida por adição de etanol) é levada a cabo ainda na presença da fracção de lenhina insolúvel, sendo estas duas separadas posteriormente do sobrenadante. Todo o processo seguinte é desenvolvido de forma semelhante, nomeadamente a neutralização do sobrenadante, evaporação do etanol em evaporador rotativo, liofilização da fracção aquosa daí resultante e análise por HPLC-DAD.....	50
Figura 18 - Neutralização do radical DPPH.....	51
Figura 19 - Esquema para a purificação do extracto resultante da hidrólise alcalina por adsorção.....	56
Figura 20 - Distribuição granulométrica da dreche.....	62
Figura 21 - Análise por HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ do extracto resultante da extracção da dreche com acetona (60%).....	64
Figura 22 – Resultados obtidos para o rendimento e concentração de ácido ferúlico nos ensaios de optimização da temperatura de extracção.	74
Figura 23 - Resultados obtidos para o rendimento e concentração de ácido ferúlico nos ensaios de optimização do tempo de reacção.	74
Figura 24 - Resultados obtidos para o rendimento e concentração de ácido ferúlico nos ensaios de optimização da concentração da solução alcalina	75
Figura 25 - Evolução da percentagem de adsorção obtida para os ensaios de adsorção com efeito da dispersão do ácido ferúlico na solução inicial.	77
Figura 26 - Resultados obtidos para os ensaios de cinética de adsorção, com estudo do efeito da dispersão do ácido ferúlico na solução inicial.....	78
Figura 27 - Resultados obtidos para os ensaios de cinética de adsorção, com estudo do efeito da concentração da solução inicial de ácido ferúlico.....	80
Figura 28 - Resultados obtidos para os ensaios de cinética de adsorção, com estudo do efeito da temperatura da mistura de adsorção.....	81
Figura 29 - Resultados obtidos para os ensaios de adsorção de açúcares, por adição de 3 mL de solução de sacarose, glucose e arabinose (10 g/L) a 0,15 g de resina, com agitação por 1 hora.	83

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição química da dreche. Adaptado de Mussatto (2013) [4].....	8
Tabela 2 - Conteúdo em ácidos hidroxicinâmicos em alimentos.	21
Tabela 3 - Concentração em ácido ferúlico obtida por diferentes condições de extracção, em amostras de dreche com e sem pré-tratamento.....	36
Tabela 4 - Descrição dos parâmetros em optimização nos ensaios de optimização da hidrólise alcalina.	52
Tabela 5 - Indicação dos parâmetros individuais de optimização nos ensaios de optimização da hidrólise alcalina.	52
Tabela 6 - Resultados obtidos na determinação da distribuição granulométrica da dreche.	62
Tabela 7 - Caracterização dos compostos fenólicos extractáveis com acetona (60%), a partir da dreche.	65
Tabela 8 - Resultados médios globais obtidos para os extractos obtidos aquando dos ensaios de hidrólise alcalina da dreche pré- e pós-extracção com acetona (60%).	66
Tabela 9 - Resultados médios globais obtidos para os extractos obtidos aquando dos ensaios de hidrólise alcalina da dreche com e sem pré-tratamento com ácido diluído.....	68
Tabela 10 - Resultados médios globais obtidos para os extractos obtidos aquando dos ensaios de hidrólise alcalina em tubos autopressurizados e em autoclave.....	70
Tabela 11 – Resultados médios globais obtidos para os liofilizados obtidos aquando dos ensaios levados a cabo com o procedimento habitual e com o processo simplificado.....	72
Tabela 12 - Condições experimentais para os ensaios de adsorção relativos ao estudo do efeito da dispersão do ácido ferúlico na mistura de adsorção.	76
Tabela 13 - Valores tomados pelas variáveis (A a E) para adaptação da equação aos resultados obtidos nos ensaios cinética de adsorção, com estudo do efeito da dispersão do ácido ferúlico na mistura de adsorção.	79
Tabela 14 - Condições experimentais para os ensaios de adsorção relativos ao estudo do efeito da variação da concentração do ácido ferúlico na solução inicial.	79
Tabela 15 - Valores tomados pelas variáveis (A a E) para adaptação da equação aos resultados obtidos nos ensaios cinética de adsorção, com estudo do efeito da concentração da solução inicial de ácido ferúlico na mistura de adsorção.....	80
Tabela 16 - Condições experimentais para os ensaios de adsorção relativos ao estudo do efeito da temperatura na mistura de adsorção.	81

Tabela 17 - Valores tomados pelas variáveis (A a E) para adaptação da equação aos resultados obtidos nos ensaios cinética de adsorção, com estudo do efeito da temperatura da mistura de adsorção.	82
Tabela 18 - Resultados obtidos para os ensaios sobre a reciclagem da resina, expressos em percentagem de adsorção.	82
Tabela 19 - Resultados obtidos para os extractos intervenientes no processo de purificação do extracto inicial por adsorção em resina.	84

Lista de abreviaturas

·OH	Radical hidroxilo
4NQO	4-nitroquinolina-1-óxido (<i>4-Nitroquinoline-1-oxide</i>)
AOM	Azoximetano (<i>azoxymethane</i>)
CA	Ácido cafeico (<i>cafeic acid</i>)
CQA	Ácido clorogénico (<i>chlorogenic acid</i>)
DAD	Detector de arranjo de díodos (<i>Diode-array detector</i>)
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>)
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> (<i>Electrospray ionization</i>)
FA	Ácido ferúlico (<i>ferulic acid</i>)
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
GA	Ácido gálico (<i>gallic acid</i>)
GST	Glutathiona S-transferase (<i>Glutathione S-Transferase</i>) EC 2.5.1.18
H ₂ O ₂	Radical peróxido
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
MS	Espectrometria de massa (<i>Mass spectrometry</i>)
NAT2	Arilamina N-acetiltransferase (<i>N-Acetyltransferase-2</i>) EC 2.3.1.5
O ₂ ^{-·}	Radical superóxido
PAL	Fenilalanina amónia liase (<i>Phenylalanine ammonia lyase</i>) EC 4.3.1.24
p-CA	Ácido <i>para</i> -cumárico (<i>p-coumaric acid</i>)
QR	Quinona reductase (<i>Quinone reductase</i>) EC 1.6.5.5
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (<i>Reactive oxygen species</i>)

SA	Ácido sinápico (<i>sinapic acid</i>)
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
TAL	Tirosina amónia liase (<i>Tyrosine ammonia lyase</i>) EC 4.3.1.23
TPC	Conteúdo/teor total de fenólicos (<i>Total phenolic content</i>)
t _R	Tempo de retenção
TSS	Conteúdo/teor total de sólidos solúveis (<i>Total soluble solids</i>)
TXA ₂	Tromboxano A ₂

Nota introdutória

O presente projecto, desenvolvido no Laboratório de Produtos Naturais e Química Orgânica (NatLab), do Centro de Química da Madeira (CQM), surge no seguimento da necessidade crescente na redução e/ou valorização de resíduos do sector industrial. Neste caso concreto, foi estudada a dreche, o principal sub-produto sólido da indústria cervejeira.

A dissertação encontra-se organizada em capítulos, sendo que no Capítulo I tem lugar a Introdução, onde é feita a contextualização do tema em estudo, dos processos que permitem a obtenção do material de partida (dreche), bem como das suas formas de preservação e armazenamento, aplicações e caracterização físico-química. Ainda neste capítulo é feita uma revisão sobre os ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente em termos da sua estrutura química, biossíntese, fontes naturais e das suas propriedades farmacocinéticas e biodisponibilidade. O terceiro subcapítulo, desta feita dedicado ao ácido ferúlico, dá conta das suas propriedades químicas e bioactividade, assim como das suas aplicações e da extracção a partir da biomassa. O capítulo termina com uma visão mais detalhada sobre alguns dos métodos de extracção e purificação do ácido ferúlico a partir da dreche, reportados na literatura.

O Capítulo II, da *Parte Experimental*, compila os materiais e métodos aplicados na parte prática deste trabalho, desde a recolha da dreche até a sua caracterização físico-química. São também referidas as metodologias utilizadas tendo em vista o estudo do efeito do tratamento prévio da dreche, assim como do método de extracção e o tratamento posterior à extracção propriamente dita. O capítulo termina com a optimização das condições de hidrólise alcalina e com a metodologia associada à purificação do ácido ferúlico por adsorção numa resina sintética, onde se desenvolveram estudos de cinética de adsorção, de recuperação do material adsorvido e reutilização do adsorvente.

Os resultados são apresentados e discutidos no Capítulo III, sendo o Capítulo IV dedicado às conclusões e perspectivas futuras ao presente projecto. As referências utilizadas constituem o penúltimo capítulo desta dissertação, que termina com alguns anexos, que compilam informação pertinente mas não essencial para a leitura do trabalho.

I. Introdução

1. Dreche

A dreche, ou bagaço de cerveja, é obtida aquando do processo de fabrico da cerveja, sendo o principal subproduto sólido desta indústria. Apesar de apresentar um elevado valor nutritivo, tem recebido ainda pouca atenção enquanto matéria-prima. De um ponto de vista económico e ecológico, o actual destino da dreche para a ração animal pode ser considerado uma boa solução. No entanto, sendo constituída por cerca de 20% de proteínas e 28% de polissacarídeos não celulósicos (essencialmente arabinoxilanos), a sua utilização poderá estender-se à utilização das fibras alimentares e proteínas na nutrição humana e assim obter uma maior valorização da matriz. [1]

Actualmente existe uma grande pressão social, política e económica relacionada com a redução de resíduos produzidos pelas actividades industriais. Quase todos os países desenvolvidos e/ou em vias de desenvolvimento trabalham no sentido de se adaptarem a esta realidade através da modificação dos seus processos para que os resíduos daí provenientes possam ser reutilizados. Em consequência disso, as maiores companhias deixaram de considerar os resíduos como um desperdício mas antes como uma matéria-prima para outros processos. A dreche está disponível a baixo-custo durante todo o ano e é produzida em grandes quantidades, não só por grandes companhias mas também por pequenas empresas de produção de cerveja [2].

A quantidade de dreche produzida ronda os 20 kg por cada hectolitro de cerveja [3], não devendo este valor variar consideravelmente entre diferentes companhias de produção cervejeira. De acordo com a Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja, a produção nacional atingiu, em 2014, 7289620 hl, perfazendo uma quantidade de dreche superior a 145000 toneladas. A produção mundial ronda as $38,6 \times 10^6$ toneladas/ano [4].

Na Ilha da Madeira a Empresa de Cervejas da Madeira produz cerca de 2000 toneladas de dreche por ano (aproximadamente 600 toneladas em peso seco), o que constitui uma grande quantidade de resíduo e, possivelmente, um problema ambiental. Actualmente este resíduo é fornecido a agricultores a preço simbólico, tendo em vista a sua utilização na alimentação de gado. Contudo, continua largamente excedentária.

1.1. Visão geral sobre os processos de maltagem e fabrico de cerveja

A cevada é o quarto cereal mais importante no mundo, logo atrás do milho, trigo e arroz, sendo utilizado principalmente na alimentação animal e na produção de cerveja [2]. A dreche é o maior subproduto sólido gerado durante o processo de fabrico da cerveja, resultando do passo de elaboração do mosto [5].

O processo de fabrico de cerveja começa com a colheita da cevada que é separada de acordo com o seu tamanho [2]. Após um período de dormência, a cevada segue para o processo de maltagem, realizado em três etapas: embebição, germinação e secagem. O processo de embebição começa com a hidratação dos grãos de cevada, por cerca de dois dias em tanques com água, atingindo um teor de humidade de aproximadamente 48%, sendo a água mudada a cada 6-8 horas. A hidratação daqui resultante dá início ao próximo passo – a germinação. A cevada hidratada é então colocada em recipientes de germinação, onde é mantida em contacto com uma corrente de ar húmido que mantém a temperatura em torno dos 15 a 21 °C, promovendo a síntese e activação de enzimas no endosperma, nomeadamente amilases [catalisadoras da hidrólise da amilopectina], proteases [promovem a quebra de ligações peptídicas entre aminoácidos] e β -glucanases [quebra de ligações glicosídicas em β -glucano], entre outras, modificando a própria estrutura do endosperma. Normalmente, 6 ou 7 dias após o início da germinação a cevada, agora maltada, é seca a 40-60 °C até um teor de humidade de 4 a 5%, com o intuito não só de evitar a contaminação microbiana, mas também de permitir um produto estável, capaz de ser armazenado e transportado. Este passo permite, de igual forma, a preservação enzimática, ficando o malte armazenado por 3 ou 4 semanas.

No que se refere ao processo de fabrico da cerveja propriamente dito, a cevada maltada é moída, misturada com água num tonel – designado *tonel de mosto* ou *recipiente de brassagem* – e a temperatura é lentamente elevada de 37 a 78 °C para promover a hidrólise enzimática dos constituintes do malte. Durante o processo, o amido é convertido [num processo denominado *sacarificação*] a açúcares fermentáveis (principalmente maltose e maltotriose) e não fermentáveis (como as dextrinas), sendo as proteínas parcialmente degradadas a polipéptidos e aminoácidos. Durante esta etapa produz-se uma fase líquida doce, conhecida como *mosto*. A fracção insolúvel e não degradada da cevada é deixada em repouso, e o mosto é filtrado através da fracção sólida e usado como meio de fermentação para produzir cerveja. À fracção sólida residual dá-se o nome de *dreche* (Dragone *et al.* (2002), citado por Mussatto *et al.* (2006) [2]).

Em certos casos, dependendo do tipo de cerveja a produzir, outros cereais (por exemplo, o milho, a aveia e o sorgo) podem ser introduzidos juntamente com a cevada, na etapa de elaboração do mosto. Nesses casos, as fracções insolúveis desses aditivos são separados do mosto com a dreche, numa única fracção [4].

O processo anteriormente descrito encontra-se esquematizado na Figura 1 que ilustra: 1) o processo de maltagem, a partir do qual se obtém a cevada maltada; e 2) o processo de fabrico da cerveja, simplificado, a partir do qual se obtém o mosto – fracção líquida – que segue para os processos de fermentação e a fracção sólida – dreche. Por estarem fora do âmbito do presente trabalho, as restantes etapas da produção de cerveja não são descritas.

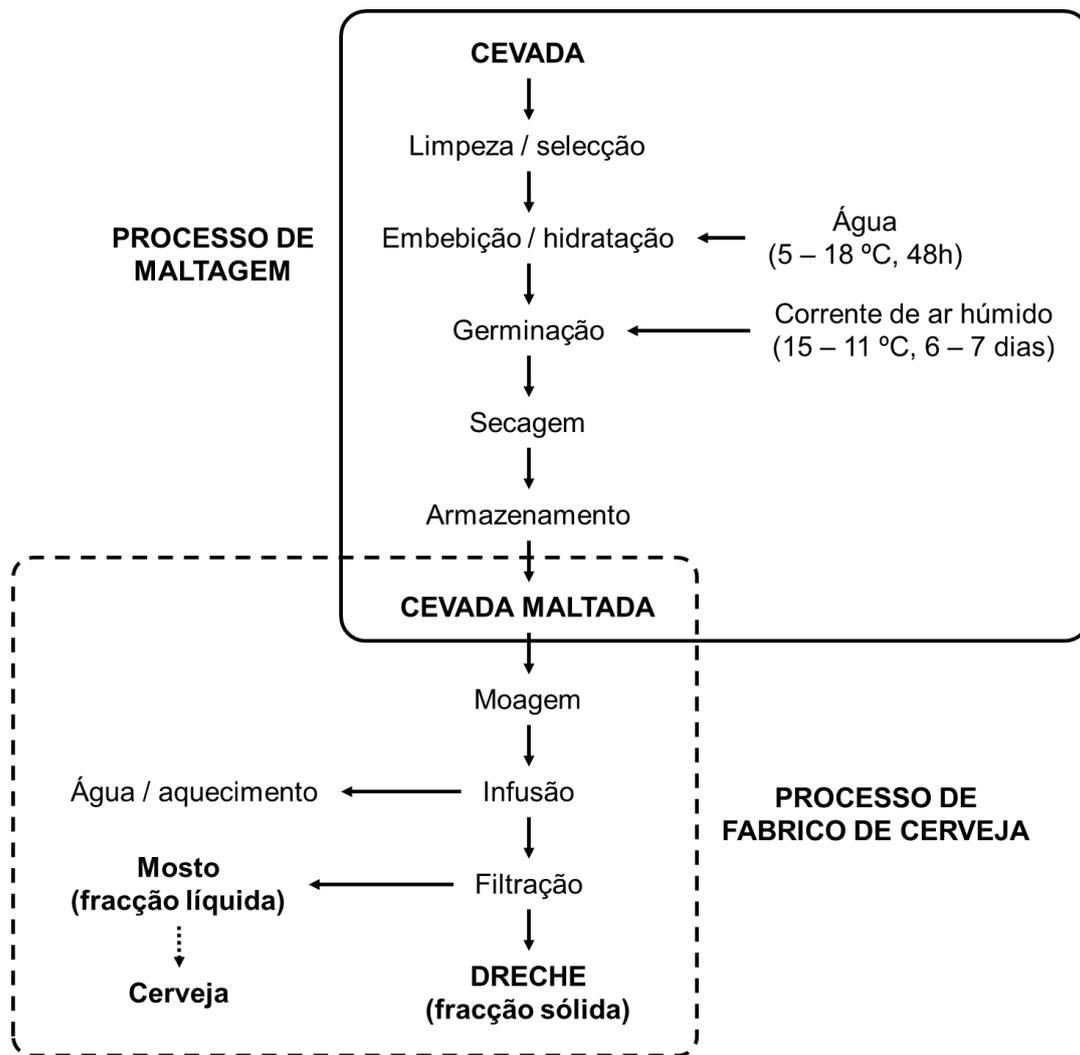


Figura 1 - Esquema sobre os processos de maltagem e fabrico de cerveja, a partir dos quais se obtém a dreche. Traduzido e adaptado de Mussatto *et al.* (2006) [2].

1.2. Composição química da dreche

A composição química da dreche é influenciada por diversos factores como a variedade da cevada utilizada, a altura de colheita, as condições de cultivo, o processo de maltagem aplicado e, mais importante, a quantidade e tipo de suplementos adicionados ao malte.

Independentemente dessas variações, a dreche aparece sempre como um material constituído principalmente por fibras (celulose, hemicelulose e lenhina) e proteínas. A Tabela 1 apresenta alguns dados de composição de dreche de várias origens compilados por Mussatto *et al.* (2013). As fracções hemicelulose e celulose constituem os principais polissacarídeos. A lenhina e as proteínas são duas fracções também muito importantes na composição da dreche. A fracção proteica é constituída em cerca de 30% por aminoácidos essenciais e 70% de aminoácidos não essenciais. De entre os minerais detectados na dreche destacam-se o silício, o fósforo e o cálcio [4].

Tabela 1 - Composição química da dreche. Adaptado de Mussatto (2013) [4].

Componente (% m/m)	Referência					
	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]
Celulose	21,7	16,8	25,4	21,9	25,3	26,0
Hemicelulose	19,2	28,4	21,8	29,6	41,9	22,2
Lenhina	19,4	27,8	11,9	21,7	16,9	n.d.
Proteína	24,7	15,3	24,0	24,6	n.d.*	22,1
Cinzas	4,2	4,6	2,4	1,2	4,6	1,1
Extractáveis	10,7	5,8	n.d.*	n.d.*	9,5	n.d.*

*n.d. indica *não determinado*.

A variabilidade reportada poderá estar relacionada mais com os métodos de extracção e análise das várias fracções do que com variabilidade real entre amostras, sendo que poucos autores quantificam todos os componentes.

Designam-se por *extractáveis* pequenas moléculas dissolvidas na água ou presentes nos tecidos vegetais numa forma livre, sendo separáveis por processos físicos. Contudo, embora compostos como os ácidos ferúlico e *p*-cumárico sejam abundantes na dreche, estes não se encontram na sua forma livre. Por essa razão, e tratando-se este de um trabalho cujo objectivo é a extracção de ácido ferúlico, para compreender a forma como este se liga à estrutura das paredes celulares vegetais, é necessário compreender a composição das mesmas, ainda que de forma abreviada.

De acordo com a revisão de Dann *et al.* (2006) [11], as paredes celulares vegetais são constituídas por vários açúcares (como a ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose, glucose, ácido galacturónico e ácido glucurónico) organizados em polissacáridos com diferentes composições e estruturas, tipicamente categorizadas como celulose, hemicelulose e pectinas. Por sua vez, estas estruturas aparecem complexadas com ácidos hidroxicinâmicos, lenhina, proteínas, iões e água.

As hemiceluloses são heteropolímeros, com uma estrutura linear ramificada constituídas por pentoses, hexoses, ácidos hexurónicos e desoxi-hexoses (Figura 2) [12].

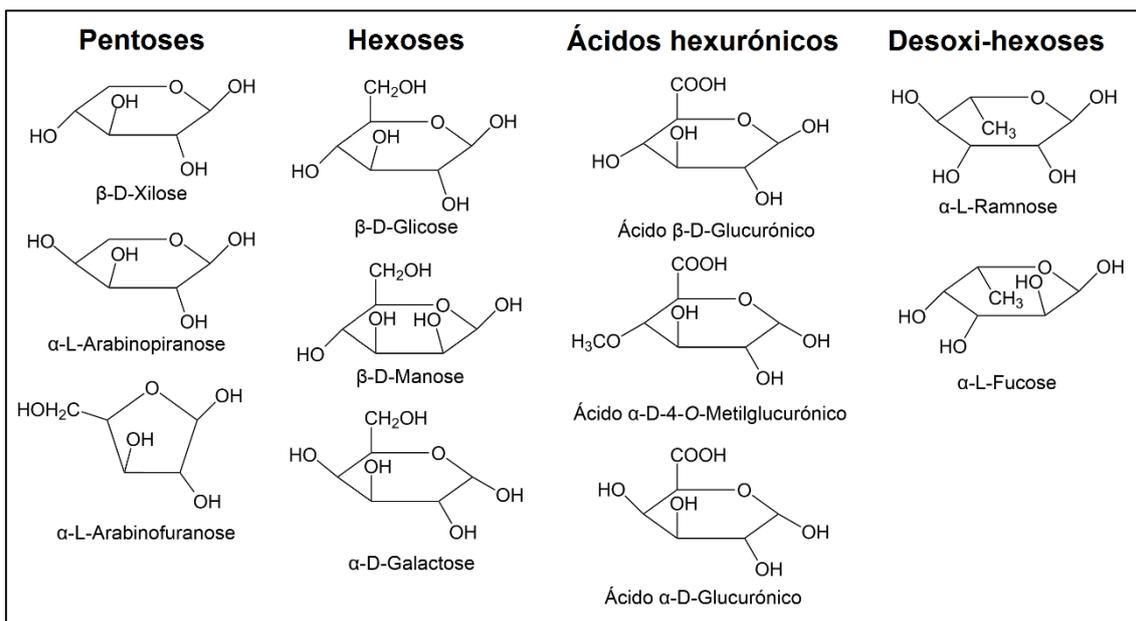


Figura 2 - Estrutura dos monossacáridos que compõem a hemicelulose. Adaptado de Fengel e Wegener (1989) [12].

A Figura 3, adaptada de Krause *et al.* (2003) [13], dá conta das diferentes ligações (éster e éter) entre os hidratos de carbono (representados como *polissacáridos*) e a lenhina nas paredes celulares vegetais. De entre essas ligações aparecem representadas (1) ligações éster directas, (2) ligações éter directas, (3) ésteres de ácidos hidroxicinâmicos, (4) éteres de ácidos hidroxicinâmicos, (5) pontes éter-éster de ácido ferúlico [entre a lenhina e os polissacáridos] e (6) pontes diéster de ácido dihidroferúlico [entre polissacáridos].

Assim, os ácidos hidroxicinâmicos (particularmente os ácidos *p*-cumárico e ferúlico) aparecem ligados à lenhina e polissacáridos (hidratos de carbono) *via* ligações éster e éter, formando os chamados *complexos lenhina/fenólicos-hidrato de carbono* (do inglês *lignin/phenolic-carbohydrate complexes*, item 5 da Figura 3 e ilustrados em pormenor na Figura 4).

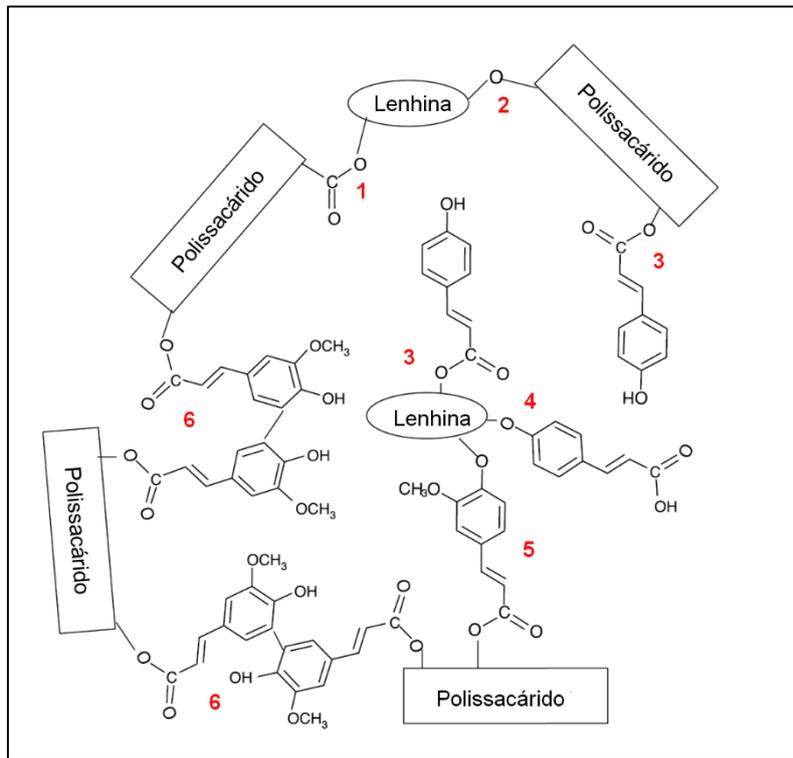


Figura 3 - Ligações (éster e éter) entre a lenhina e polissacáridos nas paredes celulares vegetais. Adaptado de Krause *et al.* (2003) [13].

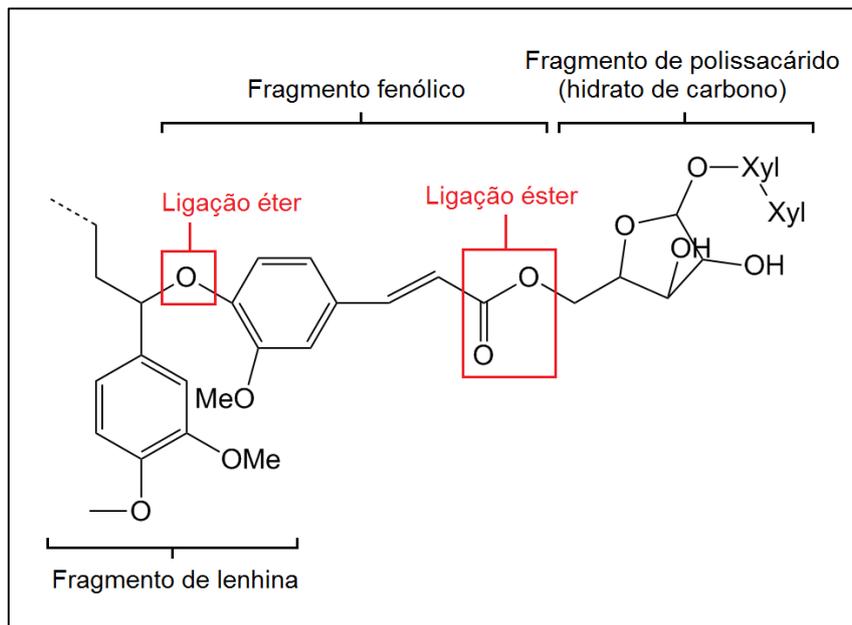


Figura 4 - Complexo lenhina/fenólico-hidrato de carbono. Adaptado de [14], revisto por [15].

