

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Maria do Sacramento Lopes Sousa

**VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA
VINÍCOLA ATRAVÉS DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO
POR SOLVENTES**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química orientada pela Professora Doutora Margarida Maria João de Quina e pelo Professor Doutor Licínio Manuel Gando Azevedo Ferreira, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020

Ana Maria do Sacramento Lopes Sousa

Valorização de resíduos da indústria vinícola através de processos de extração por solventes

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Orientadores:

Professora Doutora Margarida Maria João de Quina

Professor Doutor Licínio Manuel Gando Azevedo Ferreira

Colaboração na orientação:

Rafaela Pereira Rodrigues

Coimbra

Outubro, 2020



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Este trabalho foi desenvolvido sob o projeto “MATIS - Materiais e Tecnologias Industriais Sustentáveis”.
CENTRO-01-0145-FEDER-000014. Funded by Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER);
Programa Operacional Regional do Centro (CENTRO2020).

Cofinanciado por:



*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo o mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

Ao terminar este estudo e o meu percurso académico, gostaria de expressar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que contribuíram para chegar a este momento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores, a Professora Doutora Margarida Quina e o Professor Doutor Licínio Ferreira, por toda a orientação prestada ao longo deste trabalho, pelos seus conselhos e pelo cuidado e preocupação que sempre demonstraram ter comigo.

Gostaria também de agradecer à investigadora com quem trabalhei no laboratório, a Rafaela Rodrigues, por todo o apoio prestado, partilha de conhecimentos, disponibilidade, simpatia e motivação que me deste ao longo deste semestre. Foste uma ajuda preciosa na concretização deste trabalho!

Agradeço também a todos os colegas e investigadores com quem contactei no laboratório, nomeadamente, à Andreia, à Patrícia e à Manorma pela ajuda que me deram e pela simpatia com que sempre me trataram.

Deixo um agradecimento muito especial a todos os amigos que fiz durante o meu percurso académico, em especial, aos amigos do SPES – Coimbra! Vocês são para mim uma fonte inesgotável de alento, energia e boa disposição e uma parte indissociável de quem eu sou: sem vocês, não seria a mesma coisa! Agradeço também à Dora e ao Hugo, por terem sido a ponte que me levou a conhecer estas pessoas tão especiais e por estarem sempre presentes ao longo do meu percurso académico!

Por último, mas o mais importante de todos os meus agradecimentos vai para os meus pais, a minha irmã, os meus avós, ao Nuno e toda a minha família, por me proporcionarem todas as condições para realizar este sonho, por me ajudarem a superar todos os meus receios e todas as minhas dúvidas e por todo o carinho que me deram! Agradeço especialmente ao meu avô, que desde criança me incutiu o gosto pela exploração vinícola, algo que decerto me motivou bastante na realização deste trabalho.

A todos vós, **MUITO OBRIGADA!**

Resumo

A indústria vinícola é um setor de atividade muito importante em Portugal e no mundo, gerando elevadas quantidades de resíduos sólidos e líquidos. O bagaço de uva é um dos resíduos sólidos resultantes do processo de vinificação que é rico em compostos de valor acrescentado, os polifenóis. Estes compostos são uma classe de metabolitos produzidos pelas plantas, com elevado poder antioxidante, e com inúmeros benefícios biológicos, podendo ser utilizados na indústria alimentar ou farmacêutica.

O objetivo deste trabalho consistiu na análise da possibilidade de valorização do bagaço de uva por processos de extração com solvente, de modo a recuperar os polifenóis. O resíduo foi caracterizado física e quimicamente e realizaram-se ensaios preliminares com cinco solventes (água, etanol, acetona, metanol e butanol) e quatro misturas aquosas, a diferentes tempos de operação, temperatura e pH para estudar o comportamento do sistema de extração. A extração de compostos fenólicos foi otimizada mediante um desenho de experiências (DoE), para a acetona e o etanol, variando a temperatura, o tempo de contacto, a concentração de solvente e a razão sólido-líquido (L/S).

O resíduo estudado tem características muito semelhantes às reportadas na literatura. As condições ótimas de extração foram identificadas, correspondendo a um tempo de 1,5 h, concentração do solvente em 50 % (v/v), razão L/S igual a 25 mL/g e uma temperatura de operação de 60 °C, para o etanol, o que permitiu uma recuperação de polifenóis de 40,4 mg GAE/g TS. Para a acetona, as condições ótimas são mantêm-se, exceto a temperatura ótima, que correspondeu a 50 °C, recuperando-se 54,6 mg GAE/g TS.

Este trabalho permitiu concluir que a extração é favorecida usando misturas de um solvente orgânico e água, geralmente, em proporções próximas de 50 % (v/v), pelo aumento da temperatura até um limite máximo de 60 / 70 °C, pelo aumento do tempo de extração e por razões L/S entre 20 e 30 mL/g. Concluiu-se que dos solventes estudados, a acetona é o que permite recuperar maior quantidade de polifenóis, mesmo usando temperaturas mais baixas que nas extrações com o etanol.