O ácido ferúlico surge então ligado à lenhina por ligações éter e aos polissacáridos *via* ligações éster. Por esta razão, as técnicas convencionais de extracção (processos físicos como extracção sólido-líquido e líquido-líquido) não são eficientes no isolamento do ácido ferúlico, uma vez que este aparece covalentemente ligado à estrutura da lenhina. Existiu por isso a necessidade do desenvolvimento de outras metodologias (hidrotérmicas, químicas e enzimáticas) com vista à obtenção do ácido ferúlico livre. Um dos exemplos mais abordados na literatura é a hidrólise alcalina, um processo desenvolvido mais extensivamente adiante, nas secções dedicadas à *Extracção do ácido ferúlico a partir de biomassa* (secção 3.3, página 32) e *Métodos de extracção do ácido ferúlico a partir da dreche* (secção 3.4, página 34).

1.3. Preservação e armazenamento

Devido ao elevado teor de água que a dreche apresenta – que associado ao teor de polissacáridos e proteína a torna susceptível ao crescimento microbiano num curto período de tempo (7 a 10 dias) – diversos métodos de secagem foram reportados na literatura, reduzindo o seu volume e, conseqüentemente, baixando os custos associados ao seu transporte e armazenamento. De entre as técnicas referidas, são dignas de destaque a secagem fraccionada por pressão – em que a dreche é inicialmente prensada até um teor de humidade inferior a 60%, sendo depois sujeita a secagem até uma percentagem de humidade abaixo dos 10% – e por tambores rotativos – cilindros rotativos que fazem baixar o teor de humidade da amostra, por aumento da temperatura – embora considerado um processo energeticamente desfavorável. Existem ainda a liofilização e secagem em forno – processos que se demonstraram eficientes na redução do volume da dreche, assim como na manutenção da sua composição. Contudo, a liofilização não é um processo economicamente viável em grande escala [16].

Outra forma de secagem da dreche é por arrastamento de vapor superaquecido em camada fina, um método com diversas vantagens, nomeadamente na redução do impacto ambiental, uma vez que o processo acontece em circuito fechado e o vapor pode ser utilizado noutros processos, evitando-se ainda os riscos de incêndio ou explosão. Acresce ainda o facto de permitir uma elevada taxa de recuperação de compostos orgânicos voláteis de interesse [16].

Apesar dos benefícios associados aos processos de secagem da dreche, devido à crescente preocupação relacionada com os custos energéticos, muitas fábricas da indústria cervejeira, em particular aquelas em países em vias de desenvolvimento, não conseguem suportar os custos desta prática [16].

1.4. Aplicações

Todos os anos são produzidas grandes quantidades de dreche, pelo que diversos estudos apontam para a possibilidade da utilização deste resíduo para diversas aplicações. Existe a possibilidade da incorporação da dreche na alimentação animal e humana, da sua utilização como adsorvente e em materiais de construção. Também compostos de valor acrescentado podem ser extraídos ou produzidos a partir da dreche.

1.4.1. Alimentação

Uma das formas de reutilização da dreche pode ser através da sua incorporação em produtos alimentares. Esta aplicação tem por base duas abordagens distintas: (1) a incorporação directa da dreche na dieta ou como suplemento nutricional a determinados alimentos e (2) a recuperação de compostos de interesse a partir da dreche, seguida da sua inclusão nos produtos alimentares, promovendo os possíveis efeitos benéficos na saúde do consumidor [4]. A ingestão directa de dreche apresenta vários benefícios: devido à grande quantidade de fibras insolúveis (~97%), estando associada ao aumento do peso fecal, do trânsito intestinal, da excreção do colesterol e gorduras, assim como à diminuição dos cálculos biliares [17], quer em humanos, quer em animais.

São vários os trabalhos publicados, que tiveram por objectivo o estudo dos benefícios associados à introdução da dreche ou dos seus hidrolisados nas dietas animal e humana:

➤ Alimentação animal

Belibasakis e Tsirgogianni (1996) [18] estudaram os efeitos da ingestão de dreche na produção e composição do leite, assim como nos componentes sanguíneos de gado bovino. Os dados mostraram que a suplementação da alimentação dos bovinos com dreche (durante sensivelmente dois meses) resultou num aumento da produção de leite (de 21,7 para 24,8 kg/dia) e no aumento no seu conteúdo de gordura e sólidos totais, não se tendo verificado alterações na composição sanguínea dos animais.

A ingestão directa da dreche foi também estudada em peixes. No trabalho desenvolvido por Kaur e Saxena (2004) [19] farelo de arroz foi substituído por dreche (em 10 – 40%) na dieta de carpas. Os resultados mostraram que os grupos de peixes cuja dieta foi suplementada com dreche apresentaram um crescimento mais rápido, comparativamente a um grupo controlo, alimentado com a ração normal. Os autores atribuíram este resultado ao conteúdo de proteína da dreche.

Outros autores, revistos por Mussatto (2013) [4], desenvolveram trabalhos no sentido da utilização da dreche para alimentação de aves domésticas. Os resultados mostraram igualmente um aumento do peso corporal dos animais cuja dieta foi suplementada com dreche.

➤ **Alimentação humana**

Uma vez que a dreche deriva de matérias utilizadas para consumo humano, esta também pode ser incorporada na dieta humana, especialmente perante a necessidade de incremento do conteúdo de fibras [16]. Esta ingestão pode estar associada a diversos benefícios; Stojceska *et al.* (2008) [20] referem a associação das fibras dietéticas à prevenção de determinadas doenças incluindo cancro, distúrbios gastrointestinais, diabetes e doença cardíaca coronária. No trabalho realizado por esta equipa de investigadores foi estudado o efeito da incorporação da dreche nas propriedades funcionais e texturais de produtos *fast-food*. Apesar de não se terem verificado diferenças significativas no conteúdo de fenólicos totais, nem na capacidade antioxidante desses produtos antes e depois da incorporação da dreche na sua constituição, os resultados obtidos mostram que esta incorporação está associada ao aumento dos níveis de fibras dietéticas, bem como de proteínas. Contudo, por se tratar de uma matéria tipicamente escura, existem problemas associados à incorporação da dreche em alimentos, principalmente devido às suas propriedades organolépticas (em especial o aspecto físico), constituindo um factor determinante na aceitabilidade dos mesmos [21]. Desta feita, a dreche tem sido aplicada a alimentos originalmente escuros, de forma a evitar um grande impacto na sua cor.

Diversos trabalhos revistos por McCarthy *et al.* (2012) e por Mussatto (2013) relatam a incorporação da dreche em alimentos como *snacks*, pães e salsichas. A adição da dreche não só contribuiu para o enriquecimento dos alimentos em termos de fibras e proteína, como também para uma melhoria das suas propriedades texturais. Tendo por objectivo o estudo da aceitabilidade dos alimentos, diferentes trabalhos foram levados a cabo, verificando-se que a aceitabilidade aumenta com a diminuição do tamanho das partículas de dreche incorporada.

Como referido anteriormente, outra abordagem para a utilização da dreche na dieta passa pela extracção de compostos de interesse, seguida da incorporação dos extractos nos alimentos. A título de exemplo, McCarthy *et al.* (2013) [22] procederam à extracção de compostos fenólicos, por hidrólise alcalina a partir de vários tipos de dreche. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a inclusão desses extractos em bebidas de fruta fez aumentar a sua capacidade antioxidante.

1.4.2. Materiais de construção

Outra aplicação, ainda pouco estudada, é a utilização da dreche para produção de tijolos. Para além da vantagem relacionada com a diminuição do peso dos tijolos, esta tecnologia aparece igualmente associada à construção ecológica (*green building*), nomeadamente no sentido do aumento da capacidade de isolamento térmico. No trabalho realizado por Russ *et al.* (2005) [23] a dreche foi utilizada para aumentar a porosidade de um lote de tijolos. Durante o processo de cozedura em forno dos tijolos, a dreche adicionada às argilas usadas normalmente para a produção de tijolos foi incinerada, resultando na produção de poros.

Os resultados obtidos mostraram que os tijolos produzidos com adição de dreche apresentavam maior resistência, maior porosidade (maior capacidade de adsorção de água) e uma densidade mais baixa, concedendo melhores propriedades em termos de isolamento térmico, comparativamente àqueles produzidos unicamente a partir da argila.

1.4.3. Como bioadsorvente

Lu e Gibb (2008) [24] estudaram a aplicação da dreche como adsorvente de metais pesados de efluentes, neste caso, do cobre [II]. Durante esta investigação, o subproduto sólido obtido a partir do processo de destilação do *whisky* foi seco e empacotado em colunas. Uma solução de cobre [II] foi feita passar através da coluna e diversas amostras foram recolhidas de 2 em 2 horas. Os resultados mostraram que, ao fim de 4 horas nas condições experimentais, cerca de 40% do cobre havia sido removido da solução inicial. Comprovou-se assim que a dreche possui um potencial significativo enquanto bioadsorvente para aplicação na remediação de efluentes contaminados.

Noutro estudo, a dreche foi utilizada para adsorção do corante *acid orange 7* – um corante utilizado nas indústrias têxtil e do papel –, tendo-se atingido uma adsorção máxima equivalente a 30,5 mg de corante por grama de dreche [9].

1.4.4. Produção de etanol

O bioetanol pode ser produzido a partir do amido, de culturas à base de açúcar (*sugar-based crops*), assim como a partir de biomassa lenhocelulósica. Devido ao aumento da procura de etanol, têm-se procurado substratos economicamente viáveis e abundantes, para além de tecnologias mais eficientes para que o etanol possa estar disponível a baixo custo.

A composição da dreche – contendo principalmente as cascas dos grãos e componentes como as hemiceluloses, celulose e lenhina – tornam-na uma matéria-prima atractiva para a produção de etanol. A conversão de resíduos como a dreche em etanol requer processos de hidrólise química e/ou enzimática para produzir principalmente açúcares fermentáveis, seguindo-se a fermentação microbiana.

A utilização de enzimas para a conversão de celulose para produzir açúcares fermentáveis constitui um grande impacto no custo do processo [16]. Contudo, na literatura encontra-se reportada uma metodologia que utiliza *Neurospora crassa* [25] e *Fusarium Oxysporum* [26] – fungos mesofílicos¹ – para desencadear o processo de hidrólise e fermentação da dreche em passos consecutivos.

1.4.5. Como fonte de compostos de valor acrescentado

➤ Produção de ácido láctico

O ácido láctico (ou ácido 2-hidroxiopropanóico) possui diversas aplicações, nomeadamente associadas às indústrias alimentar, farmacêutica e química. Mais recentemente, o crescente interesse pela obtenção de ácido láctico a baixo custo deve-se ao facto de este ser um precursor para a produção de ácido poli-láctico [16] – um polímero de poliéster termoplástico, de elevada resistência e biodegradável [27]. Os grandes desafios na produção de ácido láctico em grande escala são os custos da matéria-prima (fontes de carbono como glucose, sacarose ou amido), o que torna o processo economicamente pouco viável, pelo que a exploração de fontes mais baratas será benéfica. Os resíduos da indústria agro-industrial recebem assim uma atenção especial enquanto alternativas para estas matérias-primas [16].

Mussatto *et al.* (2007) [28] utilizaram *Lactobacillus delbrueckii*, uma bactéria tipicamente utilizada na produção de iogurte, para promover a produção de ácido L-láctico a partir de um hidrolisado de dreche. Os resultados mostraram uma produção de ácido láctico de 0,73 g por grama de glucose consumida, equivalendo a uma eficiência de 73%.

➤ Produção de xilitol

A mesma autora desenvolveu, em 2005, investigação no sentido da utilização da dreche como matéria-prima para a produção de xilitol [29]. O xilitol é um adoçante que se sobrepõe a outros pois pode ser usado para o combate a cáries dentárias, para

¹ Que se desenvolvem em temperaturas moderadas, compreendidas entre os 15 e os 40°C.

minimizar condições como a diabetes, distúrbios no metabolismo dos lípidos, lesões renais e para prevenir infecções pulmonares, otites e osteoporose [30].

Na publicação com o título *Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol*, derivados da fracção hemicelulósica da dreche foi submetida a hidrólise com ácido sulfúrico e os hidrolisados obtidos foram utilizados como meio de cultura e inoculados com levedura *Candida guilliermondii*. Os resultados mostram que, nas melhores condições, foi então possível a extracção eficiente de hemicelulose (92,7%) e a obtenção de bons resultados para a fermentação (rendimento de produção de xilitol de 0,7 g/g) [29].

Trabalhos desenvolvidos tendo em vista a produção de xilitol por conversão pela *Debaryomyces hansenii*, mostraram que a suplementação dos hidrolisados de dreche obtidos por hidrólise ácida induz uma maior taxa de conversão. Esta suplementação pode ser levada a cabo por adição de leveduras e milhocina (ou licor de milho) [31].

➤ **Produção de oligossacáridos**

A obtenção de oligossacáridos a partir da dreche pode ser conseguida por autohidrólise a altas temperaturas (entre 150 e 190 °C). Os licores resultantes contêm uma mistura de oligossacáridos, monossacáridos (xilose e arabinose, essencialmente), ácido acético e produtos da decomposição de açúcares. Os resultados mostraram que a 190°C se atingiu os níveis máximos de recuperação de xilo-oligossacáridos. Verificou-se também uma linearidade entre o aumento do tempo de reacção e a recuperação de produtos de degradação. Carvalheiro *et al.* (2004) [8] mostram assim que a autohidrólise da dreche é uma estratégia promissora para obtenção de oligossacáridos a partir da mesma.

➤ **Extracção de proteínas**

As proteínas da dreche, que constituem entre 20 e 25% da sua massa [32], assim como os seus hidrolisados, têm várias aplicações. Entre elas estão a sua utilização como agentes emulsionantes ou como fonte de aminoácidos como meio de fermentação. Outra aplicação será para enriquecimento do valor nutricional de vários alimentos [33].

A extracção das proteínas da dreche pode ser realizada por vários métodos físicos, químicos e bioquímicos, ou mesmo pela combinação de diferentes métodos [34].

O trabalho realizado por Teixeira (2011) [34], no âmbito da sua dissertação de mestrado, teve como objectivo a hidrólise enzimática de proteínas da dreche. Após extracção alcalina da dreche, seguida de precipitação ácida, o concentrado de proteínas

da dreche continha cerca de 38% do conteúdo total de proteína do material de partida. Esse concentrado foi posteriormente utilizado como substrato para hidrólise enzimática com as proteases extraídas a partir da levedura da cerveja, outro resíduo da indústria cervejeira. As condições da hidrólise enzimática (concentração de peptidases e de substrato, pH, temperatura e tempo) foram optimizadas. Os péptidos daí resultantes foram então separados por RP-HPLC/UV.

➤ **Extracção de ácidos hidroxicinâmicos**

Nos últimos anos o interesse pela utilização de antioxidantes naturais tem crescido no sentido do seu uso terapêutico [35]. Em particular, os compostos fenólicos são considerados agentes terapêuticos contra diversas condições clínicas e fisiológicas, incluindo doenças neurodegenerativas, cancro, diabetes, disfunção cardiovascular, doenças inflamatórias e envelhecimento [36].

Os ácidos fenólicos dietéticos são compostos bioactivos, nomeadamente enquanto agentes de *radical scavenging*, quelantes de metais, moduladores da actividade enzimática e, mais recentemente, por afectarem a transdução de sinal, activação da transcrição e da expressão genética [35]. Assim, embora a dreche seja tradicionalmente fornecida a agricultores para alimentação animal, com o desenvolvimento de tecnologias economicamente viáveis e tendo em conta que os ácidos ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico, FA) e *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico, *p*-CA) são os mais abundantes na dreche [37], a valorização deste subproduto agro-industrial [no sentido da recuperação deste tipo de compostos], tem vindo a ganhar interesse [5]. Este tema aparece desenvolvido mais extensivamente na secção dedicada ao ácido ferúlico.

É importante referir que o ácido ferúlico é maioritariamente encontrado nas partes exteriores dos grãos de cereais, nomeadamente na camada de aleurona e no pericarpo (Figura 5), que contêm aproximadamente 98% do ácido ferúlico total [2,38]. Sendo a dreche o produto do processamento de grãos de cereais (essencialmente a cevada), a partir do qual se obtêm as suas cascas, torna-se evidente o potencial deste resíduo sólido para obtenção de ácido ferúlico.

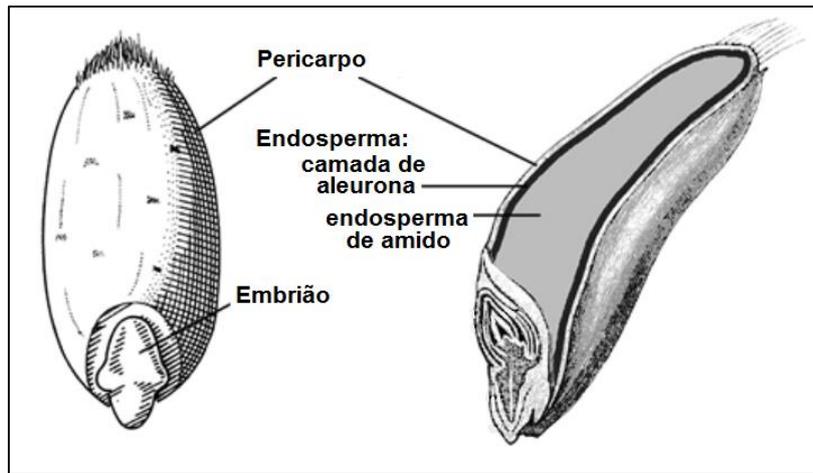


Figura 5 – Anatomia de um grão de cereal, com realce para o pericarpo, endosperma e embrião. Adaptado de [39].

2. Ácidos hidroxicinâmicos

2.1. Estrutura química

Os compostos hidroxicinâmicos constituem uma das classes de compostos fenólicos mais abundantes na natureza [40], sendo caracterizados pela presença de um anel aromático, ao qual se ligam um grupo carboxilo *via* ligação vinílica (grupo carboxil vinílico) e pelo menos um grupo hidroxilo. Nesta família de compostos estão incluídos os ácidos cafeico, *p*-cumárico, sinápico e o ácido ferúlico (Figura 6). Estas espécies podem ocorrer na sua forma de ácidos carboxílicos livres ou esterificados [podendo também surgir ligados *via* ligação éter ou acetal], nomeadamente enquanto componentes de polímeros vegetais (parede celular) [41,42].

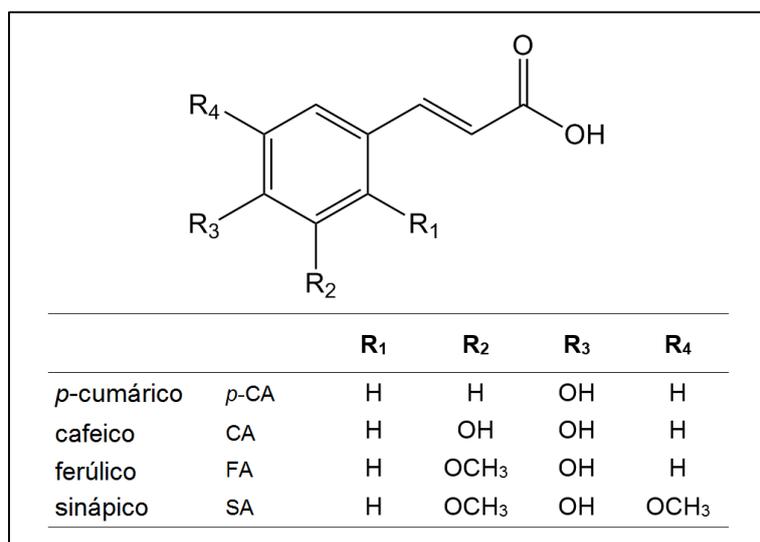


Figura 6 - Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos.

O grupo dos ácidos clorogénicos resulta da esterificação do ácido cafeico com outros ácidos. O ácido 5-*O*-cafeoilquínico (Figura 7), formado por condensação dos ácidos cafeico e quínico *via* esterificação, é provavelmente o derivado hidroxicinâmico solúvel mais abundante [41]. Contudo, é frequente a esterificação do ácido cafeico com os ácidos chiquímico, málico e tartático.

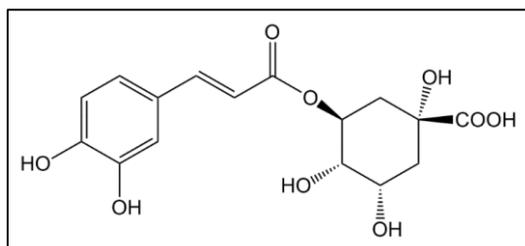


Figura 7 - Ácido clorogénico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico).

Também os ácidos ferúlico, sinápico e *p*-cumárico formam ésteres com os ácidos quínico, chiquímico, málico e tartárico.

2.2. Biossíntese

A biossíntese dos ácidos hidroxicinâmicos acontece pela mesma cadeia metabólica envolvida na obtenção de lenhinas, cumarinas, lenhanos, estilbenos, chalconas, antocianinas e flavonóides [41]. A produção destes compostos nas plantas acontece pela via do chiquimato, tendo início com os aminoácidos aromáticos L-fenilalanina e L-tirosina (Figura 8).

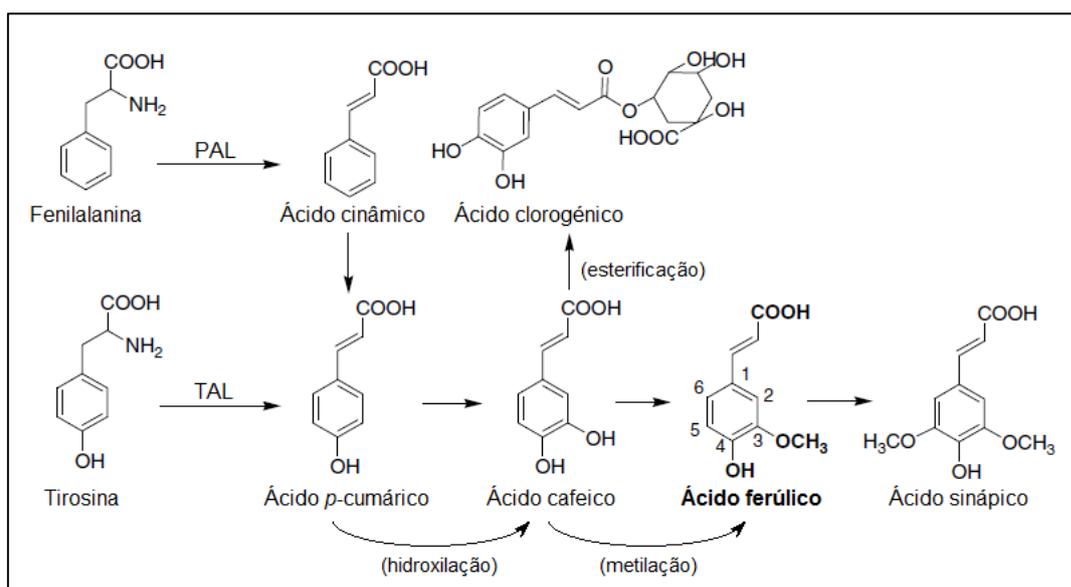


Figura 8 – Biossíntese de ácidos hidroxicinâmicos a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina em plantas. Adaptado de Zhao e Moghadasian (2008) [43].

Inicialmente, a fenilalanina e a tirosina são convertidas em ácido cinâmico e *p*-cumárico, por acção da PAL (fenilalanina amónia liase – EC 4.3.1.24) e da TAL (tirosina amónia liase – EC 4.3.1.25), respectivamente.

A TAL converte a tirosina em ácido 4-hidroxicinâmico (ou ácido *p*-cumárico) a partir do qual se produzem os ácidos cafeico, sinápico e ferúlico, este último obtido por hidroxilação e metilação, numa reacção que envolve a SAM (S-adenosilmetionina – cofactor enzimático) [44].

2.3. Fontes naturais e ocorrência em alimentos

Os ácidos hidroxicinâmicos ocorrem em plantas vasculares [41], sendo a sua forma livre muito rara, excepto em alimentos processados, que tenham sido submetidos a congelamento, esterilização ou fermentação [38].

O ácido clorogénico pode ser encontrado em vários tipos de frutas e em elevadas concentrações no café. De acordo com Clifford (1999), citado por Manach *et al.* (2004) [38], uma única chávena de café pode conter entre 70 e 350 mg de ácido clorogénico. O ácido cafeico quer na sua forma livre, quer esterificado, é geralmente o ácido fenólico mais abundante, representando 75 – 100% do teor total de ácidos hidroxicinâmicos na maior parte das frutas [38]. O ácido sinápico surge essencialmente em brócolos, couve e em sumos de citrinos. Já os ácidos ferúlico e *p*-cumárico aparecem geralmente em conjunto, sendo predominantes em cereais como o milho, trigo, arroz e a cevada [45–47]. Manach *et al.* (2004) [38] defendem que os cereais constituem a principal fonte destes compostos.

A Tabela 2 compila o teor total de ácidos hidroxicinâmicos em diferentes alimentos. Os dados indicam o teor total (mg/100g) de ácidos hidroxicinâmicos (livres e ligados) em vegetais, frutas, grãos e bebidas selecionadas. O símbolo (-) indica que o composto não é detectado, (+) indica uma concentração entre 0 e 1, (++) representa um teor entre 1 e 5, (+++) entre 5 e 10 e (+++++) uma concentração superior a 20 mg/100g.

Tabela 2 - Conteúdo em ácidos hidroxicinâmicos em alimentos.

	CA	FA	SA	<i>p</i> -CA	Ref
Legumes e vegetais					
Cenoura	+++++	++	-	+	[36]
Rabanete	+	++	+	+++	[36]
Nabo	+	+	+	+	[36]
couve-flor	+	+	++	++	[36]
Brócolos	++	++	+++	+	[36]
repolho vermelho	++	+++	+++++	+++	[36]
Alho	-	+	+	+	[36]
Cebola	-	+	+	+	[36]
feijão verde	+	++	-	++	[36]
Soja	+	++++	++++	++++	[36]
Alcachofra	+++++	+	-	-	[36]
Ervilha	+	+	+	-	[36]
Espinafre	-	+++	-	++	[36]
Manjeriço	+++++	++	-	+	[36]
Alface	+++++	++	-	+	[36]
Pimentão	++	+	+	++	[36]
Salsa	-	+	-	+++	[36]
Abobrinha	+	+	-	+	[36]
Frutas					
Abacate	+	++	+	+	[35]
Amendoim	++	+++	++++	+++++	[36]
Tomate	++	+	-	+	[36]

	CA	FA	SA	p-CA	Ref
Pêssego	++	+	-	+	[37]
Nectarina	++	+	-	+	[37]
Maçã	+	+	+	+	[38]
Banana	+	++	-	+	[37]
uvas verdes	++	-	-	++	[37]
uvas vermelhas	++	+	-	++	[37]
ameixa escura	+++++	++	+	++	[37]
Cereja	++++	+	-	++	[37]
Pêra	+	+	++	+	[38]
Laranja	+	+	++	++	[38]
sumo de laranja	+	++	+	+	[37]
Mandarina	+++	+++	++	+	[37]
Toranja	+++	++++	+	++	[37]
Kiwi	++	+	-	+	[36]
Morango	++++	++++	-	[+++++]	[38]
framboesa	+++	++++	++	+++++	[39]
groselha	[+++++]	++++	-	[+++++]	[38]
mirtilo	[+++++]	++	-	++	[39]
arando	++	+	+	++	[37]
groselha preta	[+++++]	++++	++	[+++++]	[38]
Cereais e derivados					
grãos de trigo	+++	++	++	++	[40]
farelo de trigo	++	[+++++]	++++	+++	[40]
farinha de trigo integral	++	[+++++]	+++	++	[40]
farinha de milho	++	+++++	+++	+++	[40]
pão de trigo branco	-	+++	+	+	[40]
massa	-	++++	++	+	[40]
grãos de milho	+	+++++	-	++	[40]
farelo de centeio	+++	[+++++]	+++++	++++	[40]
grão de cevada inteiro	+	[+++++]	++++	+++	[40]
farelo de aveia	+	+++++	+++	++	[40]
Bebidas					
cidra de maçã	++	+	-	+	[37]
sumo de maçã	++	+	-	++	[37]
cerveja	+	+	+	+	[37]
sumo de groselha preta	++	+	+	++	[37]
chá preto	++	+	-	++	[37]
café	[+++++]	+++	-	++	[37]
chá verde	++	-	-	+	[37]
cidra de pêra	+	-	-	-	[37]
vinho tinto	++	-	-	++	[37]

Dos alimentos mencionados na tabela acima, destacam-se aqueles em que o teor em compostos hidroxicinâmicos aparece entre parêntesis rectos. O morango, por

exemplo, é extremamente rico em ácido *p*-cumárico, com concentrações de cerca de 111 mg/100 g (peso fresco). A groselha possui concentrações consideráveis de ácidos cafeico e *p*-cumárico (35 e 50 mg/100 g, respectivamente). A concentração de ácido cafeico no mirtilo é também elevada (147 mg/100 g, peso fresco), ao passo que na groselha preta, são os ácidos cafeico e *p*-cumárico aqueles que aparecem aumentados (54 e 59 mg/100 g, respectivamente).

No que toca aos cereais, o farelo de trigo, o farelo de centeio, os grãos de cevada inteiros e a farinha de trigo integral apresentam concentrações elevadas de ácido ferúlico (300, 280, 89 e 86 mg/100 g, respectivamente). Finalmente, o café destaca-se, apresentando 89 mg de ácido cafeico por 100 g do seu peso seco. Como referido anteriormente, o ácido cafeico pode aparecer esterificado com outros ácidos, formando ácidos clorogénicos.

2.4. Propriedades farmacocinéticas

2.4.1. Absorção e distribuição

De acordo com a revisão de El-Seedi *et al.* (2012) [41], aquando da ingestão de ácidos hidroxicinâmicos, assim como de derivados, estes são libertados durante e logo após a mastigação, sendo que os ingeridos na sua forma livre são rapidamente adsorvidos no estômago e intestino delgado. A taxa de absorção destes compostos varia de acordo com a sua estrutura. Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, por exemplo, apresentam uma eficiência de absorção muito semelhante entre si, sendo substancialmente maior do que aquela apresentada pelo ácido cafeico.

Vários estudos [48,49] mostraram que os ácidos hidroxicinâmicos são absorvidos no epitélio intestinal através de transportadores de ácido monocarboxílico (MCT, *Monocarboxylic acid transportes*). Konishi *et al.* (2003) [48] estudaram a especificidade estrutural destes transportadores para o transporte de vários compostos fenólicos, entre os quais os ácidos hidroxicinâmicos, bem como alguns derivados. A absorção foi estudada por comparação da absorção da fluoresceína na presença e ausência dos compostos, vindo os resultados expressos em permeação relativa. O ácido cafeico foi aquele que apresentou maior permeação relativa, seguido dos ácidos *p*-cumárico, sinápico e ferúlico.

Tendo em conta que quanto maior for a permeação relativa, maior é a taxa de absorção de cada composto, os resultados mostraram que a taxa de absorção através de MCTs pode estar relacionada com a posição do(s) grupo(s) hidroxilo nos ácidos

fenólicos. Os resultados podem ainda indicar um maior fluxo transepitelial de ácido cafeico, comparativamente aos restantes compostos [48].

Em termos da absorção do ácido clorogénico, sabe-se que a maior parte daquele que é ingerido atinge o cólon ainda intacto, sendo posteriormente clivado pela microflora intestinal a ácidos cafeico e quínico *via* esterase [50,51]. Konishi e Kobayashi (2004) [52] reportaram que apesar da presença de grupos carboxilo quer na porção de ácido quínico, quer na porção aromática (Figura 7), a fraca interacção com as moléculas MCT pode estar relacionada com a existência da ligação éster. Apesar de alguns autores defenderem a absorção do ácido clorogénico intacto [46], os mecanismos propostos por Konishi e Kobayashi (2004) [52] (Figura 9) pressupõem que a esterase da mucosa no intestino delgado cliva a ligação éster do ácido clorogénico, originando ácido cafeico, que é absorvido posteriormente. O ácido clorogénico persistente é então hidrolisado pelas esterases microbianas, no intestino grosso, e o seu metabolismo dá origem aos ácidos *m*-cumárico e *m*-hidroxifenilpropiónico, sendo absorvido via MCT ou excretado.

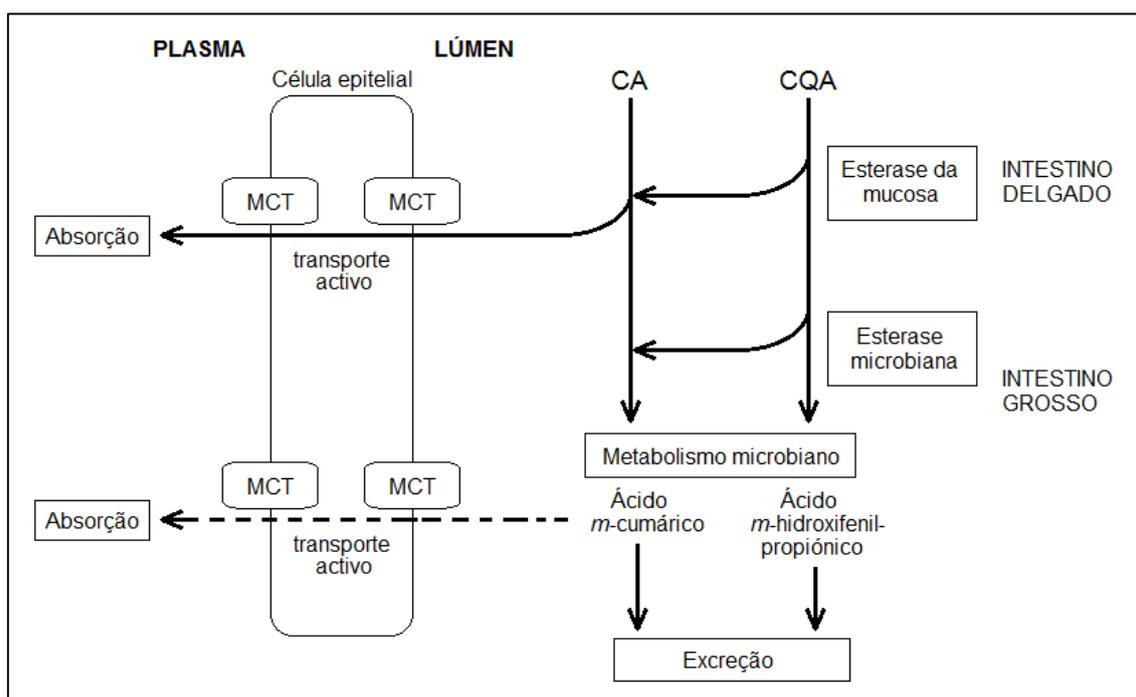


Figura 9 - Absorção transepitelial do ácido clorogénico. Adaptado de Konishi e Kobayashi (2004) [52].

2.4.2. Metabolismo e excreção

Vários autores, revistos por El-Seedi *et al.* (2012) [41], pressupõem o metabolismo dos ácidos hidroxicinâmicos não só no tracto gastrointestinal, mas também no fígado e rins, por reacções que incluem desidroxilação, desmetilação e desidrogenação. Compostos como os ácidos 3-hidroxifenilpropiónico, 3-metóxi-4-hidroxifenilpropiónico, hidracrílico, dihidroferúlico e vanílico foram detectados na urina,

em ratos e humanos, após a ingestão de ácidos cafeico e ferúlico. Outros autores, também revistos por El-Seedi *et al.* (2012) [41], reportaram que o ácido ferúlico é metabolizado a um derivado desidroxilado, sendo tipicamente conjugado no fígado.

Olthof *et al.* (2003) demonstraram que o ácido clorogénico não absorvido que atinge o cólon é hidrolisado a ácidos cafeico e quínico pela microflora. Após desidroxilação e absorção, seguido de metabolismo pelo fígado e rins, é convertido a ácido benzóico e conjugado com glicina para formar ácido hipúrico. Este último, assim como os ácidos *m*-cumárico e 3-hidroxifenilpropanóico (Figura 9) foram detectados não só no plasma de ratos, mas também na urina.

Devido ao seu rápido metabolismo, a concentração dos ácidos hidroxicinâmicos conjugados no plasma é tipicamente baixa, por serem rapidamente eliminados da circulação. São assim eliminados por uma de duas vias – biliar ou urinária. Compostos extensamente conjugados podem ser eliminados pela via urinária, sendo no entanto mais comum a sua excreção pela biliar. Desta forma, estes compostos retornam ao tracto gastrointestinal, onde podem ser (parcialmente) reabsorvidos. Por outro lado, metabolitos mais pequenos (nomeadamente os ácidos ferúlico, isoferúlico, vanílico, hipúrico, entre outros) são preferencialmente excretados pela urina [53].

2.5. Biodisponibilidade

A importância fisiológica dos ácidos hidroxicinâmicos prende-se com a sua biodisponibilidade para absorção e subsequente interacção com os tecidos-alvo [52]. O conceito de biodisponibilidade relaciona a absorção de um composto activo com o seu metabolismo e excreção. A absorção é dependente da disponibilidade do composto a partir da matriz, bem como do seu metabolismo. A biodisponibilidade em si depende de vários factores endógenos, que incluem as propriedades físico-químicas do composto, a actividade enzimática no sistema digestivo, excreção biliar/urinária e biotransformação (envolvendo a microflora, o epitélio gastrointestinal e o fígado). Factores exógenos, como a matriz alimentar, o seu tamanho e a quantidade ingerida também influenciam a biodisponibilidade. El-Seedi *et al.* (2012) reportaram a biodisponibilidade do ácido ferúlico em diferentes produtos alimentares, sendo baixa em produtos derivados de cereais (3%) e ligeiramente mais elevada noutras matrizes alimentares, como o tomate ou a cerveja, por exemplo (11-25 e 19-98%, respectivamente). Devido às complexas misturas de vários ácidos hidroxicinâmicos nas formas livre e conjugada (diferindo entre si em termos da biodisponibilidade, metabolismo e excreção) contidas nos alimentos, o estudo da biodisponibilidade é um processo extremamente complexo [41].

3. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico é um composto fenólico que exibe diversos efeitos protectores contra diferentes condições clínicas como o cancro, diabetes, bem como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas [54]. No Japão o ácido ferúlico foi aprovado como aditivo alimentar para prevenir a oxidação dos alimentos [55]. O isolamento do ácido ferúlico aconteceu pela primeira vez em 1866 e a sua síntese em 1925 [43].

O ácido ferúlico possui três diferentes elementos estruturais que possivelmente contribuem para a sua capacidade antioxidante. A presença de grupos doadores de electrões no anel benzénico (3-metoxi e, mais importante, 4-hidroxil) conferem ao ácido ferúlico a capacidade de terminar as reacções em cadeia de radicais livres. O grupo carboxil vinílico pode proporcionar locais de ataque adicionais para os radicais livres, impedindo-os de atacar a membrana.

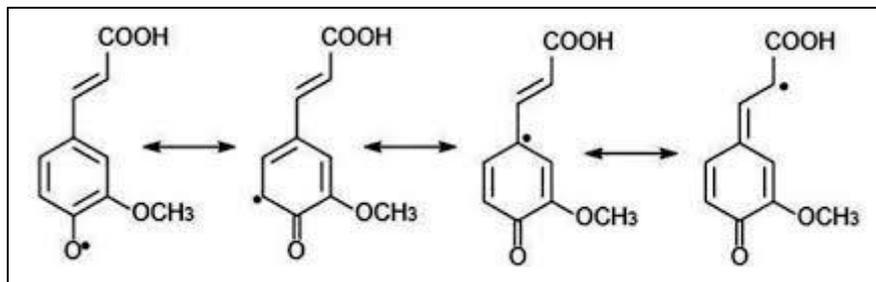


Figura 10 - Estabilização por ressonância do radical ferúlico. Fonte: Paiva *et al.* (2003) [54].

Para além disso, o grupo carboxílico actua como *âncora* do ácido ferúlico através do qual se liga à bicamada lipídica, proporcionando alguma protecção contra a peroxidação lipídica [56].

O ácido tem igualmente possibilidade de se dissociar de forma iónica. A determinação das constantes de dissociação foi levada a cabo por Ozkorucuklu *et al.* (2009) [57] por diferentes métodos, para vários ácidos benzóicos hidroxilados e ácidos cinâmicos em água, entre os quais o ácido ferúlico. Os resultados obtidos por potenciometria mostraram um $pK_{a,1}$ igual a 4,56 e um $pK_{a,2}$ igual a 8,65, diferindo ligeiramente daqueles obtidos por outros métodos, incluindo a electroforese capilar ($pK_{a,1}$ e $pK_{a,2}$ iguais a 4,38 e 8,75, respectivamente).

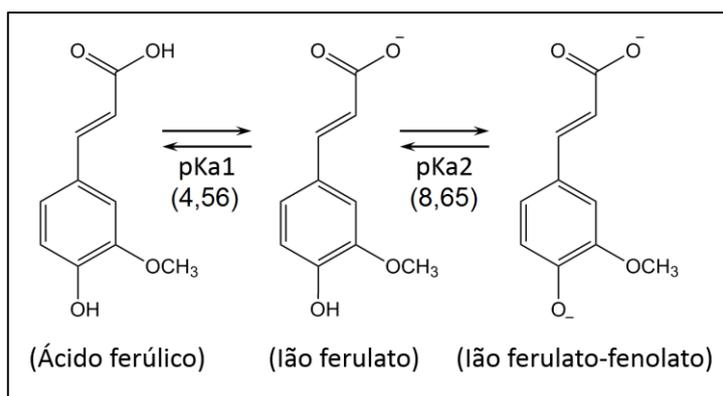


Figura 11 – Estrutura e constantes de dissociação do ácido ferúlico, determinadas potenciometricamente por Ozkorucuklu *et al.* (2009) [57].

Conforme mencionado, em frutas e vegetais o ácido ferúlico (assim como compostos relacionados) aparece covalentemente conjugado – via esterificação – com mono-, di- e polissacáridos, glicoproteínas, poliaminas, lenhina e ácidos gordos. A hidrólise destes ésteres conduz à formação dos compostos iónicos acima mencionados, de acordo com o pH do meio.

3.1. Propriedades bioactivas

O ácido ferúlico possui grande importância do ponto de vista bioquímico, dadas as suas propriedades bioactivas.

Os efeitos biológicos do ácido ferúlico começaram a ser publicados nos anos 70 quando investigadores japoneses descreveram propriedades antioxidantes de ésteres de ácido ferúlico extraídos do óleo de arroz, motivo pelo qual se desenvolveram estudos sobre os potenciais efeitos anti-aterosclerose do ácido ferúlico [58]. Na literatura, de entre as muitas propriedades apresentadas pelo ácido ferúlico, aparecem como exemplos:

3.1.1. Actividade antioxidante

O organismo humano é susceptível ao ataque de radicais livres e espécies reactivas de oxigénio (ROS), o que pode conduzir a uma série de doenças como a aterosclerose, cancro, cataratas, entre outras [59].

São vários os factores exógenos e endógenos que levam à geração de radicais livres. Os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilo ($\cdot OH$) são formados a partir de processos endógenos e estão associados a diversas doenças. O radical superóxido, por exemplo,

encontra-se associado à oxidação de moléculas de adrenalina², nucleótidos de flavina³ e açúcares na presença de oxigénio. Factores exógenos, como a radiação ultravioleta e poluentes atmosféricos, podem também induzir a produção de radicais livres. Uma vez que estas espécies estão constantemente a ser produzidas no organismo, é essencial um sistema defensivo capaz de prevenir os danos causados por radicais livres em excesso. Assim, e apesar do organismo possuir sistemas antioxidantes endógenos, a ingestão de antioxidantes pode fortalecer estes sistemas. Nos últimos anos, têm surgido vários trabalhos no sentido do estudo e compreensão das capacidades bioactivas e potenciais benefícios de compostos hidroxicinâmicos (nomeadamente o ácido ferúlico) livres e conjugados [58].

O ácido ferúlico demonstrou grande capacidade de inibição de radicais peróxido (H₂O₂), superóxido e hidroxilo, tendo sido observado que este composto, a uma concentração de 250 mg/L, reduz em 92,5% a concentração dos radicais hidroxilo. Na realidade, o ácido ferúlico não só é capaz de eliminar radicais livres, como faz aumentar a actividade de enzimas responsáveis pela inibição desses radicais, estando igualmente associado à inibição de enzimas que catalisam a sua produção, nomeadamente a tirosinase e superóxido dismutase [58].

3.1.2. Prevenção da trombose e aterosclerose

A agregação de plaquetas é um dos mecanismos envolvidos na reparação de danos causados em vasos sanguíneos, estando também associada a doenças como a trombose. Na China são usadas, há vários anos, ervas ricas em ácido ferúlico – entre as quais *Angelica sinensis*, *Cimicifuga heracleifolia* e *Lignsticum chuangxiong* – para tratamento deste tipo de doenças, o que advém do facto do ácido ferúlico ter a capacidade de inibir a agregação de plaquetas induzidas por colagénio [58].

Kayahara *et al.* (1999) [60] sintetizaram três derivados do ácido ferúlico, por ligação a aminoácidos, e determinaram a sua actividade inibitória da agregação de plaquetas. Os resultados mostraram que estes derivados são capazes de manter a actividade inibitória ao mesmo nível da do ácido ferúlico, tendo sido detectado um forte poder de dissociação destas agregações. Isto é, para além da capacidade de inibição da agregação de plaquetas – prevenção de trombos –, estes derivados possuem ainda a capacidade de dispersá-los.

² Fisiologicamente, a adrenalina é uma hormona secretada pelas glândulas supra-renais em momentos de *stress*, preparando o organismo para grandes esforços físicos, estimulando o miocárdio e elevando a pressão arterial. A sua oxidação está assim associada à perda da sua actividade de vasoconstrição.

³ Base nitrogenada interveniente em diversas reacções de oxidação-redução.

O ácido ferúlico mostrou capacidade de inibir a actividade da enzima tromboxano A₂ (TXA₂) sintetase. O ácido eicosanóico é um precursor de TXA₂, libertando-se da membrana lipídica, numa reacção catalisada pela fosfolipase A₂. De acordo com Pan *et al.* (1985), citado por Ou e Kwok (2004) [58], o ácido ferúlico é capaz de prevenir a libertação do ácido eicosanóico através da inibição da fosfolipase A₂. Assim, Ou *et al.* (2001) atribuíram o efeito anti-trombótico do ácido ferúlico ao seu efeito antagónico⁴ sobre o TXA₂ e à inibição da TXA₂ sintetase e da fosfolipase A₂.

3.1.3. Actividade antimicrobiana e anti-inflamatória

Os ácidos ferúlico e isoferúlico são os principais componentes activos da espécie *Cimicifuga*, frequentemente utilizada na medicina tradicional Chinesa como medicamento anti-inflamatório. Vários são os estudos que evidenciam a actividade de inibição de crescimento e reprodução de vírus como os vírus influenza⁵, sincicial respiratório⁶ e SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) pelo ácido ferúlico [58]. Estudos realizados por Jeong *et al.* (2000), citado por Ou e Kwok (2004) [58] mostraram ainda que o ácido ferúlico possui um grande espectro de actividade antimicrobiana, que inclui bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como leveduras.

O mecanismo para o efeito antimicrobiano na microflora gastrointestinal humana (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri* e *Pseudomonas aeruginosa*), por diferentes ácidos fenólicos, incluindo o ácido ferúlico, foi estudado por Lo e Chung (1999) [61] e os resultados mostraram estar associados à inibição da arilamina N-acetiltransferase (NAT2; EC 2.3.1.5). Esta é uma enzima responsável pela transferência de grupos acetil da acetil-coA para arilaminas, podendo também catalisar a transferência de acetil entre arilaminas sem a coenzima A [62].

3.1.4. Efeito anti-cancerígeno

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento no estudo dos efeitos quimiopreventivos do ácido ferúlico, nomeadamente a nível da anti-carcinogénese oral e intestinal. Mori *et al.* (1999) [63] desenvolveram um estudo *in vivo*, em ratos previamente expostos a um agente carcinogénico (4-nitroquinolina-1-óxido, 4NQO), que foram posteriormente tratados com ácido ferúlico, via oral. Os resultados obtidos após 32 semanas mostraram uma clara evidência na redução de carcinomas da língua dos

⁴ Em farmacologia, o termo antagónico indica que a exposição a um determinado fármaco surte efeito na redução do efeito de outro.

⁵ Retrovírus responsável pela transmissão da gripe.

⁶ Principal causa da contracção de doenças pulmonares como a pneumonia.

ratos tratados, assim como de lesões pré-neoplásicas, comparativamente ao grupo controlo – não tratado com ácido ferúlico.

Outro trabalho relacionado, estudou os efeitos da administração oral do ácido ferúlico em ratos com cancro do cólon induzido por azoximetano (AOM) [64]. De forma semelhante, os resultados mostraram que o tratamento com ácido ferúlico fez aumentar significativamente a actividade de enzimas de detoxificação glutationa S-transferase (GST) e quinona reductase (QR) na mucosa do fígado e do cólon, resultando numa diminuição na incidência do cancro. Estas conclusões expõem assim a possibilidade de que estas enzimas estejam relacionadas com o efeito bloqueador do ácido ferúlico na carcinogénese do cólon induzida por AOM.

Uma vez que os radicais livres desempenham um papel importante no desenvolvimento do cancro, acredita-se que o efeito anti-cancerígeno de compostos como o ácido ferúlico estejam associado também à sua capacidade para eliminar estes radicais [58].

3.2. Aplicações

São várias as aplicações descritas na literatura para o ácido ferúlico, nomeadamente a produção de vanilina, a sua utilização como conservante e ainda a sua aplicação em alimentos e na cosmética.

3.2.1. Produção de vanilina

A vanilina é um importante composto aromático utilizado na indústria alimentar, na perfumaria, e em farmácia. Apesar de ser produzida em grande escala por síntese química, existe um interesse na sua produção através de bioconversão de fontes naturais como a lenhina, eugenol, aminoácidos aromáticos, ácido ferúlico entre outros [65].

São três as vias através das quais o ácido ferúlico pode ser biotransformado por microorganismos para produzir vanilina: A primeira diz respeito à descarboxilação do ácido ferúlico por uma descarboxilase para produzir 4-vinilguaiacol e, posteriormente, vanilina. A segunda tem por base a redução do ácido ferúlico a ácido dihidroferúlico, a partir do qual se formam o ácido vanílico e a vanilina. Finalmente, a biotransformação pode ainda ter início na formação do álcool coniferílico a partir do ácido ferúlico. Estes mecanismos foram identificados em várias bactérias, fungos e leveduras, pelo que a utilização das enzimas por estes segregadas pode ser meio de produção de vanilina a partir do ácido ferúlico. A utilização directa dos microorganismos não será uma opção

viável, uma vez que, devido à toxicidade que a vanilina apresenta sobre estes, tendencialmente a vanilina produzida será convertida em ácido vanílico [65].

3.2.2. Conservante

Devido ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano, o ácido ferúlico pode ser usado como conservante alimentar. Segundo Graf (1992), citado por Ou e Kwok (2004) [58], misturas de ácido ferúlico e aminoácidos ou dipéptidos exibiram um efeito inibitório sinérgico na peroxidação do ácido linoleico.

Comparativamente a outros compostos fenólicos, o ácido ferúlico apresenta duas vantagens: 1) o seu elevado poder antioxidante, maior do que aquele apresentado por outros ácidos como o gálico e cafeico, e do que compostos como malvidina, delphinidina, catequina, epicatequina, rutina, quercetina, entre outros [66]; 2) o ácido ferúlico é menos afectado por mudanças de pH do que outros compostos como os ácidos clorogénico, cafeico e gálico [67].

3.2.3. Ingrediente em alimentos de desporto e loções dermatológicas

Por ser um potente antioxidante e por se acreditar que o ácido ferúlico é capaz de estimular a secreção de determinadas hormonas em humanos, este pode ser utilizado enquanto substância ergogénica⁷ [58].

A radiação ultravioleta foi já descrita como sendo um factor exógeno capaz de provocar lesões cutâneas, podendo resultar em lesões de pele pré-cancerosas e cancerosas. Por se verificar que a exposição excessiva a radiação ultravioleta pode estar associada a uma diminuição do conteúdo antioxidante da pele, o ácido ferúlico constitui um ingrediente activo em várias loções para a pele, nomeadamente para fotoprotecção e inibição de tumores cutâneos [58].

3.3. Extracção a partir de biomassa

Devido à sua grande importância em diferentes áreas, são vários os trabalhos em torno da extracção de ácido ferúlico a partir de múltiplas matrizes, nomeadamente cereais – como o milho, trigo, arroz, cevada, centeio e aveia [68] –, mas também a partir de resíduos resultantes da indústria de transformação desses cereais, como sejam a palha de arroz [69], o farelo de milho [70], o bagaço de cana-de-açúcar [71–73], farelo de trigo [73] e o bagaço de cerveja (dreche) [37,74,75].

⁷ Substâncias ergogénicas incluem agentes farmacológicos e alguns nutrientes e têm por objectivo o melhoramento do rendimento desportivo de atletas.

Não é demais realçar que o ácido ferúlico não faz parte da fracção extractável das matrizes vegetais, vulgarmente isolada por técnicas simples de extracção líquido-líquido ou sólido-líquido. Por não se encontrar na sua forma livre mas sim covalentemente ligado a macromoléculas, a sua extracção requer técnicas capazes de quebrar essas ligações.

Um dos importantes aspectos referidos na literatura é a variação na concentração de ácidos hidroxicinâmicos nos cereais como a cevada, nomeadamente do ácido ferúlico, consoante a variedade da mesma, as condições de cultivo e de extracção. Durante a extracção, os métodos e as condições experimentais são também cruciais para a quantidade de ácido extraído.

Hernanz *et al.* (2001) [76], determinaram concentrações de ácido ferúlico que variam entre 8 e 26 mg/100 g de cevada, para as variedades Boira e Iranis (Espanha), respectivamente. Tendo em conta que durante o processo de maceração no fabrico de cerveja existe uma degradação extensiva do amido e das proteínas de reserva no mosto, o mesmo estudo mostrou que a concentração de ácido ferúlico aumenta em cinco vezes na dreche, quando comparada com a cevada não processada.

Moreira *et al.* [77–79] determinaram o conteúdo de ácido ferúlico em amostras de dreche resultantes de diferentes tipos de cevada, por extracção assistida por microondas, tendo sido obtidos resultados entre 149 ± 7 mg e 77 ± 3 mg de ácido ferúlico por 100 g de matéria seca, para amostras de dreche claras e escuras, respectivamente. A Figura 12, adaptada desse mesmo trabalho, mostra as diferenças entre as quantidades de ácido ferúlico extraído, consoante o tipo de dreche.