Palavras-chave: Bagaço de uva; Polifenóis; Valorização; Extração sólido-líquido; Otimização; Etanol; Acetona; Condições operatórias.

Abstract

The wine industry is a very important industrial sector in Portugal and in the world, producing high amounts of solid and liquid wastes. Grape pomace is one of the solid wastes produced during the wine making process and it is rich in polyphenols, which are valuable compounds. Polyphenols are a family of molecules commonly produced by plants, with high antioxidant capacity and several biological functions, which can be used in the food and pharmaceutical industries.

The main objective of this work was the analysis of the valorization of grape marc through processes of extraction with solvents for recovering polyphenols. The residue was characterized in terms of the main physical and chemical parameters and preliminary assays were conducted with five different solvents (water, ethanol, acetone, methanol and butanol) and four aqueous mixtures, to understand the behavior of the extraction system as a function of time, temperature, and pH. The extraction of polyphenols was optimized using a design of experiments approach (DoE), based on the Central Composite Design. Ethanol and acetone were the solvents investigated. The operating variables considered were temperature, contact time, solvent concentration, and solid-liquid ratio (L/S).

The characterization showed that the physicochemical parameters of the residue are very similar to those reported in the literature. The optimal conditions to operate the extraction were identified as: contact time of 1,5 h, solvent concentration 50 % (v/v), L/S ratio 25 mL/g, and temperature as 60°C for ethanol, which led to a polyphenol recovery of 40,4 mg GAE/g TS. For acetone, the optimal conditions were the same, excluding the temperature, which value was 50 °C, with a polyphenol recovery of 54,6 mg GAE/g TS.

With this work, it was concluded that the extraction is improved with the use of a mixture of water and an organic solvent, with the proportion of the organic solvent rounding 50 %, with the increase of temperature up to a limit between 60 and 70 °C, with the increase of the extraction time and with L/S ratios between 20 and 30 mL/g. Moreover, acetone was the best solvent with higher polyphenol recuperations, even using lower temperatures than those practiced with ethanol.

Key words: Grape pomace; Polyphenols; Valorization; Solid-liquid extraction; Optimization; Ethanol; Acetone; Operating conditions.

Índice

Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice.....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xi
Acrónimos.....	xiii
Nomenclatura.....	xiii
1 Introdução.....	1
1.1 Motivação e âmbito do trabalho.....	1
1.2 Objetivos.....	2
1.3 Estrutura da tese.....	2
2 Fundamentos teóricos.....	5
2.1 Indústria vinícola e a geração de resíduos.....	5
2.2 Resíduos sólidos da indústria vinícola.....	9
2.2.1 Compostos fenólicos presentes no bagaço de uva.....	12
2.2.2 Propriedades e aplicações dos compostos fenólicos.....	15
2.3 Recuperação de compostos fenólicos por processos de extração.....	17
2.3.1 Extração sólido-líquido.....	17
2.3.2 Parâmetros de operação para a extração.....	19
3 Estado da arte.....	21
3.1 Caracterização do resíduo.....	21
3.2 Metodologias de extração.....	22
4 Materiais e métodos.....	29
4.1 Amostragem e armazenamento das amostras.....	29
4.2 Caracterização.....	29
4.2.1 Humidade, sólidos totais e sólidos voláteis.....	29
4.2.2 pH e condutividade elétrica.....	30
4.2.3 Carência química de oxigénio.....	31
4.2.4 Caracterização elementar.....	31
4.2.5 Caracterização química da biomassa lenhocelulósica.....	32
4.2.6 Azoto Kjeldahl.....	33
4.3 Determinação do teor de fenóis.....	34
4.4 Ensaios às condições de operação de extração.....	35

4.5	Ensaio de otimização da extração	37
5	Resultados e discussão	39
5.1	Caracterização do resíduo	39
5.2	Avaliação das condições de operação do processo de extração	41
5.2.1	Seleção de solventes	41
5.2.2	Efeito das misturas de solventes	44
5.2.3	Cinéticas de extração	45
5.2.4	Efeito da temperatura.....	46
5.2.5	Efeito do pH inicial	47
5.3	Otimização da extração de polifenóis	48
5.3.1	Desenho de experiências com misturas de etanol	49
5.3.2	Desenho de experiências com misturas de acetona	54
5.3.3	Análise comparativa dos resultados obtidos com os dois solventes.....	58
6	Conclusão e trabalho futuro	61
7	Referências	63
	Anexos	71
	Anexo A – Calibração da carência química de oxigênio (COD)	73
	Anexo B – Calibração do teor de fenóis (TPh)	75
	Anexo C – Propriedades dos solventes.....	77
	Anexo D – Resultados experimentais.....	79