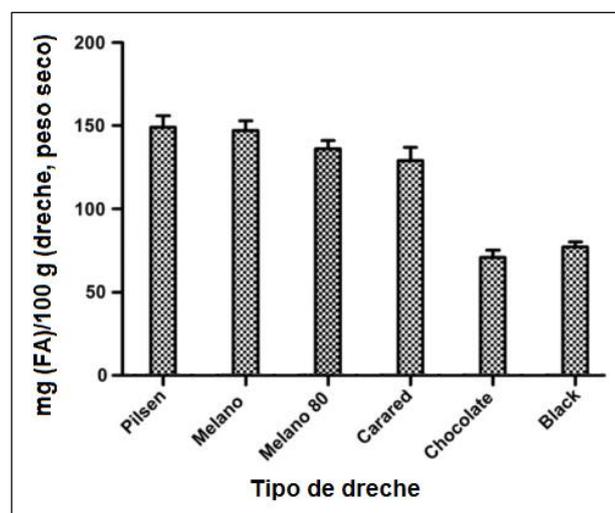


Figura 12 – Teor de ácido ferúlico em diferentes tipos de dreche, usando a extracção assistida por microondas. Adaptado de Moreira *et al.* (2012) [78].

3.4.1. Pré-tratamento com ácido diluído

O pré-tratamento do material seco com ácido sulfúrico diluído [75,81] é eficiente na remoção da fracção de hemicelulose – composta maioritariamente por polissacarídeos de baixo peso molecular que também são atacados por bases, a altas temperaturas –, resultando numa purificação parcial [86,5% (m/m)] da matriz.

A hidrólise ácida da hemicelulose liberta açúcares monoméricos e oligómeros solúveis da matriz da parede celular para a fase aquosa (hidrolisado). Como as ligações de *cross-link* dos ferulatos à hemicelulose se faz principalmente através das unidades de açúcar das ramificações, o tratamento com ácido pode originar ácido ferúlico livre ou ligado a lenhina (ataque tipo A) ou glucósidos de ácido ferúlico, hidrossolúveis (ataque tipo B) [82].

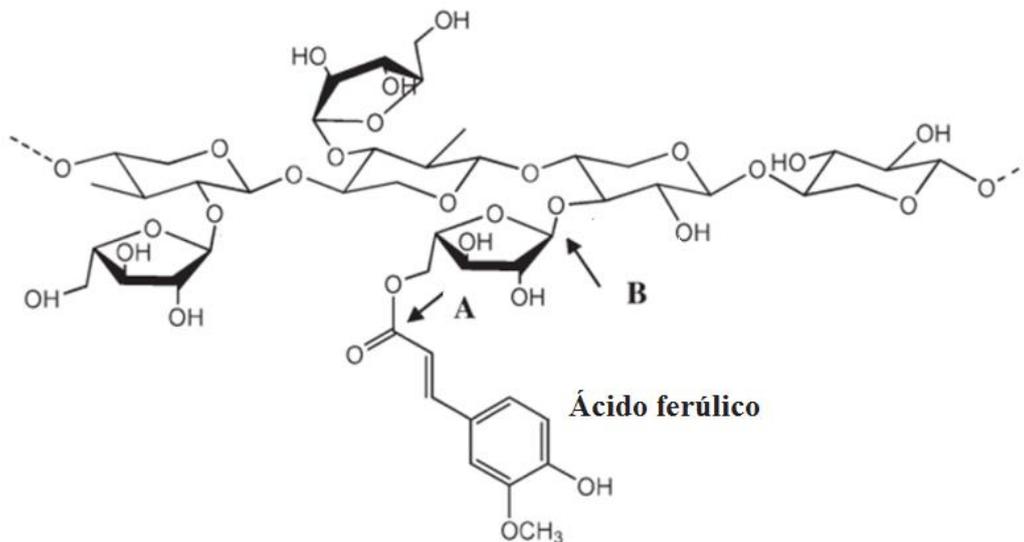


Figura 14 - Estrutura do ácido ferúlico esterificado à unidade de arabinose do arabinoxilano. Adaptado de Martins *et al.* (2011) [82].

Um estudo do hidrolisado resultante do tratamento com ácido diluído revelou a presença de 145,30 mg/l de ácido ferúlico na sua composição [75]. Apesar de resistente ao ataque por parte de ácidos diluídos [83], uma porção de lenhina também é solubilizada durante o processo, podendo constituir uma perda adicional de compostos de interesse.

3.4.2. Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina é aplicada aos materiais pré-tratados com ácido diluído [75,81] ou à matriz não sujeita ao tratamento prévio [71,84].

A matriz sólida é lavada e seca, sendo depois tratada com soluções de NaOH [81] em condições específicas de concentração, temperatura, tempo e rácio sólido/líquido. Posteriormente, os licores são obtidos por filtração e neutralizados [81]. Aparece ainda reportada na literatura a utilização de NaHSO₃ durante a hidrólise alcalina para prevenir a oxidação do ácido ferúlico [71].

A clivagem da ligação éter entre a lenhina e o ferulato é favorecida pela desprotonação de grupos OH dos monómeros da lenhina, com formação de intermediários do tipo quinona:

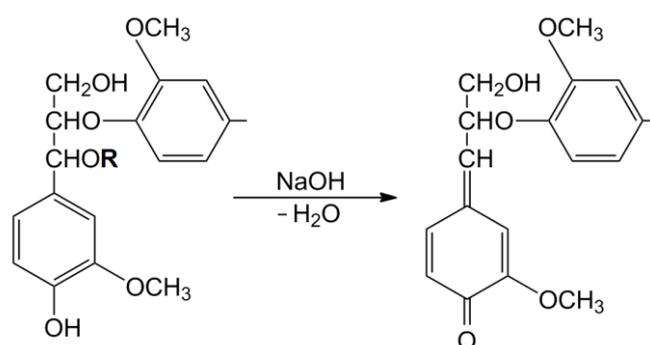


Figura 15 - Clivagem da ligação éter, entre a lenhina e o ferulato, com formação de uma quinona. Adaptado de Harmsen *et al.* (2010) [85].

Na literatura, também é reportada a realização da hidrólise alcalina a partir de diferentes amostras de biomassa sem tratamento prévio com ácido diluído [84]. Esta etapa é substituída pela adição de etanol ao hidrolisado neutralizado com HCl (6M), precipitando assim a hemicelulose, facilmente separável por centrifugação, mantendo o ácido ferúlico dissolvido na fase líquida.

Tabela 3 - Concentração em ácido ferúlico obtida por diferentes condições de extração, em amostras de dreche com e sem pré-tratamento.

Pré-tratamento	Condições da hidrólise alcalina	Tratamento pós-hidrólise	Concentração de ácido ferúlico	Ref.
Extração com etanol (95%) e hexano em banho de ultrassons	NaOH (2M), 20 °C, 16 horas em atmosfera inerte	Extração líquido-líquido com acetato de etilo	194,8 ± 14,3 mg/100 g	[76]

Pré-tratamento	Condições da hidrólise alcalina	Tratamento pós-hidrólise	Concentração de ácido ferúlico	Ref.
Ácido sulfúrico diluído	NaOH (2%), rácio 20 mL/g, 110 °C, 90 minutos, em banho de óleo	n.a.*	270 ± 20 mg/100 g	[77–79]
	NaOH (2%), 80 °C, 90 minutos		100,30 mg/L	
Ácido sulfúrico diluído	NaOH (2%), 120 °C, 90 minutos	n.a.*	145,30 mg/L	[75]
	NaOH (2%), 120 °C, 30 minutos		111,90 mg/L	
Ácido sulfúrico diluído	NaOH (12%), 130 °C, 75 minutos	Purificação com etanol	30,9 g/kg	[81]

*n.a. indica *não aplicado*.

3.4.3. Optimização dos parâmetros de extracção

Mussatto *et al.* (2007) [75] tiveram como objectivo o estudo da extracção dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico a partir da dreche, utilizando um rácio fixo de 1:20 (m/m) entre a matéria resultante do pré-tratamento da dreche com ácido sulfúrico diluído e a solução alcalina. Verificou-se que a condição óptima para a extracção do ácido ferúlico seria com uma concentração da solução de NaOH de 2,0% (m/v), a uma temperatura de 120 °C e com um tempo de reacção de 90 minutos (tempo máximo descrito pelos autores). Nestas condições, 90,2% (m/m) da lenhina foi solubilizada, tendo-se obtido 145,30 g de ácido ferúlico por litro de licor (resultante da hidrólise alcalina).

3.5. Purificação

Na literatura são descritas diferentes abordagens para a extracção e purificação ácido ferúlico, não só a partir da dreche mas também a partir de outras matrizes. O ácido ferúlico presente nos licores resultantes da hidrólise alcalina pode ser purificado por diferentes processos, sendo que os mais trabalhados são a purificação por adsorção em carvão activado [71,81], extracção etanólica [81,84] ou por adsorção em adsorventes poliméricos [86,87].

3.5.1. Purificação com etanol

Uma das abordagens possíveis aquando da purificação do ácido ferúlico a partir dos licores resultantes da hidrólise alcalina é a purificação com etanol. Este método tem por base o facto do ácido ferúlico ser solúvel em concentrações de etanol superiores ou iguais a 30%. Buranov e Mazza (2009) [84], após a hidrólise alcalina de diferentes amostras de biomassa – linho, trigo e milho –, e neutralização dos licores, precipitaram as hemiceluloses através da adição de etanol (95%). Diluições sucessivas dos hidrolisados em etanol, seguidas de evaporação do solvente, resultaram na precipitação do ácido ferúlico com elevado grau de pureza.

3.5.2. Purificação por adsorção em resina

Vários trabalhos referem a adsorção do ácido ferúlico em resinas como a Amberlite XAD-16 [87] ou resinas do tipo Lewatit [86], tendo em vista a sua purificação. Dávila-Guzman *et al.* (2012) [87] estudaram a adsorção do ácido ferúlico em Amberlite XAD-16, uma resina não-iónica e hidrofóbica.

Os resultados mostraram uma variação na capacidade de adsorção, dependente do pH, sendo que a pH 2 – 3 se obtiveram concentrações de ácido ferúlico na ordem dos 135 mg/g. Já o aumento do pH no meio de adsorção (entre 6 e 8) fez decair a eficiência de adsorção para valores situados entre 35 e 31 mg/g. Estes resultados podem ser explicados não só do ponto de vista da ionização do ácido ferúlico mas também pela natureza do adsorvente. A resina XAD-16 é uma matriz não polar, e por isso será um melhor adsorvente para compostos na sua forma não ionizada.

Conidi *et al.* (2015) [86] estudaram a adsorção em resinas poliméricas com o objectivo da recuperação, concentração e purificação de compostos fenólicos (ácido clorogénico) a partir de efluentes de alcachofra usando três diferentes resinas macroporosas à base de polistireno (Lewatit S 6328 A, Lewatit S 2328 e Lewatit S 7968). A S 6328 A é uma resina de troca aniónica, fortemente alcalina; a S 2328 é uma resina *food grade* de troca catiónica, fortemente acídica e a S 7968 é uma resina sem grupos funcionais. Antes da sua utilização, as resinas foram submetidas a um processo de activação por lavagens alternadas com HCl (6%) e NaOH (4%).

Os resultados mostram que a resina Lewatit S 7968 é aquela em que há maior capacidade de adsorção do ácido clorogénico, quando comparado com as outras resinas. Esta foi também a resina que permitiu uma dessorção mais eficiente.

Relativamente aos açúcares (glucose, frutose e sacarose), Conidi *et al.* (2015) [86] compararam a sua concentração antes e após a adsorção em resinas, concluindo que não há uma adsorção significativa.

O presente trabalho teve como principais objectivos a caracterização físico-química da dreche e a sua utilização como matéria-prima para a extracção do ácido ferúlico, através de hidrólise alcalina. O trabalho propõe igualmente a realização da extracção em autoclave, tendo em vista um potencial aumento de escala do processo. A purificação do ácido ferúlico extraído pode ser levada a cabo por adsorção em resinas sintéticas, aspecto também estudado na parte prática desta dissertação.

II. Parte Experimental

1. Materiais e equipamentos

1.1. Dreche

As amostras de bagaço de cerveja (*dreche*) foram gentilmente cedidas pela Empresa de Cervejas da Madeira, em Novembro de 2014. Durante o processo de fabrico da cerveja, a *dreche* foi recolhida e liofilizada para evitar contaminação microbiana. A matéria seca foi então moída e armazenada a -20 °C.

1.2. Reagentes, compostos de referência e equipamentos

Os reagentes de laboratório correntes, padrões e solventes estão descritos no Anexo A. Os equipamentos utilizados constituem o Anexo B.

2. Caracterização físico-química da dreche

2.1. Determinação do teor de humidade

A determinação do teor de humidade foi levada a cabo na *dreche* logo após a sua recolha. Utilizou-se uma balança de humidade KERN DBS 60-3, com um programa de secagem automático, em que a temperatura na câmara atinge os 120 °C, que se mantém até que a percentagem de humidade se mantenha estável por 30 segundos. As análises foram realizadas em triplicado, sendo o resultado expresso na forma de média ± desvio padrão.

2.2. Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado pela incineração de amostras de *dreche* numa mufla NABERTHERM L3/C6. Os cadinhos de porcelana foram tarados e a massa de *dreche* adicionada foi registada. Após incineração, os cadinhos foram colocados num exsiccador até atingirem a temperatura ambiente e a massa de cinzas foi determinada. A mufla foi programada para uma rampa de aquecimento de 18 horas (20 – 500 °C). O procedimento foi realizado em triplicado e o teor de cinzas foi calculado para cada um dos triplicados através da equação:

$$(\%)Cinzas = \frac{m(cinza)(g)}{m(dreche)(g)} \times 100$$

2.3. Determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix)

Os sólidos solúveis totais foram determinados para a água recolhida durante a prensagem da *dreche* fresca e na lavagem das amostras de *dreche*, utilizando um

refractómetro ATAGO RX-1000 (Tóquio, Japão). Uma recta de calibração foi obtida pela análise em refractómetro de diluições sucessivas de uma solução de sacarose (10 – 100 g/L) (Anexo C, Figura 1). Todas as análises foram realizadas em triplicado e o resultado expresso em gramas de equivalente de sacarose por litro de solução.

2.4. Determinação da distribuição granulométrica

Com vista à determinação da distribuição granulométrica, três porções de dreche com aproximadamente 5 gramas foram feitas atravessar um conjunto de 4 crivos, pesando-se a porção que atravessou cada um deles. Esta distribuição corresponde assim a 5 diferentes fracções distintas. Através da equação abaixo, foi possível determinar a percentagem de dreche resultante em cada uma das fracções:

$$(\%)Fracção\ x = \frac{m_{(dreche,\ fracção\ x)}}{m_{(dreche,\ utilizada\ no\ ensaio)}} \times 100$$

2.5. Determinação do teor de extractáveis

A dreche previamente lavada com água destilada e seca foi extraída com acetona (60%), por adição de 200 mL de solvente a 4 g de dreche. A extracção decorreu durante uma hora em banho de ultrassons. Após o tempo de extracção, a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e centrifugada a 4000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi evaporado em evaporador rotativo e a fase aquosa liofilizada. A dreche extraída foi lavada com água destilada, liofilizada e armazenada a -20°C para posterior estudo por hidrólise alcalina. O extracto liofilizado foi então analisado em HPLC-DAD-ESI-MSⁿ e o seu conteúdo total de fenólicos foi determinado (secção 2.5.2)

2.5.1. Conteúdo total de fenólicos (*Total Phenolic Content, TPC*)

As análises espectrofotométricas com vista à determinação do conteúdo de fenólicos totais foram levadas a cabo utilizando um espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-Vis Spectrophotometer, modelo Lambda 2 do equipamento. Este parâmetro foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Os extractos foram oxidados com o reagente de Folin-Ciocalteu e a reacção foi neutralizada com carbonato de sódio. Mediu-se a absorvância a 765 nm passados 30 minutos de reacção à temperatura ambiente e na ausência de luz. O ácido gálico foi utilizado como padrão, motivo pelo qual o conteúdo de fenólicos totais vem expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de dreche. A recta de calibração foi obtida usando concentrações compreendidas entre 50 e 600 mg/L (Anexo C, Figura 2). Utilizou-se uma solução de Folin-Ciocalteu (PANREAC) diluída em água destilada (1:10), carbonato de sódio

(Sigma-Aldrich, $\leq 99,8\%$) a 7,5% em água destilada e uma solução-mãe de ácido gálico (PANREAC, 99%) de concentração 1 g/L.

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibdato e fosfotungstato, na qual o molibdénio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); na presença de certos agentes redutores, formam-se os chamados complexos molibdénio-tungsténio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que podem não ter natureza fenólica [88,89]. Isto é, o método utilizado é um método aproximado, uma vez que na presença de outros compostos redutores e não fenólicos, entre os quais açúcares, os resultados são obtidos por excesso.

As amostras foram preparadas em frascos de 3 mL, adicionando-se 1,25 mL de solução Folin-Ciocalteu (1:10), 50 μL de amostra e 1 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Desta feita, para obtenção da recta de calibração utilizaram-se as soluções de ácido gálico preparadas anteriormente como amostra, sendo que para o branco se substituiu a amostra por 50 μL de metanol. De igual modo, aquando da análise do extracto, utilizou-se 50 μL do mesmo. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

2.5.2. Análise do extracto resultante da extracção com acetona por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ

O método aplicado na análise por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ foi descrito e validado por Gouveia (2011) [90].

Preparação da amostra

A amostra foi preparada com concentração de 5 mg/L por dissolução do extracto liofilizado no solvente de extracção (acetona 60%). Após agitação vigorosa em *vortex*, a solução foi filtrada através de filtro de membrana 0,45 μm e injectada no equipamento.

Cromatografia Líquida

As análises foram levadas a cabo num equipamento Dionex Ultimate 3000, acoplado a uma bomba binária, um detector de díodos (*DAD – Diode-array detector*), um *autosampler*, um injector automático e um compartimento de coluna. Para todas as separações foi utilizada uma coluna Phenomenex Gemini C₁₈ (5 μm , 250x3.0 i.d.,

Pheomenex) com um volume de injeção de 10 µL. A melhor separação foi conseguida com a seguinte fase móvel: (A) acetonitrilo e (B) água ultra-pura acidificada (0.1%) com ácido fórmico. O gradiente utilizado foi: 20% A (0 min), 25% A (10 min), 25% A (20 min), 50% A (40 min), 100% A (42 – 47 min) e 20% A (49 – 55 min). O fluxo foi mantido a 4 µL/min. A temperatura da coluna foi controlada a 30 °C.

Espectrometria de massa

Para análise em HPLC-ESI/MSⁿ, foi utilizado um espectrómetro de massa Ion Trap Bruker Esquire (Bremen, Alemanha), modelo 6000, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A aquisição e processamento de dados foi efectuada com o *software* Esquire. Os espectros de massa de iões negativos do eluato foram registados entre *m/z* de 100 a 1000 numa velocidade de *scan* de 13000 Da/s. O azoto (N₂) de alta pureza foi usado como gás de secagem, com um fluxo de 10,0 mL/min e também como gás nebulizador a uma pressão de 50 psi. A temperatura do nebulizador foi ajustada para 365 °C e um potencial de +4500 V foi utilizado no capilar. Como gás de colisão foi usado hélio (He) ultra-puro, a uma pressão de 1x10⁻⁵ mbar e a energia de colisão foi definida para 40 V. A aquisição dos dados MSⁿ foi feita com modo auto MSⁿ. Para análise de MSⁿ o espectrómetro de massa foi sondado de 10 a 1000 *m/z* com amplitude de fragmentação de 1,0 V (MSⁿ até MS⁴) e dois iões percursores.

3. Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina, esquematizada na Figura 16, foi realizada por adição de solução de hidróxido de sódio a amostras de dreche. A mistura foi colocada num tubo reactor autopressurizado (ACE pressure tube) de 15 mL e aquecida em banho de óleo, com agitação magnética constante (~1000 rpm). Após o tempo estipulado para as reacções, os licores obtidos foram arrefecidos à temperatura ambiente, centrifugados a 4000 rpm, por 25 minutos, a 10 °C e o sobrenadante – licor de cor castanha escura – foi recolhido. O resíduo sólido corresponde à fracção de lenhina insolúvel, celulose e hemiceluloses não removidas. Seguiu-se a diluição (1:3) deste sobrenadante em etanol absoluto, o que conduziu à precipitação da hemicelulose, posteriormente separada por centrifugação (3000 rpm, por 15 minutos), originando um sobrenadante castanho translúcido – extracto parcialmente purificado.

A fase líquida foi neutralizada (até pH 5-6) com uma solução de ácido clorídrico (6 M) e o excesso de etanol evaporado em evaporador rotativo. As amostras (fases aquosas) daí resultantes foram congeladas a -80 °C e liofilizadas, procedendo-se

posteriormente à sua análise por HPLC-DAD (vide *Análise dos extractos obtidos*, secção 3.4, página 51).

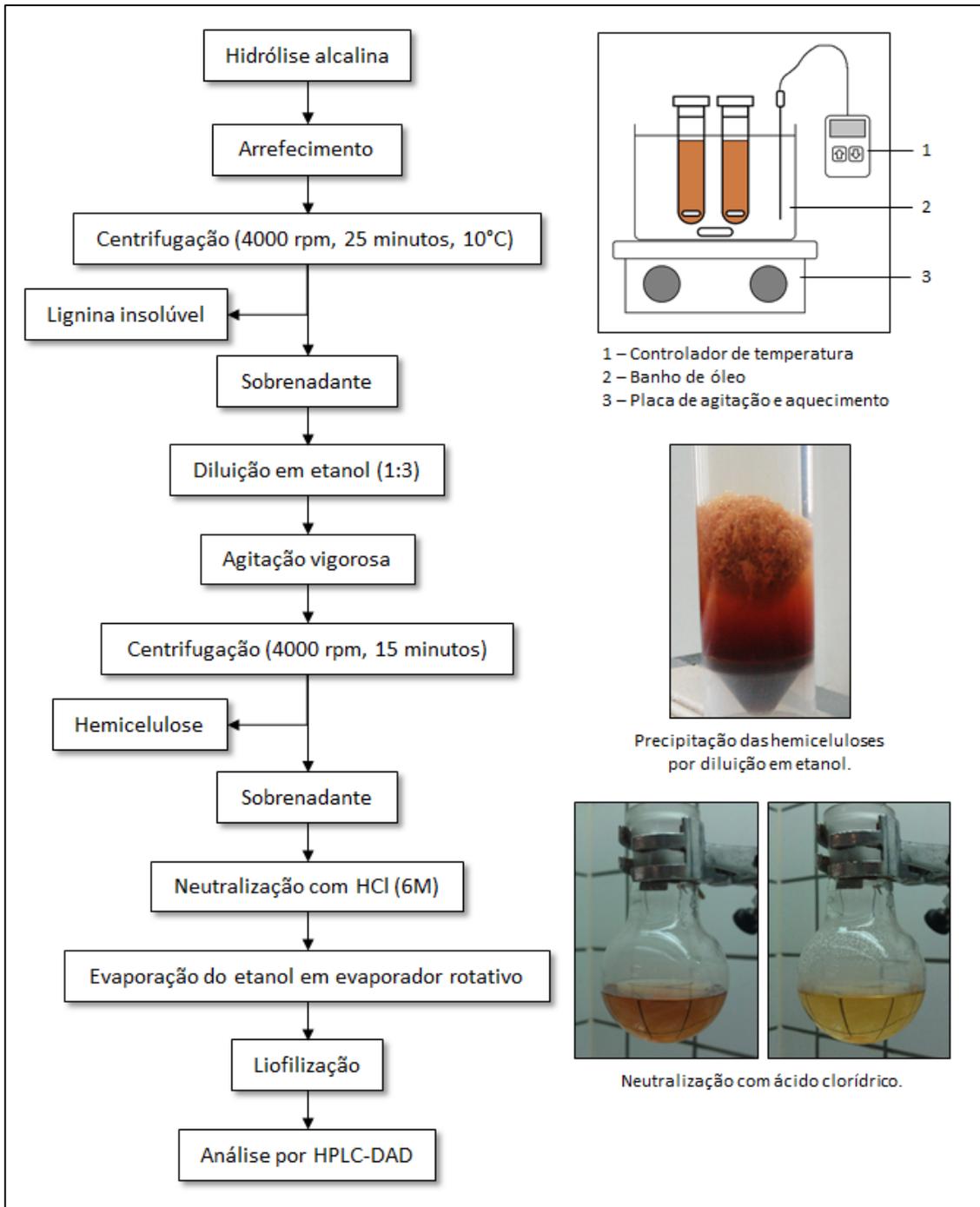


Figura 16 - Esquema geral para o procedimento do tratamento aos hidrolisados obtidos por hidrólise alcalina, também ilustrada.

3.1. Efeito do tratamento prévio das amostras de dreche

Com o objectivo de estudar o efeito do pré-tratamento da dreche na eficiência de extracção do ácido ferúlico, desenvolveram-se ensaios de hidrólise alcalina a amostras de dreche extraídas previamente com acetona (60%), obtidas aquando do estudo do teor de extractáveis e em amostras pré-tratadas com ácido diluído.

3.1.1. Extracção prévia com acetona

A dreche obtida na Secção da *Determinação do teor de extractáveis* (página 44) – extraída com acetona (60%) em banho de ultrassons por 1 hora – foi sujeita ao processo de hidrólise alcalina, em duplicado, a 120 °C, por 2,5 horas com rácio fixo de 20 mL de NaOH (2%) para 1 g de dreche. Todo o procedimento referente à hidrólise alcalina foi desencadeado de acordo com o descrito anteriormente. Para comparação, desenvolveu-se um ensaio, também em duplicado e nas mesmas condições, para a dreche não tratada previamente.

3.1.2. Pré-tratamento com ácido diluído

Tendo por base as condições descritas por Mussatto e Roberto (2005) [29] e McMillan (1994) [81], uma amostra com cerca de 4 g de dreche foi submetida a um pré-tratamento com 32 mL de ácido sulfúrico diluído (3%). A mistura foi colocada em refluxo, em balão com condensador, a 100 °C durante 30 minutos, tempo ao fim do qual se procedeu à sua centrifugação (a 4000 rpm, por 25 minutos). O resíduo sólido – dreche tratada – foi lavado com água destilada até pH neutro e liofilizado. A percentagem de hidrolisados foi determinada por aplicação da equação

$$X(\%) = \frac{m(\text{dreche, inicial}) - m(\text{dreche, tratada})}{m(\text{dreche, inicial})} \times 100$$

Procedeu-se depois a um ensaio de hidrólise alcalina, em duplicado, a 120 °C, por 2,5 horas com rácio fixo de 20 mL de NaOH (2%) para 1 g de dreche. O procedimento aplicado foi o descrito anteriormente, tendo sido realizado um ensaio nas mesmas condições, utilizando-se dreche não submetida a pré-tratamento, para comparação.

3.2. Efeito da extracção por autoclave

Tendo em vista um posterior *scale-up* do processo de extracção do ácido ferúlico, e na tentativa de mimetizar as condições de aumento de pressão e temperatura dos tubos autopressurizados, um ensaio de hidrólise alcalina foi levado a cabo em autoclave a 120 °C por 1,5 horas, com NaOH (2%), num rácio fixo de 20 mL de solução

alcalina por grama de dreche. Desta feita, em dois frascos de vidro com cerca de 100 mL de capacidade, foram colocadas cerca 1 g de dreche e 20 mL de NaOH (2%). Após a reacção, o hidrolisado foi arrefecido à temperatura ambiente e submetido ao procedimento já estabelecido anteriormente. Como controlo do método de extracção, um ensaio em tubos autopressurizados foi desenvolvido, em duplicado, nas mesmas condições.

3.3. Simplificação do procedimento subsequente à hidrólise alcalina

A simplificação do procedimento posterior à reacção de hidrólise alcalina pode constituir uma mais-valia no processo de extracção do ácido ferúlico, nomeadamente através da diminuição de recursos físicos e energéticos necessários à sua execução. O procedimento habitual a que os hidrolisados são submetidos acarreta uma etapa de separação da fracção de lenhina insolúvel por centrifugação, com posterior precipitação da fracção de hemicelulose – promovida pela adição de etanol –, que é separada por nova centrifugação, de acordo com o que sugerem as Figuras 16 e 17A. O sobrenadante é depois neutralizado, o excesso de etanol é evaporado em evaporador rotativo e a fase aquosa daí resultante é liofilizada e analisada.

Desta feita, a proposta de simplificação deste processo reside na precipitação da fracção de hemicelulose ainda na presença da fracção de lenhina insolúvel, sendo posteriormente separadas em simultâneo por centrifugação, de acordo com o esquema B da Figura 17. Assim, a simplificação permite uma diminuição no tempo de tratamento, nos recursos físicos e energéticos (nomeadamente associados às etapas de centrifugação), bem como uma diminuição de perdas associadas às transferências dos hidrolisados. O sobrenadante livre das fracções de lenhina insolúvel e hemicelulose segue depois o procedimento normal de neutralização, evaporação e liofilização.

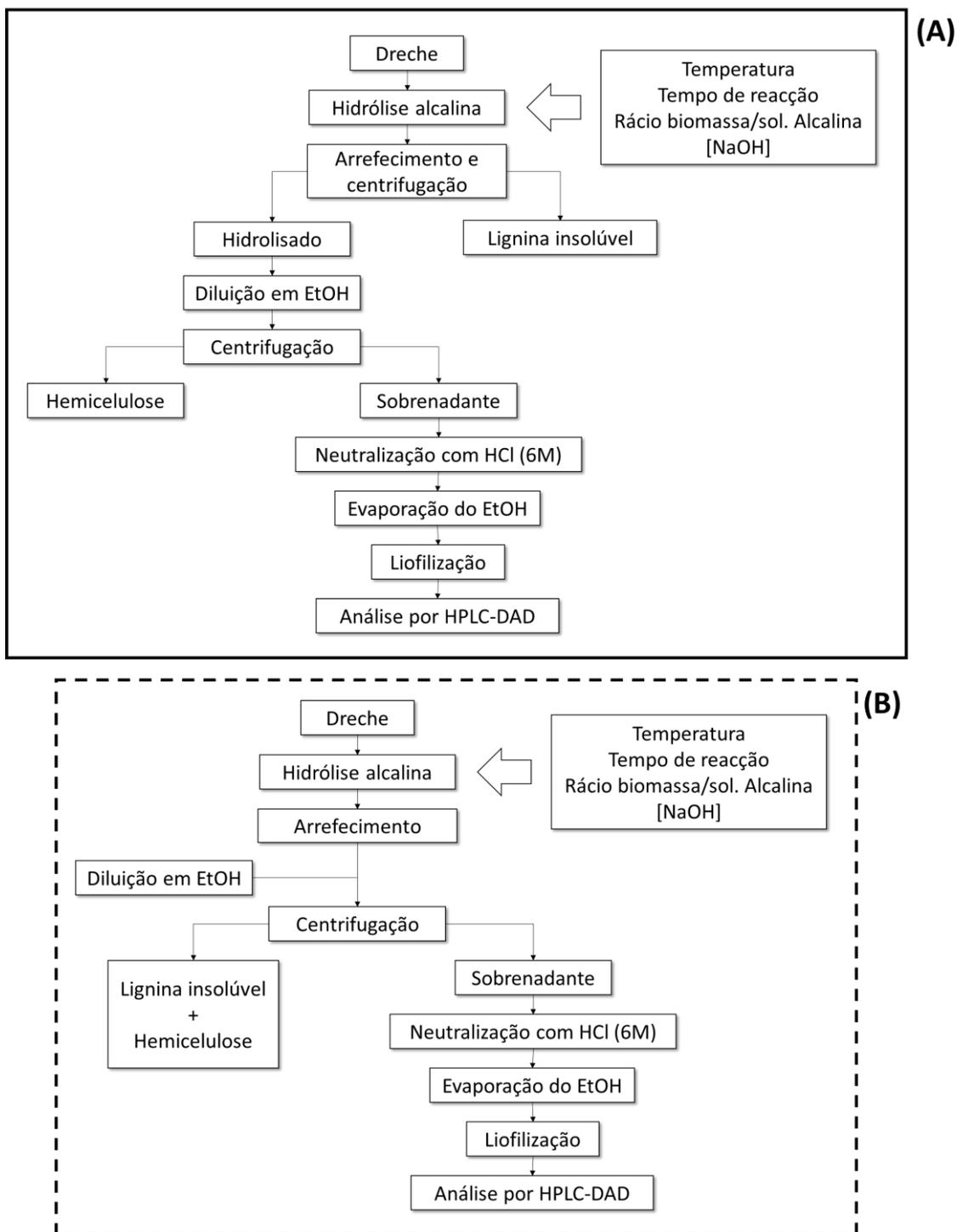


Figura 17 - Esquema do procedimento de tratamento dos hidrolisados obtidos por hidrólise alcalina. A Parte A (inserida no rectângulo a inteiro) corresponde ao procedimento habitual, com separação da lenhina insolúvel e posterior precipitação e separação da fracção de hemicelulose. A Parte B (inserida no rectângulo a tracejado) corresponde à proposta de simplificação do procedimento, em que a precipitação da hemicelulose (promovida por adição de etanol) é levada a cabo ainda na presença da fracção de lenhina insolúvel, sendo estas duas separadas posteriormente do sobrenadante. Todo o processo seguinte é desenvolvido de forma semelhante, nomeadamente a neutralização do sobrenadante, evaporação do etanol em evaporador rotativo, liofilização da fracção aquosa daí resultante e análise por HPLC-DAD.

3.4. Análise dos extractos obtidos

Os extractos obtidos através dos ensaios descritos anteriormente foram analisados do ponto de vista do conteúdo total de fenólicos, do teor de sólidos solúveis totais e da capacidade antioxidante. Para estudo do conteúdo total de fenólicos, foram construídas soluções dos extractos em metanol (5 mg/mL), tendo-se utilizado o mesmo procedimento descrito atrás (Secção *Determinação do teor de extractáveis*). Para estudo do teor de sólidos solúveis totais, procedeu-se à análise de soluções dos extractos em água destilada (10 mg/mL), que foram analisadas em refractómetro, em triplicado.

A quantificação do ácido ferúlico foi levada a cabo através de HPLC-DAD (Secção 4, *Quantificação do ácido ferúlico nas amostras por HPLC-DAD*).

3.4.1. Análise da capacidade antioxidante

O estudo da capacidade antioxidante foi realizado adicionando 100 µL de solução metanólica de extracto (5 mg/mL) a 3,9 mL de solução de DPPH (0,06 mM). Após 30 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz, a absorvância foi medida a 516 nm e os resultados foram obtidos através de uma recta de calibração com Trolox (um análogo da vitamina E). O resultado, obtido através de uma recta de calibração (Anexo C, Figura 3), vem assim expresso em milimolar de equivalente de Trolox por 100 gramas de dreche. Todas as análises foram feitas em triplicado.

O 1,1-difenil-2-piril-hidrazil (DPPH) é um radical livre estável, com um electrão de valência desemparelhado num átomo de azoto (Figura 18).

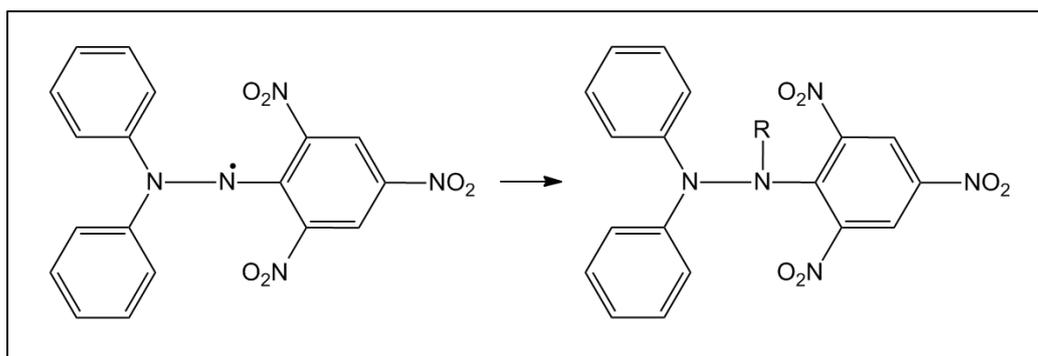


Figura 18 - Neutralização do radical DPPH.

O método de neutralização do DPPH, enquanto ensaio *in vitro* para determinação da capacidade antioxidante, aparece na literatura com muitas adaptações e variações do método original [91] Tratando-se de um método colorimétrico, baseia-se na mudança de cor que o composto adquire quando na sua forma radicalar – com

absorção em torno dos 350 nm – e quando neutralizado, forma em que absorve na região dos 500 – 520 nm.

3.5. Optimização das condições de hidrólise alcalina por variação individual dos parâmetros experimentais

Com o objectivo de otimizar as condições de hidrólise alcalina, diferentes ensaios foram levados a cabo, fazendo-se variar, individualmente, cada um dos parâmetros (temperatura, tempo reaccional e concentração da solução alcalina). Estudos prévios mostraram que, nas condições experimentais utilizadas, o rácio solução alcalina / biomassa de 20 mL/g é aquele que fornece as condições necessárias à redução de perdas do hidrolisado, mantendo-se assim o rácio fixo nesse valor. Tendo por base um ensaio controlo (80 °C, durante 1 hora, com um rácio de 20 mL de solução NaOH (2%) por grama de dreche), os diferentes parâmetros foram feitos variar individualmente, com ensaios realizados em duplicado, de acordo com as tabelas abaixo.

Tabela 4 - Descrição dos parâmetros em optimização nos ensaios de optimização da hidrólise alcalina.

Bateria de Ensaios	Parâmetro em optimização
A	Temperatura reaccional (°C)
B	Tempo reaccional (horas)
C	Concentração da solução alcalina (%)

Tabela 5 - Indicação dos parâmetros individuais de optimização nos ensaios de optimização da hidrólise alcalina.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo de reacção (horas)	[NaOH] (% m/m)
A1	60		
A2	80		
A3	100	1,0	2,0
A4	120		
B1		1,0	
B2		1,5	
B3	80	2,0	2,0
B4		2,5	
B5		3,0	
C1			0,5
C2			1,0
C3	80	1,0	1,5
C4			2,0
C5			2,5

Os ensaios sobre a variação da temperatura de reacção tiveram lugar mantendo fixo o tempo de reacção de 1 hora, bem como a concentração da solução alcalina (2%). As temperaturas estudadas variam entre os 60 e os 120 °C com intervalos de 20 °C. Para os ensaios de optimização do tempo de extracção, a temperatura das reacções foi mantida a 80 °C, utilizando NaOH (2%). Os ensaios foram desenvolvidos em tempos que variaram entre 1 e 3 horas, com intervalos de 30 minutos entre eles. Finalmente, seguiu-se a optimização da concentração da solução alcalina. Durante estes ensaios manteve-se a temperatura a 80 °C, com as reacções a decorrer no período de 1 hora. A concentração da solução alcalina foi então feita variar entre os 0,5 e os 2,5%, intervalada a 0,5%.

Após a execução das reacções relativas aos ensaios de optimização, os hidrolisados foram submetidos ao tratamento descrito anteriormente, procedimento após o qual se obtiveram os liofilizados a analisar via HPLC-DAD para quantificação do ácido ferúlico.

4. Quantificação de ácido ferúlico nas amostras por HPLC-DAD

4.1. Preparação das amostras

Para análise dos liofilizados obtidos, procedeu-se à preparação de soluções de 5 mg/L. Para frascos de 3 mL pesou-se 10 mg de cada liofilizado e adicionou-se 2 mL de uma solução de etanol (50%) em água ultra-pura acidificada com ácido fórmico (0,1%). Agitou-se vigorosamente e filtrou-se com filtro de membrana 0,45 µm.

4.2. Preparação das soluções-padrão

Para quantificação do ácido ferúlico nas amostras, foi preparada uma recta de calibração, por análise nas mesmas condições de soluções com concentrações entre 5 e 100 mg/L de ácido ferúlico puro (Anexo C, Figura 4).

4.3. Análise por HPLC-DAD

As análises foram levadas a cabo num instrumento Dionex Ultimate 3000, acoplado a uma bomba binária, um detector de díodos (DAD – *Diode-array detector*), um *autosampler*, um injector automático e um compartimento de coluna. Para todas as separações foi utilizada uma coluna Phenomenex Gemini C₁₈ (5 µm, 250x3.0 i.d., Phenomenex). A fase móvel consistiu em (A) acetonitrilo e (B) água ultra-pura acidificada (0,1%) com ácido fórmico. O fluxo isocrático utilizado conteve 25 % (A) e 75 % (B). O

fluxo foi de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, com um volume de amostra de 5 μL . A detecção foi efectuada no comprimento de onda máximo para o ácido férúlico ($\lambda=320\text{ nm}$).

5. Estudo de adsorção em resina Lewatit VPOC1064 MD PH®

A Lewatit VPOC1064 MD PH® é uma resina adsorvente sem grupos funcionais, do mesmo fabricante das resinas usadas por Conidi *et al.* (2015) [86]. De acordo com as indicações do fabricante, tem muita boa estabilidade química e mecânica e grânulos de tamanho uniforme. A resina foi gentilmente oferecida pelo fabricante.

5.1. Activação da resina

Antes dos ensaios de adsorção, a resina foi activada de acordo com o descrito por Conidi *et al.* (2015) [86]. Assim, uma porção de 15 g de resina foi sujeita a lavagens com soluções de HCl (6%) e NaOH (4%), tendo-se usado água destilada entre elas. No final do processo, a resina foi lavada com água destilada até se atingir um pH próximo do da água destilada. Determinou-se o teor de humidade da resina activada.

5.2. Estudos de equilíbrio e cinética de adsorção

Os estudos de equilíbrio e cinética de adsorção foram levados a cabo em diferentes condições, colocando uma porção de resina activada em contacto com uma solução de ácido férúlico (Sigma-Aldrich, 99%) em água ultra-pura (preparada tipicamente a 60 °C). A mistura foi colocada em agitação constante e várias amostras foram recolhidas ao longo de 180 minutos – de 2 em 2 minutos nos primeiros 10 minutos, de 10 em 10 minutos até os 100 minutos e de 20 em 20 até os 180 minutos.

De acordo com Dávila-Guzman *et al.* (2012) [87] foi preparada uma recta de calibração com ácido férúlico comercial, por leitura a 373 nm⁸ (Anexo C, Figura 5)). A comparação da absorvância registada para a solução inicial e para as amostras recolhidas permitiu o cálculo do rácio (C/C_0) (concentração do ácido férúlico na amostra sobre a concentração inicial), a partir do qual se procedeu à discussão dos resultados obtidos.

A capacidade de adsorção da resina foi estudada em diferentes condições, com vista ao estudo da influência de diferentes variáveis como (1) a dispersão do ácido

⁸ A detecção a 373 nm, e não a 320 nm é geralmente utilizada em amostras reais por permitir quantificar o ácido férúlico por espectrofotometria UV-visível, não só na sua forma livre mas incluindo também possíveis dímeros e trímeros, feruil esterres ou éteres. Nesta parte do trabalho, usou-se o FA puro; não foi efectuada a medição ao comprimento de onda máximo de absorção, como seria correcto, para poder comparar os dados com o desta referência bibliográfica.

ferúlico na solução inicial de adsorção, (2) a concentração inicial da solução de ácido ferúlico e (3) a temperatura da mistura durante a adsorção.

5.2.1. Efeito da dispersão do ácido ferúlico na mistura

Mantendo fixa a temperatura (25 °C) e o volume de solução inicial (50 mL) a concentração da solução foi feita variar (0,25; 0,5 e 1 g/L) assim como a massa de resina utilizada em cada um dos três ensaios (0,125; 0,25 e 0,5 g, respectivamente).

5.2.2. Efeito da variação da concentração da solução inicial

Para o estudo do efeito da variação da concentração de ácido ferúlico na solução inicial do sistema de adsorção, foram testadas as concentrações de 1 e 0,25 g/L, mantendo fixo o volume de solução utilizado (50 mL), a massa de resina (0,5 g), tendo os ensaios decorrido à temperatura ambiente.

5.2.3. Efeito da temperatura na mistura de adsorção

O estudo do efeito da temperatura na capacidade de adsorção foi conseguida fazendo variar este parâmetro (entre a temperatura ambiente e um banho de gelo), mantendo fixos todos os outros parâmetros (concentração do ácido ferúlico, volume de solução e massa de resina).

5.3. Recuperação do material adsorvido

A resina carregada com ácido ferúlico foi ressuspendida numa solução de etanol (70%) e colocada em agitação magnética. Ao fim de 40 minutos, a mistura foi filtrada e o filtrado foi recolhido. O excesso de etanol foi evaporado em evaporador rotativo e a fase aquosa foi deixada em repouso para cristalização do ácido ferúlico.

5.4. Reciclagem da resina

Com vista ao estudo sobre a possibilidade de reciclagem da resina utilizada na adsorção, procedeu-se a três ciclos de activação, adsorção e recuperação do material adsorvido.

5.5. Estudo sobre a adsorção de açúcares

Com o objectivo de estudar a selectividade da resina Lewatit VPOC1064 MD PH® para o ácido ferúlico (e, inevitavelmente, para compostos relacionados), e uma vez que a matriz a partir da qual se pretende a sua purificação é rica em açúcares, considerou-se pertinente o estudo sobre a adsorção de açúcares nesta resina.

Três soluções de sacarose, glucose e arabinose (10 g/L) foram preparadas em água destilada. Uma porção com 3 mL de cada uma dessas soluções foi colocada em agitação com cerca de 0,15 g de resina activada. A mistura foi submetida a agitação constante e ao fim de uma hora o sobrenadante foi recolhido por filtração. A determinação do conteúdo total de sólidos solúveis das soluções antes e depois do ensaio de adsorção permitiu aferir sobre a adsorção dos açúcares em estudo.

5.6. Purificação do extracto resultante da hidrólise alcalina

A Figura 19 esquematiza o procedimento desenvolvido aquando da purificação por adsorção em resina, do extracto resultante da hidrólise alcalina.

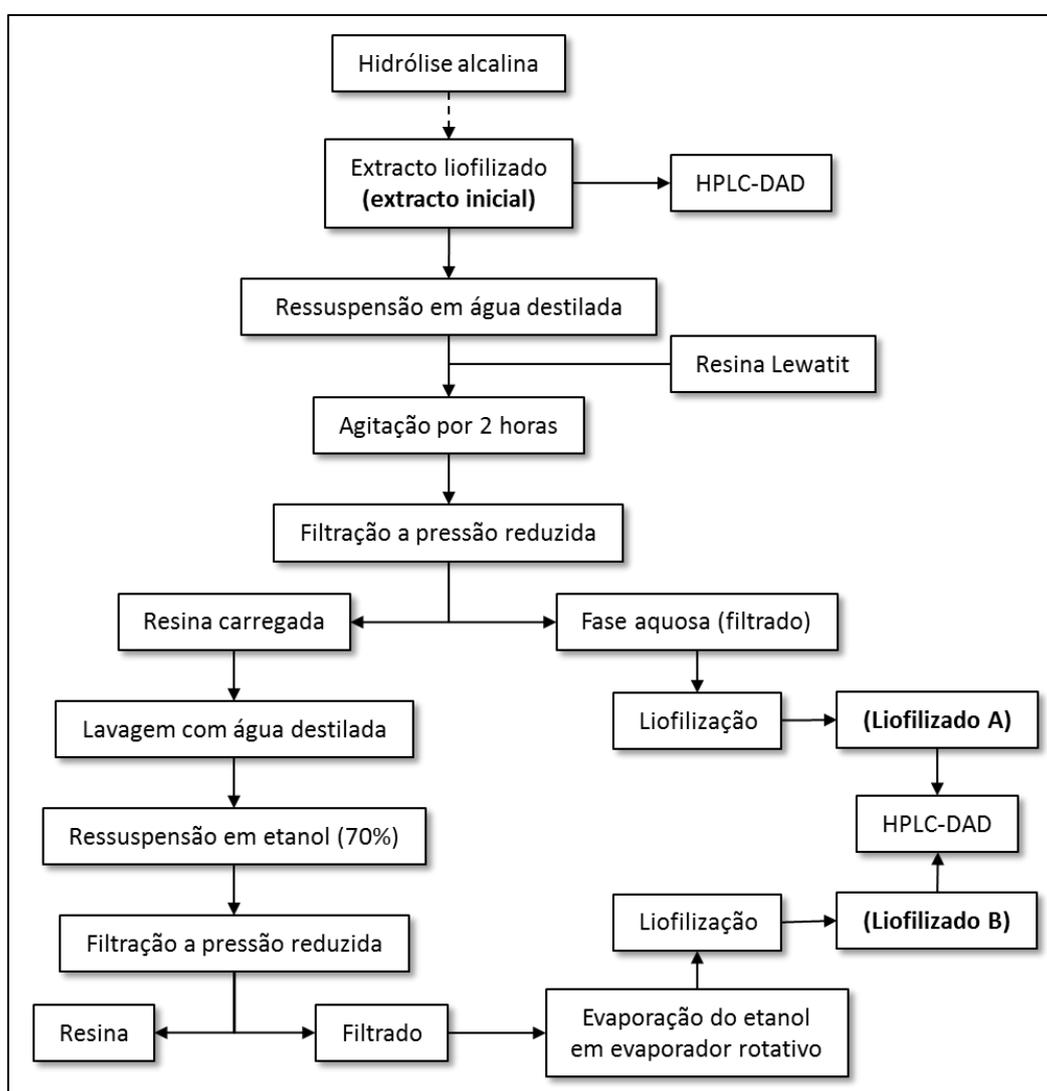


Figura 19 - Esquema para a purificação do extracto resultante da hidrólise alcalina por adsorção.

O extracto foi obtido por hidrólise alcalina, levada a cabo a 120 °C, por 1,5 horas, com NaOH (2%) numa rácio de 20 mL/g, em autoclave. Após a reacção, o hidrolisado foi submetido ao tratamento indicado anteriormente, tendo-se optado pela proposta de

simplificação (Parte B da Figura 18). Após liofilização, a concentração em ácido ferúlico foi determinada por HPLC-DAD, sendo tratada como a concentração inicial. Parte do extracto (cerca de 2 g) foi ressuspensa em 40 mL de água destilada, a quente (40 – 50 °C), numa placa de agitação e aquecimento. Após promover o seu arrefecimento até à temperatura ambiente, uma porção de resina activada (10 g) foi adicionada e a mistura foi colocada em agitação durante duas horas, na ausência de luz.

Findo o tempo de adsorção, a mistura foi filtrada a pressão reduzida, em funil de Buchner, a partir da qual se obteve a resina carregada. O filtrado foi liofilizado e analisado por HPLC-DAD com vista à quantificação ácido ferúlico. A resina carregada foi lavada com água destilada gelada para remover possíveis açúcares residuais, tendo sido depois ressuspensa em etanol (70%), com agitação por 30 minutos e filtrada a pressão reduzida. A resina foi novamente submetida a dessorção com etanol (70%) e filtrada. Os filtrados foram combinados e evaporados em evaporador rotativo, com vista à remoção do excesso de etanol, seguindo-se a liofilização e análise do liofilizado por HPLC-DAD e caracterização.

III. Resultados e Discussão

1. Caracterização físico-química da dreche

1.1. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade foi determinado para a amostra de dreche, logo após a sua recolha, com análise em triplicado. O resultado revelou um teor de humidade médio de $68,44 \pm 0,93\%$.

1.2. Determinação do teor de cinzas

Com a determinação do teor de cinzas, por pesagem das cinzas resultantes da incineração das amostras de dreche, em triplicado, o resultado obtido revelou um teor de cinzas médio igual a $3,59 \pm 0,06\%$. Este resultado difere apenas ligeiramente daquele obtido por Meneses *et al.* (2013) [5] que reportou um teor de cinzas correspondente a $4,18 \pm 0,03\%$.

Esta ligeira diferença pode estar relacionada com o tipo de dreche utilizada, uma vez que outros autores, nomeadamente Moreira *et al.* (2013) [77], determinaram que o tipo de dreche condiciona o resultado para diferentes parâmetros estudados. Desta forma, também o teor de cinzas pode variar dependendo do tipo de dreche.

1.3. Determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix)

Com vista à determinação dos sólidos solúveis totais, expresso em miligramas de equivalente de sacarose por litro de solução, procedeu-se à construção de uma recta de calibração com sacarose (1 – 100 mg/L) através da leitura em refractómetro, em triplicado. Com a medição de °Brix na água recolhida durante a prensagem da dreche obteve-se um resultado correspondente a 59,19 mg/L.

Por outro lado, a análise das fracções aquosas recolhidas durante o processo de lavagem da dreche resultou num decréscimo no teor de sólidos solúveis (2,1; 0,67; 0,13; 0,1 e 0 °Brix, para as cinco lavagens, respectivamente), relevando assim que, nas condições de trabalho, à quinta lavagem não existem açúcares livres na amostra.

1.4. Determinação da distribuição granulométrica

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada com o auxílio de um conjunto de crivos, que permitiu a obtenção de 5 fracções distintas, de acordo com o tamanho das partículas. Os resultados obtidos foram compilados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados obtidos na determinação da distribuição granulométrica da dreche.

Fracção	Tamanho das partículas (mm)	Percentagem (%)
A	> 1	3,83 ± 0,37
B	1 - 0,5	36,00 ± 1,48
C	0,5 - 0,250	41,06 ± 2,44
D	0,250 - 0,125	12,57 ± 2,65
E	≤ 0,125	6,76 ± 1,12

Os resultados obtidos, compilados na tabela acima, indicam que a dreche é constituída por aproximadamente 77% de partículas com diâmetro compreendido entre 1 e 0,250 mm (fracções B e C), sendo estas as fracções maioritárias.



Figura 20 - Distribuição granulométrica da dreche.

A Figura 20, relativa às fracções obtidas na determinação da granulometria da dreche, mostra a sua homogeneidade.

1.5. Determinação do teor de extractáveis

As amostras para o estudo do teor de extractáveis foram obtidas por extracção sólido-líquido da dreche previamente lavada e liofilizada, em banho de ultrassons, com acetona (60%), durante uma hora. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada. A dreche extraída (resíduo sólido) foi recolhida e submetida a uma lavagem com água destilada, sendo posteriormente liofilizada e armazenada a -20 °C para posterior estudo em hidrólise alcalina. O sobrenadante foi evaporado em evaporador rotativo, com vista a remover a acetona. A fase aquosa foi depois liofilizada, processo a partir do qual se determinou um rendimento de extracção de 29,16%. Uma vez que a dreche submetida a extracção com acetona (60%) foi previamente lavada com água destilada e seca, o extracto obtido deve conter essencialmente compostos fenólicos.

Este resultado é pouco fiável, diferindo significativamente daqueles reportados na literatura e compilados na Tabela 1 (página 8), que variam entre 6 e 11%, sensivelmente. Uma razão que pode ter conduzido a este resultado é uma secagem incompleta do extracto.

1.5.1. Conteúdo de fenólicos totais (*Total Phenolic Content, TPC*)

Para aplicação do método de Folin-Ciocalteu uma amostra do liofilizado obtido na extracção sólido-líquido com acetona (60%) foi dissolvido no solvente de extracção, para uma concentração final de 5 mg/L. Após homogeneizada em *vortex*, a solução foi filtrada com filtro de membrana 0,45 µm. A mistura reagente para o ensaio de determinação do conteúdo de fenólicos totais foi obtida por adição de 50 µL de amostra a 1,25 mL de solução de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10), e 1 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). A mistura foi agitada e colocada no escuro durante 30 minutos, tempo após o qual se determinou a absorvância a 765 nm. Como branco, substituiu-se os 50 µL de amostra pelo mesmo volume de acetona (60%). A recta de calibração, com equação $y = 0,0019x - 0,0276$ e com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9989 foi obtida pela reacção com soluções padrão de ácido gálico, com concentrações entre 50 e 600 mg/L. Para o extracto em acetona, obteve-se um conteúdo de fenólicos totais de 201,84 mg (eq. ácido gálico)/100 g (dreche).

1.5.2. Análise do extracto resultante da extracção com acetona por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ

O perfil do extracto acetónico foi determinado por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ, numa corrida de 40 minutos, obtendo-se um total de 5 compostos, de acordo com a Figura 21.

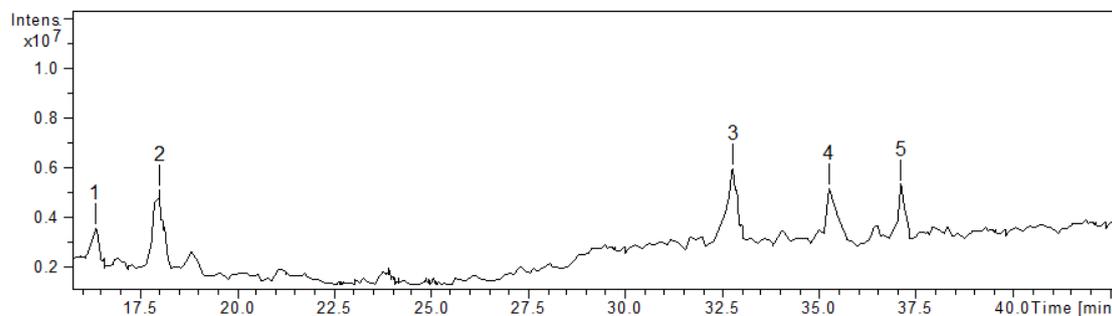


Figura 21 - Análise por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ do extracto resultante da extracção da dreche com acetona (60%).

O composto **1** eluiu num tempo de retenção de 16,8 minutos, exibindo um ião $[M-H]^-$ a m/z 163. Por comparação com um padrão, este composto foi identificado como sendo o ácido *p*-cumárico. Aos 18,7 minutos aconteceu a eluição do composto **2**, com um ião $[M-H]^-$ a m/z 193. A fragmentação MS² revelou iões a m/z 178 e 149. Novamente, através da comparação com um padrão, identificou-se este composto como sendo o ácido ferúlico.

O composto **3** é reportado na literatura como sendo o de desidro dímero do ácido ferúlico [92], surgindo aos 32,8 minutos, com um pico base a m/z 385. A fragmentação MS² dá origem a um fragmento com m/z 341 (descarboxilação), sendo que a sua fragmentação MS³ resultou num pico com m/z 326.

O composto **4** ($t_R = 35,5$ min) mostrou um ião $[M-H]^-$ com m/z igual a 313, cuja fragmentação MS² revelou um fragmento m/z 298. A fragmentação deste pico originou um fragmento MS³ com m/z 283, cuja fragmentação MS⁴ mostrou um fragmento 239, tratando-se provavelmente de uma dimetoxiluteolina [93].

Finalmente, o composto **5**, eluiu aos 37 minutos originando um ião $[M-H]^-$ com m/z 577. A fragmentação MS² originou um fragmento m/z 533. Um fragmento com m/z 489 foi originado com a fragmentação MS³. Na literatura [94] este composto aparece descrito como ácido triferúlico.

Tabela 7 - Caracterização dos compostos fenólicos extractáveis com acetona (60%), a partir da dreche.

N.º	t _r (min)	[M-H]- m/z	LC-ESI-MS m/z (% <i>base peak</i>)	Identidade
1	16,8	163	MS ² [163]: 119 (100)	Ácido <i>p</i> -cumárico
			MS ² [193]: 178 (93,3); 149 (100); 134 (34,5)	
2	18,7	193	MS ³ [193→149]: 134 (100)	Ácido ferúlico
			MS ³ [193→178]: 135 (36,9); 134 (100)	
			MS ² [385]: 342 (15,7); 341 (100); 297 (15,9)	
3	32,8	385	MS ³ [385→341]: 327 (29,6); 326 (100); 298 (10,5); 297 (47,8); 283 (18,8); 282 (39,5)	Um diferúlico
			MS ⁴ [385→341→326]: 311 (38,3); 283 (14,0); 282 (100); 268 (13,5); 267 (54,1); 249(16,6)	
			MS ² [313]: 299 (13,9); 298 (100)	
4	35,2	313	MS ³ [313→298]: 284 (19,4); 283 (100); 254 (21,7); 239 (61,4)	Uma dimetoxiluteolina
			MS ⁴ [313→298→283]: 240 (13,7); 239 (100); 238 (13,8); 227 (15,1); 211 (10,2); 195 (18,5); 194 (13,7); 193 (24,6)	
			MS ² [577]: 534 (24,5); 533 (100); 489 (16,9); 385 (13,6); 355 (16,9); 311 (30,4)	
5	37,0	577	MS ³ [577→533]: 490 (48,3); 489 (100); 445 (14,0); 415 (11,6); 312 (28,2); 311 (99,3); 296 (11,3); 296 (10,9); 193 (10,3)	Um ácido triferúlico
			MS ⁴ [577→533→311]: 296 (100)	
			MS ⁴ [577→533→489]: 474 (72,7); 474 (67,3); 471 (32,0); 445 (52,7); 431 (12,0); 430 (58,7); 429 (54,7); 415 (100); 401 (33,3); 384 (73,3); 269 (29,36); 254 (55,3); 202 (68,7)	

2. Hidrólise alcalina

Os resultados obtidos por HPLC-DAD para os ensaios de optimização de hidrólise foram tratados através da equação da recta de calibração (5 – 200 g/L) do padrão de ácido ferúlico.

2.1. Efeito do tratamento prévio das amostras de dreche

O principal efeito causado pelo tratamento prévio da dreche nos extractos obtidos por hidrólise alcalina é a alteração da sua composição, nomeadamente no que respeita ao conteúdo em lenhina, hemicelulose e compostos extractáveis. Assim, os resultados obtidos vêm expressos em função da massa de dreche inicial (dreche não submetida a tratamento prévio).

2.1.1. Extração prévia com acetona

O resíduo de dreche obtido após a extração com acetona (60%) durante 1 hora em banho de ultrassons foi lavado com água destilada e liofilizado. O resíduo seco foi depois submetido a um ensaio de hidrólise alcalina a 120 °C, por 2,5 horas, com NaOH (2%), num rácio de 20 mL de solução alcalina por grama de material sólido. Para comparação, foi desenvolvida uma reacção nas mesmas condições, com dreche não submetida à extração prévia com acetona. Todos os ensaios foram realizados em duplicado e os resultados obtidos foram compilados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados médios globais obtidos para os extractos obtidos aquando dos ensaios de hidrólise alcalina da dreche pré- e pós-extração com acetona (60%).

	Dreche (controlo)	Residuo da extração com acetona
Rendimento % (m/m)	56,11 ± 0,99	41,64 ± 4,10
TSS mg (eq.Sacarose)/100 g	94,50 ± 8,39	69,39 ± 3,28
TPC g (eq.GA)/100 g	1,01 ± 0,00	1,32 ± 0,14
DPPH mM (eq.Trolox)/100 g	4,45 ± 0,08	3,57 ± 0,48
CC(FA) mg (FA)/100 g	259,21 ± 35,95	270,32 ± 65,86

Em termos do rendimento de extração, conclui-se que a hidrólise aplicada à dreche não submetida à extração com acetona (pré-extração) deu origem a um rendimento de 56,11 ± 0,99%, significativamente maior àquele obtido para a dreche

previamente extraída ($41,64 \pm 4,10\%$). Este resultado indica que a extracção com acetona é um processo eficiente na remoção de compostos na sua forma livre. Verificou-se também uma diminuição no TSS em cerca de 27% para a dreche previamente extraída.

Meneses *et al.* (2013) também verificaram que a acetona (60%) é eficiente na extracção de compostos fenólicos, de flavonóides na sua forma livre e também de proteína e açúcares. Assim, o liofilizado obtido por hidrólise alcalina da dreche pós-extracção será um liofilizado mais *limpo*.

Os estudos da determinação do conteúdo total de fenólicos, por outro lado, mostram que a extracção prévia, seguida de hidrólise alcalina da dreche extraída, não parece resultar numa variação apreciável do TPC.

Estes resultados podem ser explicados pelo facto de que, aquando da aplicação da hidrólise alcalina às amostras de dreche previamente submetidas a extracção sólido-líquido com acetona, as fracções de dreche utilizadas contêm uma maior fracção de lenhina, relativamente à dreche não sujeita a tratamento prévio. Assim, os extractos obtidos serão necessariamente mais ricos em compostos fenólicos (nomeadamente ácidos ferúlico e *p*-cumárico).

Os resultados obtidos no ensaio do DPPH mostram que o liofilizado obtido por hidrólise alcalina da dreche extraída com acetona possui menor capacidade antioxidante, comparativamente àquele obtido através da dreche não sujeita a extracção prévia, ao contrário do que se verificou no TPC. Este resultado deve-se provavelmente ao facto dos compostos fenólicos de acção antioxidante mais eficiente (aqueles na sua forma livre) serem extraídos pela acetona.

Finalmente, os resultados relativos à quantificação do ácido ferúlico nos extractos resultantes da hidrólise alcalina das amostras de dreche pré- e pós-extracção não parecem indicar uma variação significativa na quantidade de ácido ferúlico extraída a partir da dreche previamente tratada com acetona, comparativamente àquela não submetida a tratamento prévio [$270,32 \pm 65,86$ e $259,21 \pm 35,95$ mg (FA)/100 g (dreche), respectivamente].

2.1.2. Pré-tratamento com ácido diluído

Uma amostra de dreche com cerca de 4 g foi submetida a uma hidrólise ácida com 32 mL de H₂SO₄ (3%), a 100 °C por 30 minutos, num procedimento adaptado daquele descrito por Mussatto e Roberto (2005) [29]. Após a hidrólise ácida, a mistura foi centrifugada, e o resíduo sólido foi lavado várias vezes com água destilada e liofilizada para posterior estudo por hidrólise alcalina. Obteve-se um teor de hidrolisados de 37,20%, obtido por aplicação directa da equação

$$X(\%) = \frac{m(\text{dreche}) - m(\text{dreche, pós hidrólise ácida})}{m(\text{dreche})} \times 100$$

A hidrólise alcalina para a dreche pré- e pós-tratamento prévio com ácido diluído foi estudada a 120 °C, por 2,5 horas com rácio 20 mL/g e NaOH (2%). Todos os ensaios foram realizados em duplicado, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 9 - Resultados médios globais obtidos para os extractos obtidos aquando dos ensaios de hidrólise alcalina da dreche com e sem pré-tratamento com ácido diluído.

	Sem pré-tratamento (controlo)	Com pré-tratamento
Rendimento % (m/m)	56,11 ± 0,99	66,16 ± 4,47
TSS mg (eq.Sacarose)/100 g	94,50 ± 8,39	60,55 ± 7,63
TPC g (eq.GA)/100 g	1,01 ± 0,002	1,09 ± 0,05
DPPH mM (eq.Trolox)/100 g	4,45 ± 0,08	3,27 ± 0,17
CC(FA) mg (FA)/100 g	259,21 ± 35,95	82,87 ± 28,95

De acordo com os resultados compilados na Tabela 9, verifica-se um ligeiro aumento no rendimento obtido no ensaio com a dreche submetida ao pré-tratamento com ácido, comparativamente àquela não tratada previamente (66,16 ± 4,47 e 56,11 ± 0,99%, respectivamente).

Verifica-se uma diminuição no conteúdo de sólidos solúveis (TSS) nas amostras de dreche previamente tratadas [60,55 ± 7,63 mg (eq. sacarose)/100 g (dreche)], comparativamente àquelas não submetidas a pré-tratamento com ácido diluído, em que se obteve 94,50 ± 8,39 mg (eq. sacarose)/100 g (dreche). Este resultado é expectável, uma vez que na literatura [75,81] se encontra reportado que a hidrólise ácida é eficiente

na remoção da fracção de hemicelulose que, possivelmente, tem influência aquando da análise do conteúdo total de sólidos solúveis.

No que diz respeito ao TPC, aquando do pré-tratamento com ácido diluído, verificou-se um ligeiro aumento de $1,01 \pm 0,00$ para $1,09 \pm 0,05$ g (eq. ácido gálico)/100 g (dreche). Por outro lado, a capacidade antioxidante parece fortemente influenciada pelo pré-tratamento, verificando-se uma diminuição deste parâmetro.

No que toca à concentração de ácido ferúlico nos extractos, é possível verificar uma diminuição de $259,21 \pm 35,95$ mg (ácido ferúlico)/100 g (dreche) para $82,87 \pm 28,95$ mg (ácido ferúlico)/100 g (dreche). Este resultado aparece provavelmente associado ao facto do tratamento ácido separar os ferulatos das lenhinas, mantendo o ácido ferúlico ligado aos polissacarídeos, sendo solubilizados em conjunto. A diminuição na extracção do ácido ferúlico pode explicar a diminuição da capacidade antioxidante.

De acordo com McMillan (1994) [83], o pré-tratamento com ácido diluído é um dos processos mais eficientes na libertação de açúcares hemicelulósicos (nomeadamente, xilose e arabinose) a partir de materiais ricos em hemicelulose. No entanto, no trabalho publicado por Mussatto *et al.* (2007) [75], verificou-se que uma porção de lenhina foi solubilizada durante o pré-tratamento com ácido diluído, constituindo assim uma diminuição na extracção do ácido ferúlico através da hidrólise alcalina posterior a esse tratamento. Esse resultado vai ao encontro daquele obtido no presente trabalho, em que se verifica uma diminuição significativa da quantidade de ácido ferúlico extraído. Dependendo das condições em que a hidrólise ácida é realizada, esta fracção de lenhina solubilizada pode também variar.

2.2. Efeito da extracção por autoclave

Ao contrário do que acontece no subcapítulo anterior (do *Efeito do tratamento prévio das amostras de dreche*), aquando dos ensaios para estudo do efeito da extracção por autoclave, a dreche utilizada possui, à partida, a mesma composição.

A extracção em autoclave foi realizada em duplicado e consistiu na adição de 20 mL de uma solução de NaOH (2%) a cerca de 1 g de dreche em frascos de vidro com capacidade de 100 mL. A reacção de hidrólise alcalina teve lugar a 120°C , durante 1,5 horas. Os hidrolisados foram arrefecidos e sujeitos ao procedimento descrito anteriormente, passando pela separação da lenhina insolúvel, precipitação e separação da fracção de hemicelulose, neutralização, evaporação e liofilização. Para comparação, foi levado a cabo um ensaio nas mesmas condições em tubos autopressurizados em banho de óleo.

Tabela 10 - Resultados médios globais obtidos para os extractos obtidos aquando dos ensaios de hidrólise alcalina em tubos autopressurizados e em autoclave.

	Tubos autopressurizados	Autoclave
Rendimento % (m/m)	49,17 ± 0,07	49,70 ± 2,23
TSS mg (eq.Sacarose)/100 g	81,45 ± 2,59	82,44 ± 9,17
TPC g (eq.GA)/100 g	1,19 ± 0,02	1,44 ± 0,10
DPPH mM (eq.Trolox)/100 g	3,93 ± 0,02	4,67 ± 0,02
CC(FA) mg (FA)/100 g	203,41 ± 5,37	280,61 ± 5,77

Os resultados compilados na Tabela 10 mostram que, em termos do rendimento de extracção, por comparação a um ensaio levado a cabo nos tubos autopressurizados, não parece haver uma alteração significativa no ensaio de hidrólise alcalina levado a cabo em autoclave. O mesmo acontece para o TSS.

Já relativamente ao conteúdo total de fenólicos verificou-se um aumento de 1,19 ± 0,02 g (eq. ácido gálico)/100 g (dreche) – nos ensaios desenvolvidos em tubos autopressurizados – para 1,44 ± 0,10 g (eq. ácido gálico)/100 g (dreche) – nos ensaios em autoclave.

A determinação da capacidade antioxidante mostrou que o liofilizado obtido por autoclave é mais rico, apresentando 4,67 ± 0,02 mM (eq. Trolox)/100 g (dreche), que o obtido pelos tubos autopressurizados nas mesmas condições [3,93 ± 0,02 mM (eq. Trolox)/100 g (dreche)].

O estudo dos liofilizados por HPLC-DAD mostrou que a extracção por autoclave origina um liofilizado cuja concentração de ácido ferúlico é significativamente maior àquela obtida na extracção em tubos autopressurizados [280,61 ± 5,77 e 203,41 ± 5,37 mg (FA)/100 g (dreche), respectivamente].

Podemos ainda comparar a eficiência de extracção do ácido ferúlico por autoclave com o ensaio realizado em tubos autopressurizados por 2,5 horas (259,21 ± 35,95 mg/100 g), verificando-se que a extracção em autoclave por 1,5 horas continua a ser mais eficiente. Isto é, a extracção por autoclave permite não só uma extracção mais eficiente do ácido ferúlico, diminuindo também o tempo necessário para a reacção.

Os resultados apresentados e discutidos atrás mostram que o eventual *scale-up* em autoclave pode ser uma resposta para a extracção de ácido ferúlico a partir da dreche. Para além das vantagens associadas à eficiência de extracção dos compostos de interesse, mesmo num equipamento de laboratório é possível o processamento de grandes quantidades de material de partida.

Moreira (2013) [79] aplicou um procedimento de extracção de compostos fenólicos assistida por microondas a amostras de dreche. Os resultados mostraram que através desse processo foi possível a extracção de cerca de 150 mg (FA)/100 g (dreche) (Figura 12, página 33).

Assim, a extracção por autoclave parece ser capaz de rivalizar com o processo descrito pela autora. A sua optimização pode conduzir à criação de um processo viável para a extracção do ácido ferúlico, principalmente no que toca à quantidade de dreche que é possível processar num futuro aumento de escala. De facto, durante o processo de optimização, esta autora verificou que pequenas variações nas condições experimentais têm um enorme contributo na quantidade de ácido ferúlico extraído, podendo o mesmo ser possível para a extracção em autoclave.

2.3. Simplificação do procedimento subsequente à hidrólise alcalina

O procedimento a que os hidrolisados são habitualmente submetidos prevê a separação da fracção de lenhina insolúvel, precipitação e separação da hemicelulose por adição de etanol, neutralização, evaporação e liofilização. A simplificação deste processo propõe a precipitação da fracção de hemicelulose ainda na presença da lenhina insolúvel, com posterior separação das duas fracções em simultâneo (vide Figura 17, página 50). O sobrenadante daí resultante segue todo o procedimento de neutralização, evaporação do excesso de etanol e liofilização.

Tabela 11 – Resultados médios globais obtidos para os liofilizados obtidos aquando dos ensaios levados a cabo com o procedimento habitual e com o processo simplificado.

	Procedimento habitual	Procedimento simplificado
Rendimento % (m/m)	56,11 ± 0,99	86,25 ± 0,14
TSS mg (eq.Sacarose)/100 g	94,50 ± 8,39	123,70 ± 1,47
TPC g (eq.GA)/100 g	1,48 ± 0,09	3,30 ± 0,07
DPPH mM (eq.Trolox)/100 g	n.d.	n.d
CC(FA) mg (FA)/100 g	259,21 ± 35,95	476,99 ± 25,94

*n.d. indica *não determinado*.

Os resultados obtidos, compilados na Tabela 11, mostram que a simplificação do procedimento subsequente à hidrólise alcalina levou ao aumento do rendimento em cerca de 30%, o que também contribuiu para o aumento na eficiência na extracção do ácido ferúlico – 476,99 ± 25,94 mg (ácido ferúlico)/100 g (dreche) para o procedimento simplificado, contra os 259,21 ± 35,95 mg (ácido ferúlico)/100 g (dreche) obtidos através da aplicação do procedimento habitual. Este aumento estará não só associado à redução das perdas associadas às transferências dos hidrolisados durante o procedimento, mas também devido à recuperação do ácido ferúlico no sólido, durante a adição do etanol.

Consequentemente, em termos do conteúdo total de fenólicos também se verificou um aumento significativo [1,48 ± 0,09 e 3,30 ± 0,07 g (eq. ácido gálico)/100 g (dreche) para os liofilizados obtidos através dos procedimentos habitual e simplificado, respectivamente]. O mesmo se verificou no que toca ao conteúdo total de sólidos solúveis, com 123,70 ± 1,47 mg (eq. Sacarose)/100 g (dreche), para os ensaios levados

a cabo de acordo com o procedimento simplificado, comparativamente àqueles obtidos por aplicação do procedimento habitual [$94,50 \pm 8,39$ mg (eq. Sacarose)/100 g (dreche)].

A simplificação do processo de tratamento dos hidrolisados obtidos por hidrólise alcalina da dreche constitui uma mais-valia em termos da utilização de recursos físicos e energéticos. Não obstante, através dos resultados descritos anteriormente, é também possível verificar que esta simplificação permite um aumento nos parâmetros que definem a eficiência de extracção do ácido ferúlico, nomeadamente do rendimento de extracção. Consequentemente, assistimos a um incremento dos valores obtidos para o teor total de fenólicos e, assim, para a concentração de ácido ferúlico extraído. A desvantagem da aplicação do procedimento simplificado, dado o objectivo do presente trabalho, passará pelo aumento na quantidade de açúcares extraídos, marcado pelo aumento no teor total de sólidos solúveis.

2.4. Optimização das condições de hidrólise alcalina por variação individual

2.4.1. Temperatura reaccional

Os ensaios de optimização da temperatura de extracção da hidrólise alcalina foram desenvolvidos fazendo-se variar a temperatura (60, 80, 100 e 120 °C), mantendo fixos os restantes parâmetros (tempo de extracção de 1 hora, rácio entre a solução alcalina e a biomassa igual a 20 mL/g e concentração da solução alcalina igual a 2%).

A Figura 22 mostra que, ao longo dos ensaios de optimização da temperatura de reacção, em termos do rendimento de liofilizado obtido, não existem variações significativas.

Com a quantificação do ácido ferúlico nas amostras, por HPLC-DAD, os resultados evidenciam que, quando a hidrólise decorre à temperatura de 60 °C, apenas uma pequena porção da lenhina é solubilizada, obtendo-se um resultado final equivalente a $46,95 \pm 12,72$ mg (FA)/100 g (dreche, peso seco). Conforme se aumenta a temperatura do sistema, a extracção do ácido ferúlico torna-se mais eficiente, até os 120 °C, condições em que se obteve o liofilizado mais rico, cuja concentração em ácido ferúlico foi determinada para um valor de $234,98 \pm 8,03$ mg (FA)/100 g (dreche, peso seco).

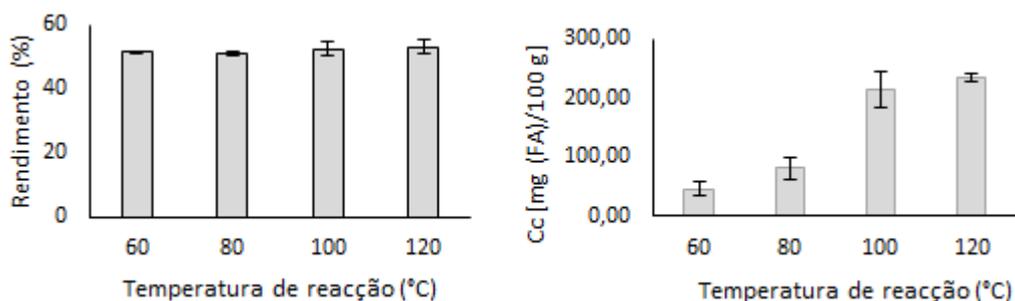


Figura 22 – Resultados obtidos para o rendimento e concentração de ácido ferúlico nos ensaios de optimização da temperatura de extracção.

2.4.2. Tempo reaccional

No que concerne à optimização do tempo reaccional, os ensaios foram realizados mantendo fixa a temperatura (80 °C), o rácio solução alcalina / biomassa (20 mL/g) e a concentração da solução alcalina (2%), fazendo-se variar o tempo de reacção (de 1 a 3 horas com intervalos de 30 minutos).

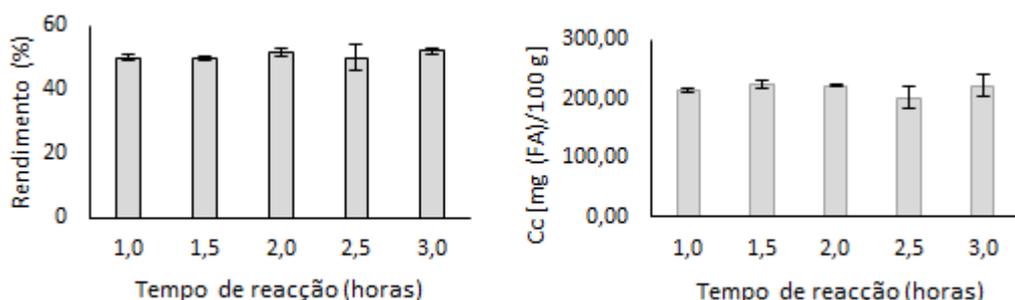


Figura 23 - Resultados obtidos para o rendimento e concentração de ácido ferúlico nos ensaios de optimização do tempo de reacção.

Os resultados compilados na Figura 23 mostram que o rendimento das reacções é muito pouco influenciado pelo aumento do tempo de reacção, não se verificando alterações significativas. De forma semelhante, também a quantificação do ácido ferúlico nos extracto obtidos, mostra que não existem variações significativas ao longo dos ensaios de optimização do tempo de reacção (entre 1 e 3 horas de reacção). De entre os ensaios realizados, aquele que mostra uma extracção mais eficiente para o ácido ferúlico acontece com 1,5 horas de extracção, onde se obteve $223,97 \pm 6,82$ mg (FA)/100 g (dreche, peso seco).

2.4.3. Concentração da solução alcalina

Finalmente, os ensaios de optimização da concentração da solução alcalina foram promovidos por variação deste parâmetro (0,5 a 2,5%, intervalado a 5%), mantendo fixos os restantes parâmetros (80 °C, por 1 horas com um rácio de 20 mL/g).

Em termos do rendimento de extracção, tendo em conta a massa de dreche utilizada em cada ensaio e a massa de liofilizado obtido, os resultados compilados na figura abaixo (Figura 24) mostram que o rendimento varia de forma praticamente linear com o aumento da concentração da solução alcalina, obtendo-se um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9803. Com a análise por HPLC-DAD, tendo em vista a quantificação de ácido ferúlico nos extractos, verifica-se que os ensaios de optimização em que se obtém uma maior quantidade de ácido ferúlico extraído, são aqueles levados a cabo utilizando uma concentração de solução alcalina igual a 1,5%, onde se obtém $214,53 \pm 23,26$ mg (ácido ferúlico)/100 g (dreche, peso seco).

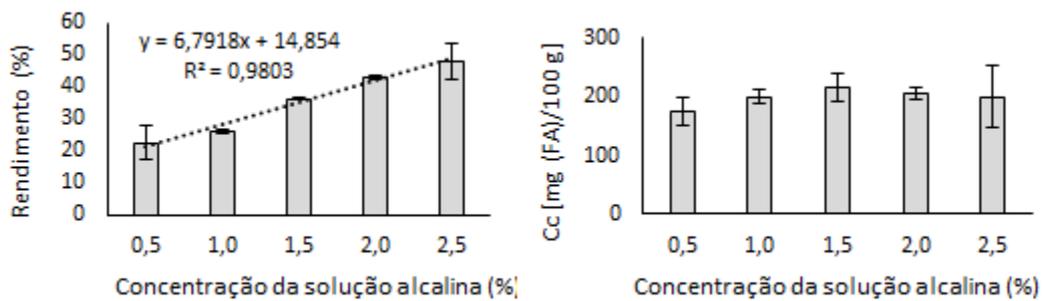


Figura 24 - Resultados obtidos para o rendimento e concentração de ácido ferúlico nos ensaios de optimização da concentração da solução alcalina

De acordo com o trabalho publicado por Mussatto, Dragone, e Roberto (2007) [75], em que se estudaram duas concentrações da solução alcalina (1,0 e 2,0% (m/v)), os resultados revelaram que, independentemente dos restantes parâmetros, a 2,0% a extracção é sempre mais eficiente. Esta conclusão acabou por ser confirmada no presente trabalho, verificando-se no entanto que a concentração de 1,5% será aquela em que a extracção é mais eficiente.

3. Estudo de adsorção em resina Lewatit VPOC1064 MD PH®

3.1. Estudos de equilíbrio e cinética de adsorção

O desenvolvimento dos estudos de equilíbrio e cinética de adsorção teve lugar através da adição da resina activada (vide secção *Activação da resina*) a soluções de um padrão de ácido ferúlico, nas condições descritas abaixo:

3.1.1. Efeito da dispersão do ácido ferúlico na mistura

O estudo da cinética de adsorção fazendo variar a dispersão do ácido ferúlico e da resina na mistura de adsorção, mantendo fixa a proporção entre si, foi levado a cabo através dos ensaios cujas condições experimentais se encontram descritos na tabela abaixo:

Tabela 12 - Condições experimentais para os ensaios de adsorção relativos ao estudo do efeito da dispersão do ácido ferúlico na mistura de adsorção.

Ensaio	[FA] (g/L)	V(sol.FA) (mL)	m(resina) (g)	Temperatura
AdsA	1		0,5	
AdsB	0,5	50	0,25	25 °C
AdsC	0,25		0,125	

As misturas foram colocadas em adsorção e várias alíquotas foram recolhidas de 2 em 2 minutos nos primeiros 10 minutos, de 10 em 10 minutos até os 100 minutos e com intervalos de 20 minutos nos 80 minutos seguintes. Os sobrenadantes foram imediatamente separados da resina através de filtração por filtros de membrana 0,45 µm. A absorvância de cada amostra foi medida a 373 nm e comparada com as soluções iniciais.

Os resultados podem ser expressos em termos da percentagem de adsorção, calculada para cada amostra através da equação

$$(\%)Adsorção = \frac{C_{c_{inicial}} - C_{c_{amostra}}}{C_{c_{inicial}}} \times 100$$

onde $C_{c_{inicial}}$ é a concentração da solução inicial de ácido ferúlico (em $t=0$) e $C_{c_{amostra}}$ a concentração do ácido ferúlico em cada amostra recolhida ao longo do tempo.

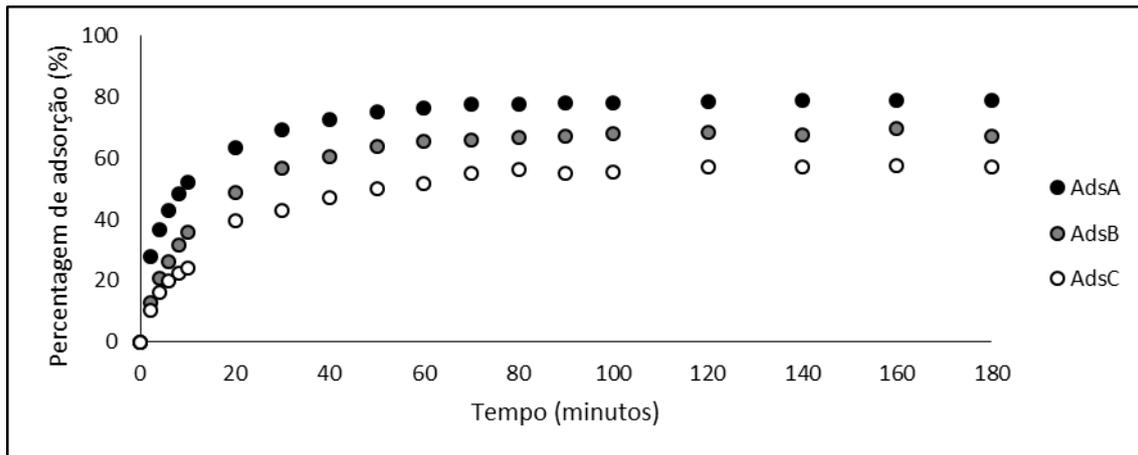


Figura 25 - Evolução da percentagem de adsorção obtida para os ensaios de adsorção com efeito da dispersão do ácido ferúlico na solução inicial.

Os resultados obtidos para a evolução da percentagem de adsorção do ácido ferúlico (Figura 25) mostram que o ensaio *AdsA* é aquele em que se obtém uma maior percentagem de adsorção quando o sistema atinge o equilíbrio, seguido dos ensaios *AdsB* e *AdsC*. Isto é, apesar de se manter a proporção entre a quantidade de ácido ferúlico em solução e a quantidade de resina utilizada, quando maior for a dispersão das partículas em solução (*AdsC*), menor será a capacidade de adsorção do ácido ferúlico.

Os resultados podem ainda ser expressos em termos do rácio (C/C_0), permitindo uma análise mais cuidada da cinética de adsorção. Estes resultados foram compilados na Figura 26. Verificou-se que a equação que melhor se adapta às curvas de cinética obtidas foi uma equação do tipo

$$\frac{C}{C_0} = A + B \cdot e^{-t/C} + D \cdot e^{-t/E}$$

Com o auxílio da ferramenta *Solver* do MS Excel, foi possível determinar um valor para cada uma das variáveis (A a E), a partir das quais a equação (linha a tracejado) se adaptou aos resultados obtidos.

Antes da análise e discussão dos resultados propriamente ditos, é importante perceber o tipo de informação que deles se pode tirar. Sendo expressos na razão entre a concentração das amostras recolhidas ao longo do tempo de adsorção e a concentração da solução inicial para cada ensaio, é necessário ter em conta os seguintes aspectos:

- A concentração inicial (C_0) é fixa para cada um dos ensaios de adsorção;
- Quando $t=0$ (início do ensaio) o rácio (C/C_0) é igual a 1, uma vez que ainda não se verificou adsorção do ácido ferúlico na resina;

- A concentração de FA nas amostras recolhidas (C) diminui ao longo do tempo, fazendo diminuir o rácio (C/C_0) até atingir o equilíbrio, a partir do qual se mantém constante, resultando num declive nulo para a recta tangente à curva de cinética;

- Um menor valor do rácio (C/C_0) durante o estado de equilíbrio, revela uma maior eficiência de adsorção, nos diferentes ensaios, uma vez que é resultado de valores menor para a variável C ;

- Para um dado tempo t , um menor rácio (C/C_0) antes do ponto a partir do qual se obtém o equilíbrio, indica que a mistura atingiu o equilíbrio mais rapidamente.

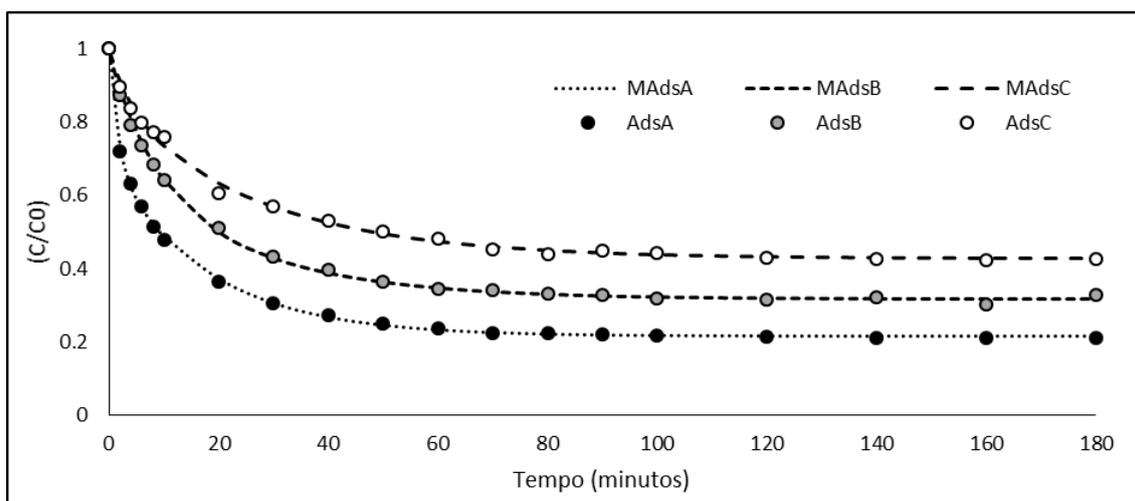


Figura 26 - Resultados obtidos para os ensaios de cinética de adsorção, com estudo do efeito da dispersão do ácido ferúlico na solução inicial.

Assim, através do estudo dos resultados compilados na Figura 26, é possível verificar que, após o equilíbrio, o melhor resultado obtido foi para o ensaio *AdsA*, seguido dos ensaios *AdsB* e *AdsC*. Como discutido anteriormente, a partir deste resultado conclui-se que, mesmo mantendo fixa a proporção entre a quantidade de ácido ferúlico em solução e a quantidade de resina utilizada, quanto menor for a dispersão do composto na mistura, mais eficiente será a adsorção. Verificou-se ainda que, relativamente ao ensaio *AdsA*, o rácio (C/C_0) atingiu valores próximos de 0,2. Isto é, restou em solução cerca de 20% do ácido ferúlico presente inicialmente, o que perfaz uma percentagem de adsorção de cerca de 80%, como aliás já havia sido discutido anteriormente, aquando da análise dos resultados expressos em percentagem de adsorção (Figura 25).

O cálculo da quantidade de ácido ferúlico adsorvido é possível através da equação proposta por Dávila-Guzman (2012) [87]:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m}$$

onde C_0 é a concentração inicial (em mg/L), C_e a concentração no equilíbrio (em mg/L), V o volume de solução (em litros) e m a massa de resina utilizada (peso seco, em gramas).

Obteve-se 121,33; 106,41 e 91,85 mg (FA)/g (resina, peso seco) para os ensaios *AdsA*, *AdsB* e *AdsC*, respectivamente.

A tabela abaixo mostra os valores tomados por cada uma das variáveis através das quais a equação descrita anteriormente (para as curvas de cinética, Figura 26) se adequou aos resultados obtidos.

Tabela 13 - Valores tomados pelas variáveis (A a E) para adaptação da equação aos resultados obtidos nos ensaios cinética de adsorção, com estudo do efeito da dispersão do ácido ferúlico na mistura de adsorção.

Variável	AdsA	AdsB	AdsC
A	0,2144	0,3169	0,4262
B	0,4721	0,3620	0,4271
C	18,1123	24,1647	27,1620
D	0,3122	0,3031	0,1391
E	1,6490	7,9226	4,1121

3.1.2. Efeito da variação da concentração da solução inicial

Através dos ensaios cujas condições se encontram descritas na Tabela 14 foi possível estudar o efeito da concentração inicial da solução de ácido ferúlico na cinética de adsorção. Os resultados obtidos aparecem compilados na Figura 27.

Tabela 14 - Condições experimentais para os ensaios de adsorção relativos ao estudo do efeito da variação da concentração do ácido ferúlico na solução inicial.

Ensaio	[FA] (g/L)	V(sol.FA) (mL)	m(resina) (g)	Temperatura
AdsA	1,0	50	0,5	25 °C
AdsD	0,25			

Os ensaios realizados, tendo em vista o estudo do efeito da concentração da solução inicial na cinética de adsorção, permitem verificar uma maior adsorção no ensaio *AdsD*, onde se utilizou uma menor concentração inicial de ácido ferúlico (0,25

g/L), comparativamente ao ensaio realizado nas mesmas condições, todavia com uma solução de maior concentração (1 g/L). Esta observação pode dever-se, possivelmente ao facto de estarmos a saturar a resina no ensaio *AdsA*, devido à grande quantidade de ácido ferúlico em solução.

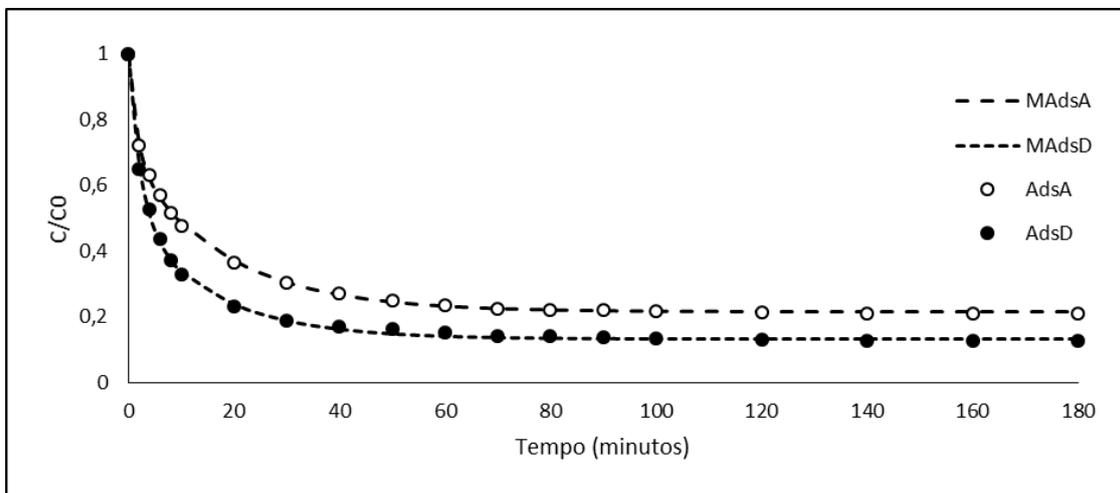


Figura 27 - Resultados obtidos para os ensaios de cinética de adsorção, com estudo do efeito da concentração da solução inicial de ácido ferúlico.

A Tabela 15 compila os valores tomados por cada uma das variáveis através das quais a equação para a curva de cinética se adequou aos resultados obtidos.

Tabela 15 - Valores tomados pelas variáveis (A a E) para adaptação da equação aos resultados obtidos nos ensaios cinética de adsorção, com estudo do efeito da concentração da solução inicial de ácido ferúlico na mistura de adsorção.

Variável	AdsA	AdsB
A	0,2144	0,1343
B	0,4721	0,3759
C	18,1123	15,7397
D	0,3122	0,4861
E	1,6490	2,2909

3.1.3. Efeito da temperatura na mistura de adsorção

As condições descritas na Tabela 16 dizem respeito aos ensaios de adsorção levados a cabo tendo em conta o estudo da temperatura na mistura de adsorção.

Tabela 16 - Condições experimentais para os ensaios de adsorção relativos ao estudo do efeito da temperatura na mistura de adsorção.

Ensaio	[FA] (g/L)	V(sol.FA) (mL)	m(resina) (g)	Temperatura
AdsD				25 °C
	0,25	50	0,5	
AdsE				Banho de gelo

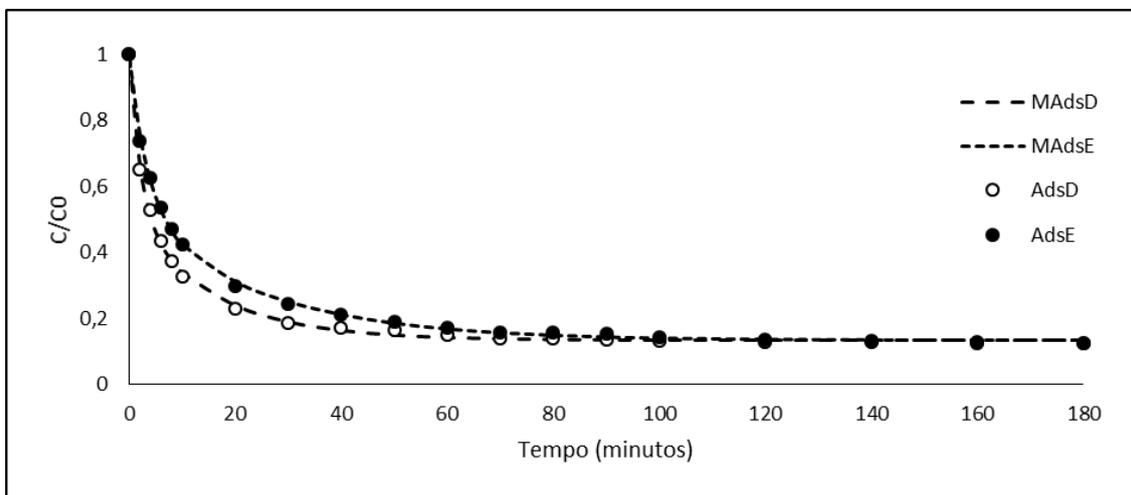


Figura 28 - Resultados obtidos para os ensaios de cinética de adsorção, com estudo do efeito da temperatura da mistura de adsorção.

Os resultados obtidos (Figura 28) mostram que, em termos do estado de equilíbrio, ambos os ensaios atingiram o mesmo valor para o rácio (C/C_0). Isto é, em termos da capacidade de adsorção, em ambos os ensaios obteve-se cerca de 35 mg (FA)/g (resina, peso seco). Este é um resultado expectável, uma vez que ambos os ensaios decorreram nas mesmas condições, nomeadamente no que toca à concentração inicial de ácido ferúlico, ao volume de solução utilizado e à massa de resina.

No entanto, a temperatura a que os ensaios são realizados parece ter influência no tempo que o sistema demora a atingir o equilíbrio. É importante notar que, apesar de termos um (C/C_0) semelhante nos dois ensaios durante o equilíbrio, é possível verificar que, por exemplo, quando $t=10$ o ensaio *AdsD* (desenvolvido à temperatura ambiente) apresenta um rácio (C/C_0) menor do que o ensaio *AdsE* (levado a cabo no frio), ou seja,

atinge-se mais rapidamente o equilíbrio à temperatura ambiente do que a baixas temperaturas.

Este resultado pode estar associado ao aumento da energia cinética das partículas, pela temperatura mais elevada, facilitando a interacção entre a resina e o ácido ferúlico.

A tabela abaixo mostra os valores tomados por cada uma das variáveis através das quais a equação descrita anteriormente se adequou aos resultados obtidos.

Tabela 17 - Valores tomados pelas variáveis (A a E) para adaptação da equação aos resultados obtidos nos ensaios cinética de adsorção, com estudo do efeito da temperatura da mistura de adsorção.

Variável	AdsA	AdsB
A	0,1343	0,1335
B	0,3759	0,3992
C	15,7401	24,5310
D	0,4861	0,4604
E	2,2910	3,4751

3.2. Reciclagem da resina

Um dos aspectos importantes aquando da utilização de materiais adsorventes é a possibilidade de reciclagem e reutilização dos mesmos, o que constitui uma mais-valia em termos económicos. Nos ensaios que se seguem esta hipótese foi testada, tendo a mesma porção de resina sido submetida a três ciclos completos de activação, adsorção e recuperação do material adsorvido.

Tabela 18 - Resultados obtidos para os ensaios sobre a reciclagem da resina, expressos em percentagem de adsorção.

Adsorção	Adsorção (%) (média ± desvio padrão)
1	75,10 ± 0,04
2	77,43 ± 0,04
3	77,01 ± 0,02

Os resultados compilados acima (Tabela 18) mostram que ao fim do terceiro ciclo de adsorção parece não haver perda de capacidade da mesma. As variações nos na percentagem de adsorção podem dever-se ao facto de, para cada uma das adsorções levadas a cabo, ter sido preparada uma nova solução de ácido ferúlico. Esta medida foi necessária porque, dada a fraca solubilidade do ácido ferúlico em água, ao fim de algum

tempo verificou-se a sua recristalização nas soluções utilizadas. Assim, para evitar erros associados à precipitação do composto, aquando de cada uma das adsorções, uma solução de ácido ferúlico foi preparada de fresco.

3.3. Estudo sobre a adsorção de açúcares

Os ensaios de adsorção com 3 mL de soluções de sacarose, glucose e arabinose (10 g/L) e 0,15 g de resina activada permitiram o estudo da adsorção de açúcares. A determinação do conteúdo total de sólidos solúveis por refractometria, permitiu o cálculo do material adsorvido.

Com base nos resultados dispostos na Figura 29, podemos verificar que, não havendo uma alteração significativa no TSS para as amostras pré- e pós-adsorção, podemos considerar que não existe adsorção de açúcares na resina Lewatit VPOC1064 MD PH®. Este resultado vai ao encontro daquele descrito por Conidi *et al.* (2015) [86], que utilizou uma resina semelhante e verificou um resultado idêntico, em termos da adsorção dos açúcares.

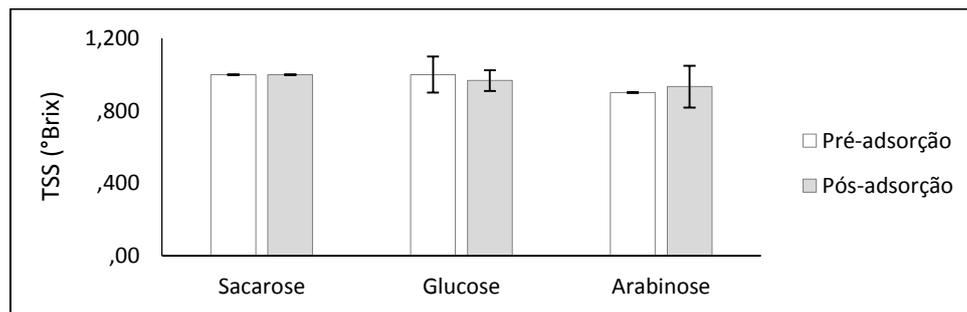


Figura 29 - Resultados obtidos para os ensaios de adsorção de açúcares, por adição de 3 mL de solução de sacarose, glucose e arabinose (10 g/L) a 0,15 g de resina, com agitação por 1 hora.

3.4. Purificação do extracto resultante da hidrólise alcalina

A purificação do extracto resultante da hidrólise alcalina, através de adsorção na resina sintética previamente estudada, foi realizada em diferentes etapas, de acordo com o descrito na Figura 19 (página 56). Os resultados obtidos foram compilados na Tabela 19.

A segunda coluna da tabela abaixo diz respeito à massa de extracto (em gramas) interveniente em cada uma das etapas do processo de purificação. Através da concentração do ácido ferúlico em cada um dos extractos (determinado via HPLC-DAD) foi possível calcular a massa de ácido ferúlico (em miligramas) em cada uma das fases da purificação do extracto inicial e, posteriormente, a sua quantidade em *moles*.

Tabela 19 - Resultados obtidos para os extractos intervenientes no processo de purificação do extracto inicial por adsorção em resina.

Extracto	m(extracto) (g)	Cc (FA)	m(FA) (mg)	n(FA)
		mg/g(extracto)		(mol)
Inicial	2,0633	2,46 ± 0,11	5,08	2,61x10 ⁻⁵
Liofilizado A	1,7227	9,30 ± 0,60	0,47	2,40x10 ⁻⁶
Liofilizado B	0,3406	0,27 ± 0,01	3,17	1,63x10 ⁻⁵

A análise do extracto obtido por hidrólise alcalina (extracto inicial), tratado de acordo com o estabelecido na Figura 17 (parte B), resultou num valor de 2,46 ± 0,11 mg (FA)/g (extracto), correspondendo a uma quantidade de composto igual a 2,61x10⁻⁵ moles.

Seguiu-se a ressuspensão de parte desse liofilizado em água destilada (cerca de 2 g de extracto para 40 mL de água), com agitação constante e a 50 °C. Após 30 minutos em agitação a mistura foi arrefecida a uma temperatura próxima da temperatura ambiente e uma porção de resina activada foi adicionada à mistura. Após 2 horas em adsorção, a mistura foi filtrada. O filtrado foi liofilizado (*liofilizado A*) e analisado em HPLC-DAD, tendo-se obtido o resultado de 9,30 ± 0,60 mg (FA)/g (extracto), o correspondente a 2,40x10⁻⁶ moles de ácido ferúlico. A diferença na quantidade de ácido ferúlico entre *liofilizado A* e o extracto inicial, indica a quantidade de composto adsorvido na resina (2,37x10⁻⁵ moles).

A resina carregada foi depois ressuspensa duas vezes em 25 mL de etanol (70%) e agitada durante 30 minutos, seguida de filtração a pressão reduzida. Os filtrados foram combinados e o excesso de etanol foi evaporado em evaporador rotativo. A fase aquosa resultante foi liofilizada (*liofilizado B*) e o ácido ferúlico quantificado. Obteve-se o resultado de 0,27 ± 0,01 mg (FA)/g (extracto). Em termos da quantidade de ácido ferúlico obtido no final da purificação, determinou-se 1,63x10⁻⁵ moles.

Através das equações abaixo, foi possível determinar as percentagens de adsorção e dessorção para o ácido ferúlico, durante o processo de purificação do extracto obtido por hidrólise alcalina da dreche.

$$(\%) \text{ Adsorção} = \frac{m_{(FA,adsovido)}}{m_{(FA,inicial)}} \times 100$$

, onde $m_{(FA,adsorvido)}$ é a massa de ácido ferúlico adsorvido e $m_{(FA,inicial)}$ é a massa de ácido ferúlico no extracto inicial (resultante da hidrólise alcalina);

e

$$(\%)Dessorção = \frac{m_{(FA,liofilizado\ B)}}{m_{(FA,adsorvido)}} \times 100$$

, onde $m_{(FA,liofilizado\ B)}$ é a massa de ácido ferúlico no extracto liofilizado B e $m_{(FA,adsorvido)}$ é a massa de ácido ferúlico adsorvido.

Determinou-se assim uma percentagem de adsorção de 90,83%, indicando uma boa eficiência no processo, a partir do qual foram adsorvidos cerca de 4,6 miligramas de ácido ferúlico. No entanto, observou-se que no final da etapa de adsorção a resina adquiriu uma coloração castanha, o que indica que outros compostos, para além do ácido ferúlico, deverão ter sido co-adsorvidos.

A percentagem de dessorção, por outro lado, que tem em conta a massa de ácido ferúlico adsorvido na resina e a massa de ácido ferúlico obtida no extracto final (*liofilizado B*) tomou o valor de 68,70%. Esta etapa ficou aquém do esperado, uma vez que se supõe que, da massa de ácido ferúlico adsorvido (~4,6 mg), cerca de 1,4 mg tenham ficado retidos na resina. Este dado vai ao encontro do observado durante o processo de dessorção: no final do processo, a resina continuou corada de castanho, indicando que alguns dos compostos co-adsorvidos terão ficado retidos. Como esses, também o ácido ferúlico parece persistir na superfície e/ou nos poros da resina.

Este constitui então um processo promissor (dada a sua simplicidade e baixo custo) mas que carece de optimização, nomeadamente no que toca à etapa de dessorção. Tendo em conta os resultados acima discutidos, parece haver uma fraca selectividade por parte da resina em estudo, ocorrendo a adsorção de outros compostos que não o composto de interesse e, possivelmente, de natureza fenólica.

IV. Conclusões e Perspectivas Futuras

A indústria agro-alimentar produz, todos os anos, uma grande quantidade de resíduos. A dreche, o principal sub-produto sólido da indústria cervejeira, é produzida num rácio de 20 kg/100 L de cerveja, sem grandes variações sazonais. Existe por isso um crescente interesse na sua utilização como material de partida para outros processos.

O trabalho laboratorial realizado no âmbito da presente dissertação teve como matéria-prima a dreche, com o objectivo da sua valorização através da extracção de ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente de ácido ferúlico.

A caracterização da dreche permitiu determinar um teor de humidade de cerca de 70% e um teor de cinzas próximo de 4%. O estudo do teor de sólidos solúveis na água de prensagem da dreche fresca resultou num valor de 59,19 miligramas de equivalente de sacarose por litro de solução.

A extracção da dreche com acetona (60%) deu origem a um extracto para o qual se determinou um teor total de fenólicos de 201,84 miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de dreche, e cuja análise por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ revelou a presença de cinco compostos, entre os quais os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, que surgem no extracto na sua forma livre e, portanto, extractáveis pelas técnicas convencionais.

O estudo do efeito do tratamento prévio da dreche foi desenvolvido por aplicação de (1) extracção com acetona (60%) em banho de ultrassons e (2) pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Os resultados mostraram que a hidrólise alcalina precedida de extracção com acetona (60%) origina um liofilizado com menor quantidade de sólidos solúveis mas mais rico em termos do seu conteúdo total de fenólicos. A quantificação do ácido ferúlico mostrou também um aumento, ainda que pouco significativo, para a dreche pré-extraída. O pré-tratamento da dreche com ácido sulfúrico diluído parece levar a uma diminuição do teor total de sólidos solúveis, com aumento do conteúdo total de fenólicos. A capacidade antioxidante, assim como a quantidade de ácido ferúlico extraído diminuíram, provavelmente devido à solubilização de uma parte da fracção de lenhina aquando da hidrólise ácida, de acordo com o reportado na literatura.

A extracção por autoclave não influenciou significativamente o rendimento de extracção nem o TSS. No entanto, foi possível verificar um ligeiro aumento no TPC, na capacidade antioxidante, assim como na eficiência de extracção do ácido ferúlico, com rendimentos de extracção na ordem dos 0,28% (m/m). O presente método de extracção surge então como mais eficiente, comparativamente a outros reportados na literatura, nomeadamente a extracção assistida por micro-ondas, em que se obtiveram

rendimentos de extracção em torno dos 0,15% (m/m) [77–79]. Uma vantagem da extracção em autoclave, para além do rendimento de ácido ferúlico obtido, é a possibilidade de processar grandes quantidades de dreche em cada ensaio. A optimização das condições de extracção providenciará informação que permitirá um maior aproveitamento da dreche enquanto material de partida para extracção de ácidos hidroxicinâmicos.

A simplificação do procedimento posterior à reacção por hidrólise alcalina (esquemática na página 52) teve como objectivo a redução dos recursos físicos e energéticos, assim como o tempo e perdas associadas à manipulação dos hidrolisados. De entre os resultados obtidos, verificou-se um aumento do rendimento em cerca de 30%, a partir do qual adveio um incremento do TPC, do TSS e da capacidade antioxidante. Também a quantidade de ácido ferúlico extraído se mostrou aumentada durante este estudo, onde se obteve o valor de $476,99 \pm 25,94$ miligramas por 100 g de dreche (peso seco), constituindo um rendimento de extracção próximo de 0,5%. É possível concluir então que a simplificação do processo constitui uma mais-valia no mesmo, não só do ponto de vista económico, mas também em termos a extracção propriamente dita.

Com os ensaios de optimização das condições de hidrólise alcalina em tubos autopressurizados mergulhados em banho de óleo, foi possível determinar que as condições óptimas para extracção do ácido ferúlico aconteceram a 120 °C, por 1,5 horas, utilizando NaOH (1,5%) num rácio de 20 mL de solução alcalina por grama de dreche.

Os ensaios de cinética de adsorção do ácido ferúlico na resina sintética Lewatit VPOC1064 MD PH® em diferentes condições, mostraram que quanto menor for a dispersão do ácido ferúlico no meio, maior será a capacidade de adsorção. Estes ensaios permitiram também perceber o efeito da temperatura na cinética de adsorção, tendo-se verificado uma diminuição no tempo que o sistema demora a atingir o equilíbrio à temperatura ambiente, comparativamente a temperaturas inferiores. Ficou ainda provado que é possível a reutilização da resina utilizada, tendo esta mantido a capacidade de adsorção após vários ciclos estudo (adsorção – dessorção – activação).

No que concerne à adsorção de açúcares, os resultados mostraram não haver adsorção. Este dado revela-se positivo no sentido da recuperação de compostos de interesse, de natureza fenólica, a partir de uma mistura contendo também açúcares. Não obstante, e uma vez que se verificou que a desvantagem da simplificação do

procedimento posterior à hidrólise alcalina é um aumento na extracção de açúcares, a adsorção selectiva na resina pode eliminar este potencial problema.

A tentativa de purificação do extracto resultante da hidrólise alcalina, por adsorção em resina, mostrou que o ácido ferúlico foi eficientemente adsorvido (90,83%). A percentagem de dessorção determinada foi de 68,7%, indicando que cerca de 31,3% do ácido ferúlico adsorvido terá ficado retido na superfície da resina. Considera-se que o processo é promissor, principalmente devido aos baixos custos associados e à sua simplicidade, carecendo no entanto de optimização. Já no que toca à dessorção, a concentração do etanol pode ser feita variar no sentido de se obter uma menor percentagem de ácido ferúlico retido. Outra solução poderá também passar pela escolha do solvente de dessorção. Uma vez que o ácido ferúlico é muito solúvel em metanol, esse poderá ser também um bom solvente a estudar.

Devido à indisponibilidade do equipamento, não foi possível o estudo dos liofilizados resultantes do processo de adsorção / dessorção em termos do seu perfil fenólico (por LC-MS), assim como a sua composição em açúcares (via LC-RI), proteínas e aminoácidos. Estes dados permitiriam aferir quais as espécies adsorvidas, quais aquelas que são melhor dessorvidas e, conseqüentemente, caracterizar de forma mais clara e rigorosa o extracto final. Esta caracterização permitiria igualmente aferir sobre a viabilidade da aplicação dos extractos resultantes da hidrólise alcalina, nomeadamente para ingestão directa.

Uma maior valorização da dreche propriamente dita poderá também passar pela recuperação dos açúcares que constituem os extractos resultantes da hidrólise alcalina, bem como pela utilização da fracção de lenhina insolúvel (como bioadsorvente, por exemplo) que, aliada à utilização da fracção de hemicelulose, iria permitir uma utilização integral do material de partida.

Finalmente, seria interessante a aplicação do processo de extracção de ácidos hidroxicinâmicos a outras matrizes da indústria agro-alimentar, como por exemplo o farelo de trigo. Isto permitiria o aproveitamento de outros resíduos, mais ou menos ricos em ácido ferúlico.

V. Referências

1. Hespanhol SI. *Optimização de Processos na Indústria Cervejeira*, Masters Thesis, University of Oporto. 2010.
2. Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*. 2006;43(1):1–14.
3. Gupta M, Abu-Ghannam N, Gallagher E. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010;9(3):318–28.
4. Mussatto SI. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(7):1264–75.
5. Meneses NGT, Martins S, Teixeira J, Mussatto SI. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*. 2013;108:152–8.
6. Mussatto SI, Roberto IC. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2006;81(3):268–74.
7. Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of the American Society of Brewing Chemist*. 2001;59(59–62).
8. Carvalheiro F, Esteves MP, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*. 2004;91(1):93–100.
9. Silva JP, Sousa S, Rodrigues J, Antunes H, Porter JJ, Gonçalves I, *et al.* Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains. *Separation and Purification Technology*. 2004;40(3):309–15.
10. Waters DM, Jacob F, Titze J, Arendt EK, Zannini E. Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *European Food Research and Technology*. 2012;235(5):767–78.
11. Dann HM, Grant RJ, Van Amburgh ME, Van Soest PJ. Lignin-carbohydrate linkages, lignin, and the relationship with fiber digestibility. *Proceedings of Cornell Nutrition*. 2006. p. 12.

12. Fengel D, Wegener G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. 1989. ISBN: 3-11-01209-3.
13. Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, *et al.* Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003;27(5):663–93.
14. Sun R, Lawther JM, Banks WB. A tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Industrial Crops and Products*. 1997;6(1):1–8.
15. Buranov AU, Mazza G. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*. 2008;28(3):237–59.
16. Aliyu S, Bala M. Brewer ' s spent grain : A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(3):324–31.
17. Fastnaught CE. Barley Fiber. *Handbook of Dietary Fiber*. 2001. p. 480. ISBN: 0-8247-8960-1.
18. Belibasakis NG, Tsirgogianni D. Effects of wet brewers grain on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows in hot wheather. *Animal Feed Science and Technology*. 1996;57:175-181.
19. Kaur VI, Saxena PK. Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps. *Bioresource Technology*. 2004;91(1):101–4.
20. Stojceska V, Ainsworth P, Plunkett A, Ibanoglu S. The recycling of brewer's processing by-product into ready-to-eat snacks using extrusion technology. *Journal of Cereal Science*. 2008;47(3):469–79.
21. McCarthy AL, O'Callaghan YC, Piggott CO, FitzGerald RJ, O'Brien NM. Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2013;72(01):117–25.
22. McCarthy AL, O'Callaghan YC, Neugart S, Piggott CO, Connolly A, Jansen MK, *et al.* The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers' spent grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSG as antioxidants into fruit beverages. *Food Chemistry*. 2013;141(3):2567–74.
23. Russ W, Mörtel H, Meyer-Pittroff R. Application of spent grains to increase porosity in bricks. *Construction and Building Materials*. 2005;19(2):117–26.

24. Lu S, Gibb SW. Copper removal from wastewater using spent-grain as biosorbent. *Bioresource Technology*. 2008;99(6):1509–17.
25. Xiros C, Topakas E, Katapodis P, Christakopoulos P. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology*. 2008;99(13):5427–35.
26. Xiros C, Topakas E, Katapodis P, Christakopoulos P. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2008;28(2):213–24.
27. Garlotta D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*. 2002;9(2):63–84.
28. Mussatto SI, Fernandes M, Dragone G, Mancilha IM, Roberto IC. Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnology letters*. 2007;29(12):1973–6.
29. Mussatto SI, Roberto IC. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005;85(14):2453–60.
30. Mussatto SI, Roberto IC. Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002;38(4):401–13.
31. Carvalheiro F, Duarte LC, Medeiros R, Gírio FM. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: Effect of supplementation. *Biotechnology Letters*. 2007;29(12):1887–91.
32. Robertson J, l'Anson KJ, Brocklehurst TF, Faulds CB, Waldron KW. Effect of Storage Conditions on the Microbial Ecology and Biochemical Stability of Cell Wall Components in Brewers' Spent Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(12):7266–72.
33. Forsell P, Kontkanen H, Schols H, Hinz S, Eijsink VGH, Treimo J, *et al.* Hydrolysis of Brewers' Spent Grain by Carbohydrate Degrading Enzymes. *Journal of the Institute of Brewing*. 2008;114(4):306–14.
34. Teixeira S. Hidrólise Enzimática das Proteínas da Dreche, Masters Thesis, University of Oporto. 2011.

35. Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *Clinical Biochemistry*. 2007;40:92–100.
36. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*. 2005;579(1-2):200–13.
37. Bartolomé B, Faulds CB, Williamson G. Enzymic Release of Ferulic Acid from Barley Spent Grain. *Journal of Cereal Science*. 1997;25(3):285–8.
38. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;79(5):727–47.
39. Royal Holloway U of L. The seed biology place. Website Gerhard Leubner Lab. 2000 [cited 2015 Sep 27]. Available from: <http://bit.ly/1LHmEX9>
40. Adom KK, Liu RH. Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry food chemistry*. 2002;50:6182–7.
41. El-Seedi HR, El-Said AMA, Khalifa SAM, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson AK, *et al.* Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(44):10877–95.
42. Marques V, Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*. 2009;113:1370–6.
43. Zhao Z, Moghadasian MH. Chemistry , natural sources , dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid : A review. *Food Chemistry*. 2008;109:691–702.
44. Kumar N, Pruthi V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. 2014;4:86–93.
45. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999;79(3):362–72.
46. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(1):66–71.
47. Scalbert A, Williamson G. Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine. *Journal of Medicinal Food*. 2000;3(2):121–5.

48. Konishi Y, Kubo K, Shimizu M. Structural effects of phenolic acids on the transepithelial transport of fluorescein in caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2003;67(9):2014–7.
49. Konishi Y, Hitomi Y, Yoshioka E. Intestinal Absorption of *p*-Coumaric and Gallic Acids in Rats after Oral Administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52:2527–32.
50. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans C. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(2):220–35.
51. Gonthier M-P, Verny M-A, Besson C, Rémésy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(6):1853–9.
52. Konishi Y, Kobayashi S. Transepithelial Transport of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Their Colonic Metabolites in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(9):2518–26.
53. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*. 2007;43(4):348–61.
54. De Paiva LB, Goldbeck R, dos Santos WD, Squina FM. Ferulic acid and derivatives: Molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;49(3):395–411.
55. Itagaki S, Kurokawa T, Nakata C, Saito Y, Oikawa S, Kobayashi M, *et al*. In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid : A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chemistry*. 2009;114(2):466–71.
56. Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002;13(5):273–81.
57. Ozkorucuklu SP, Beltrán JL, Fonrodona G, Barrón D, Alsancak G, Barbosa J. Determination of dissociation constants of some hydroxylated benzoic and cinnamic acids in water from mobility and spectroscopic data obtained by CE-DAD. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 2009;54(3):807–11.

58. Ou S, Kwok KC. Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004;84(11):1261–9.
59. Young IS, Woodside J V. Antioxidants in health and disease *Antioxidants in health and disease*. *Journal of Clinical Pathology*. 2001;54:176–86.
60. Kayahara H, Miao Z, Fujiwara G. Synthesis and biological activities of ferulic acid derivatives. *Anticancer Research*. 1999;19(5A):3763–8.
61. Lo HH, Chung JG. The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora. *Anticancer Research*. 1999;19(1A):133–9.
62. Anónimo. Arilamina N-Acetiltransferase. lookformedical.com - Pesquisa Médica. 2000 [cited 2015 Jul 25]. Available from: <http://bit.ly/1KGUImO>
63. Mori H, Kawabata K, Yoshimi N, Tanaka T, Murakami T, Okada T, *et al*. Chemopreventive effects of ferulic acid on oral and rice germ on large bowel carcinogenesis. *Anticancer Research*. 1999;19(5A):3775–8.
64. Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, Shimizu M, Yamada Y, Matsunaga K, *et al*. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Letters*. 2000;157(1):15–21.
65. Priefert H, Rabenhorst J, Steinbüchel A. Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;56(3-4):296–314.
66. Heinonen M, Rein D, Satue MT, Huang S, German JB, Frankel EN. Effect of Protein on the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in a Lecithin - Liposome Oxidation System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;8561(97):917–22.
67. Friedman M, Jürgens HS. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(6):2101–10.
68. Bunzel M, Ralph J, Marita JM, Hatfield RD, Steinhart H. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001;81(7):653–60.
69. Salleh NHM, Daud MZM, Arbain D, Ahmad MS, Ismail KSK. Optimization of alkaline hydrolysis of paddy straw for ferulic acid extraction. *Industrial Crops and Products*. 2011;34(3):1635–40.

70. Zhao S, Yao S, Ou S, Lin J, Wang Y, Peng X, *et al.* Preparation of ferulic acid from corn bran : Its improved extraction and purification by membrane separation. *Food and Bioproducts Processing*. 2013;92:309–13.
71. Ou S, Luo Y, Xue F, Huang C, Zhang N, Liu Z. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography. *Journal of Food Engineering*. 2007;78(4):1298–304.
72. Xu F, Sun R-C, Sun J-X, Liu C-F, He B-H, Fan J-S. Determination of cell wall ferulic and *p*-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Analytica Chimica Acta*. 2005;552(1-2):207–17.
73. Bauer JL, Harbaum-Piayda B, Schwarz K. Phenolic compounds from hydrolyzed and extracted fiber-rich by-products. *LWT - Food Science and Technology*. 2012;47(2):246–54.
74. Bartolomé B, Gómez-Cordovés C, Sancho AI, Díez N, Ferreira P, Soliveri J, *et al.* Growth and release of hydroxycinnamic acids from Brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;32(1):140–4.
75. Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC. Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*. 2007;25(2):231–7.
76. Hernanz D, Sancho AI, Faulds CB, Williamson G. Hydroxycinnamic Acids and Ferulic Acid Dehydrodimers in Barley and Processed Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49:4884–8.
77. Moreira MM, Morais S, Carvalho DO, Barros A, Delerue-Matos C, Guido LF. Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Research International*. 2013;54(1):382–8.
78. Moreira MM, Morais S, Barros A, Delerue-Matos C, Guido LF. A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(4):1019–29.
79. Moreira MM. Extraction and Characterization of Natural Antioxidants from Brewing Industry By - products, PhD Thesis, University of Oporto. 2013.

80. Kato Y, Nevins D. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- α -L-arabinofuranosyl)-1(\rightarrow 3)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose as a component of Zea shoot cell-walls. *Carbohydrate Research*. 1985;137:139–50.
81. Salgado JM, Max B, Rodríguez-Solana R, Domínguez JM. Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*. 2012;39:52–61.
82. Martins D, Prado H, Leite R, Ferreira H, Moretti M, Gomes E. Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. *Integrated Waste Management*. 2011;2:319–60.
83. McMillan JD. Pretreatment of lignocellulosic biomass, Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. ACS Symposium Series. 1994. p. 292–324. ISBN: 9780841229563.
84. Buranov AU, Mazza G. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. *Food Chemistry*. 2009;115(4):1542–8.
85. Harmsen P, Huijgen W, López L, Bakker R. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. *Food and Biobased Research*. 2010;1–49.
86. Conidi C, Rodriguez-Lopez AD, Garcia-Castello EM, Cassano A. Purification of artichoke polyphenols by using membrane filtration and polymeric resins. *Separation and Purification Technology*. 2015;144:153–61.
87. Dávila-Guzman NE, Cerino-Córdova FJ, Diaz-Flores PE, Rangel-Mendez JR, Sánchez-González MN, Soto-Regalado E. Equilibrium and kinetic studies of ferulic acid adsorption by Amberlite XAD-16. *Chemical Engineering Journal*. 2012;183:112–6.
88. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(6):1841–56.
89. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 1999;299C:152–78.

90. Gouveia S. Phytochemical studies of bioactive *Asteraceae* plants endemic from Madeira Archipelago, PhD Thesis, University of Madeira. 2011.
91. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 2009;113(4):1202–5.
92. Hernanz D, Nuñez V, Sancho AI, Faulds CB, Williamson G, Bartolomé B, *et al.* Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(10):4884–8.
93. Simirgiotis MJ, Benites J, Areche C, Sepúlveda B. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS. *Molecules*. 2015;20(6):490–507.
94. Zaupa M, Calani L, Del Rio D, Brighenti F, Pellegrini N. Characterization of total antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking. *Food Chemistry*. 2015;187:338–47.
95. Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2005;3(3):423–30.
96. Green S, Mazur A, Shorr E. Mechanism of the catalytic oxidation of adrenaline by ferritin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1956;220:237–55.
97. Anónimo. Adrenalina. Wikipedia. 2015 [cited 2015 Jul 20]. Available from: <http://bit.ly/1NGRw8j>
98. Godinho de Matos L. Sustâncias ergogénicas. *Revista Mundial - Portugal*. 2015 [cited 2015 Aug 15]. Available from: <http://bit.ly/1PBBOwr>

VI. Anexos

Anexo A: Reagentes e compostos de referência

Tabela A 1 - Reagentes e compostos de referência.

Nome	Fornecedor (pureza)
Sacarose	HIMEDIA (99,5%)
Glucose	MERCK (bioq.)
Arabinose	SIGMA ($\geq 99\%$)
Acetona	JMGS, Lda. (99,7%)
Reagente de Folin-Ciocalteu	PANREAC (n.a.*)
Carbonato de sódio	SIGMA-ALDRICH ($\geq 99,8\%$)
Ácido gálico	PANREAC (99% PS)
Hidróxido de sódio	PANREAC (98,0%)
Etanol	RIEDEL-DE HAËN (abs.)
Metanol	FISHER SCIENTIFIC (99,99%)
Ácido clorídrico	FISHER (37%)
Ácido ferúlico	SIGMA-ALDRICH (99%)
Ácido sulfúrico	MERCK (95–97%)
DPPH	FLUKA CHEMIKA ($\geq 85\%$)
Trolox	FLUKA CHEMIKA ($\geq 98\%$)

*n.a. indica *não aplicável*.

Anexo B: Equipamentos

Tabela B 1 - Equipamentos.

Nome	Fornecedor
Balança de humidade	KERN DBS 60-3
Balança analítica	METTLER TOLEDO AB204
Mufla	NABERTHERM L3/C6
Refractómetro	ATAGO RX-1000
Banho de ultra-sons	BRANSON 2510
Centrifugadora	SIGMA 3K30
Evaporador rotativo	BUCHI Waterbath B-480
Liofilizador	CHRIST Alpha 1-2 LD Plus
Espectrofotómetro	PERKIN ELMER UV-Vis
Tubos reactores auto-pressurizados	ACE <i>Pressure tubes</i>
Autoclave	AJC Uniclave 88
Placa de agitação e aquecimento	HEIDOLPH MR Hei-Standard
Controlador de temperatura	HEIDOLPH EXT 3001
Medidor de pH	HANNA HI 83141
Filtros 0,45 µm	CHROMAFIL Xtra PTFE – 45/25
Resina sintética	LANXESS Lewatit VPOC1064 MD PH®

Anexo C: Rectas de calibração

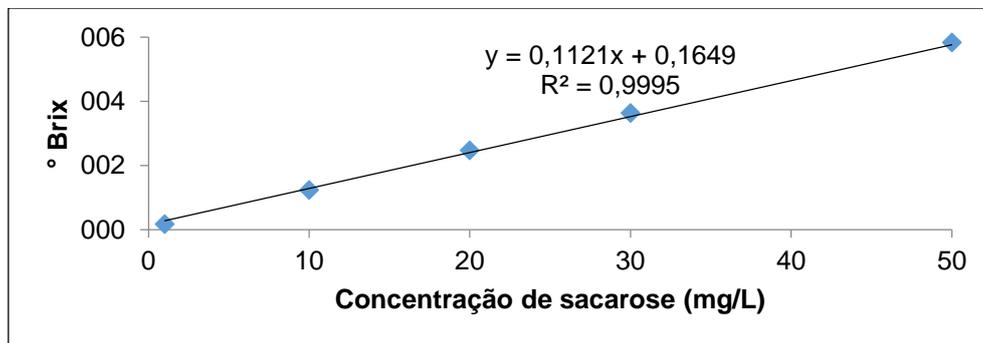


Figura C 1 - Recta de calibração para determinação do teor total de sólidos solúveis.

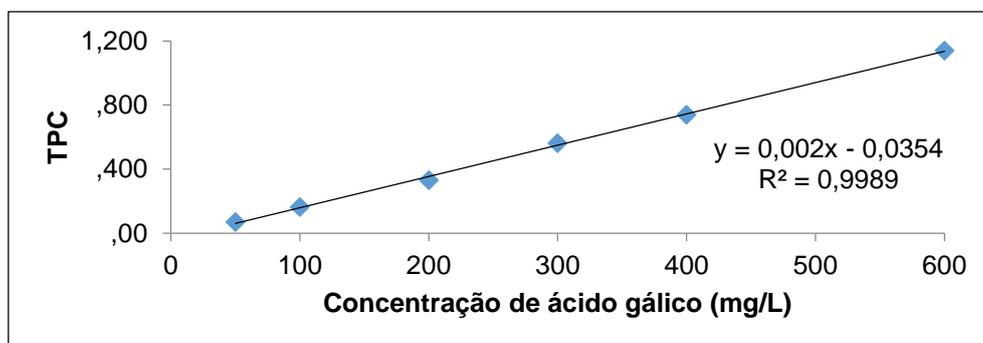


Figura C 2 - Recta de calibração para a determinação do conteúdo total de fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu.

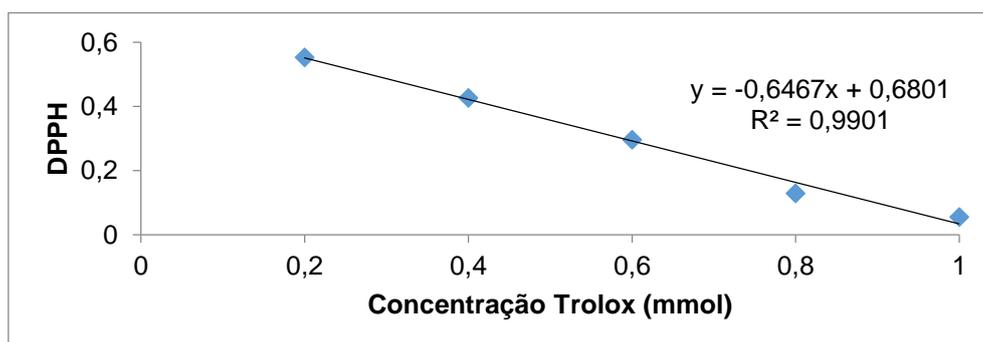


Figura C 3 - Recta de calibração para determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH.

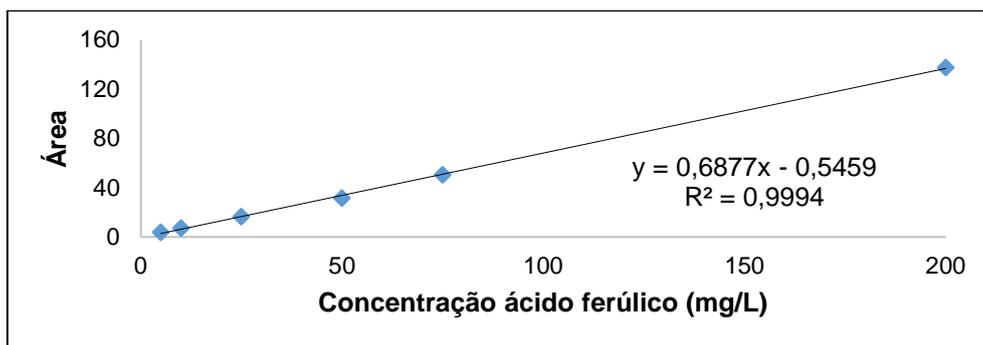


Figura C 4 - Recta de calibração para quantificação do ácido ferúlico via HPLC-DAD.

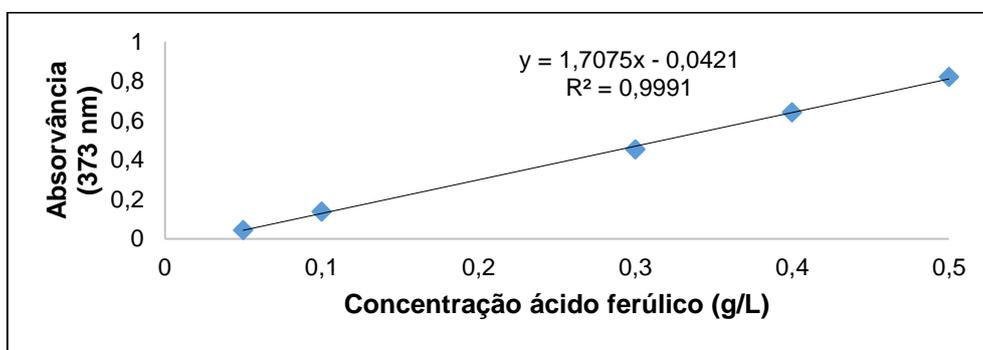


Figura C 5 - Recta de calibração para determinação da concentração de ácido ferúlico via espectrofotometria UV-Vis.