Lista de figuras

Figura 2.1 – Produção mundial de vinho no ano de 2018 (MhL)(adaptado de Wine, 2019). ...	5
Figura 2.2 – Engaços de uva.	6
Figura 2.3 – Sequência de etapas na produção de vinho (Adaptado de Conradie, et al., 2014).	7
Figura 2.4 – Resíduo de bagaço de uva (Stockfeeds, s.d.).....	8
Figura 2.5 – Borrás de vinho tinto.	8
Figura 2.6 – Estrutura molecular do ácido gálico (a) e do ácido caftárico (b).....	13
Figura 2.7 – Estrutura molecular da flavona.	14
Figura 2.8 – Estrutura de um tanino hidrolisável (a) e de um tanino condensado (b).	14
Figura 4.1 – Resíduo (a) tal qual: (b) após secagem e moagem.	29
Figura 4.2 – Filtração da suspensão obtida.	36
Figura 5.1 – Desempenho de cada um dos solventes na extração de polifenóis (L/S=10 mL/g, T= 50 °C, t=1 h).	42
Figura 5.2 – (a) mistura de água e butanol; (b) extrato + resíduo; (c) extrato obtido com butanol a 50 %.....	43
Figura 5.3 – Extratos obtidos com os solventes testados: a) água; b) etanol 100%; c) etanol 50 %; d) acetona 100%; e) acetona 50 %; f) metanol 100 %; g) metanol 50 %; h) butanol 100%; i) butanol 50 %	43
Figura 5.4 – Efeito da mistura de solventes na recuperação de polifenóis.	44
Figura 5.5 – Cinética de extração de polifenóis a 50 °C, com acetona e etanol a 50 %	45
Figura 5.6 – Efeito da temperatura na recuperação de polifenóis e no rendimento de extração.	46
Figura 5.7 – Efeito do pH inicial na extração de compostos fenólicos com etanol a 50 % (T=50 °C, L/S=10 mL/g, t=1h).	48
Figura 5.8 – Efeitos considerados na construção do modelo de previsão para misturas de etanol.	49
Figura 5.9 – Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o TPh (mg GAE/g TS) e os previstos pelo modelo de regressão na extração com etanol.	49
Figura 5.10 – Resposta de superfície relativa ao TPh para o efeito combinado da (a) concentração de solvente e da razão L/S e (b) para o efeito da concentração de solvente e da temperatura.....	51
Figura 5.11 – Efeito de algumas variáveis na cor dos extratos obtidos: a) efeito da concentração de solvente, T=45 °C, t=1 h; L/S=20 mL/g; b) efeito da razão L/S, T=30°C, t=1,5 h, % ET=20;	

c) efeito da razão L/S, T=60°C, t=1,5 h, % Et=20; d) efeito da temperatura, t=1,5 h; % Et=20, L/S= 10 mL/g.	52
Figura 5.12 – Identificação dos valores que maximizam a resposta do TPh na extração com etanol.	52
Figura 5.13 – Comparação dos valores experimentais e previstos pelo modelo de regressão para a extração com etanol incluindo os pontos das experiências de validação (a verde).	54
Figura 5.14 – Efeitos considerados na construção do modelo de regressão com misturas de acetona.	55
Figura 5.15 – Comparação entre os valores de TPh obtidos e os valores previstos para o modelo com misturas de acetona.	56
Figura 5.16 – Respostas de superfície relativa ao TPh na extração com acetona: a) influência de L/S e % Ac; b) influência de L/S e T.	57
Figura 5.17 – Otimização da função de desirability para a extração de fenóis com acetona. ..	57
Figura 5.18 – Comparação dos valores experimentais e previstos pelo modelo de regressão para a extração com acetona, incluindo os pontos das experiências de validação (a verde).	58
Figura A.1 – Curva de calibração de COD.	73
Figura B.1 – Curva de calibração para o TPh.	75
Figura D.1 – Representação dos valores residuais de TPh em função da previsão do modelo (etanol).	81
Figura D.2 – Representação dos resíduos em função da ordem das experiências (etanol).	82
Figura D.3 – Resposta de superfície para as várias combinações de fatores (etanol).	82
Figura D.4 – Representação dos resíduos de TPh em função da previsão do modelo (acetona).	83
Figura D.5 – Representação dos resíduos de TPh em função da ordem de realização das experiências (acetona).	84
Figura D.6 – Resposta de superfície para as 6 combinações de fatores (acetona).	84

Lista de tabelas

Tabela 2.1 – Possíveis aplicações/tratamentos de valorização do bagaço de uva.	11
Tabela 3.1 – Gamas de valores reportados para os parâmetros selecionados para a caracterização do resíduo.	22
Tabela 3.2 – Valores reportados para os diferentes parâmetros de operação durante a extração e para o teor de compostos fenólicos recuperados.	23
Tabela 4.1 – Níveis testados na otimização com etanol.	37
Tabela 4.2 – Níveis testados na otimização com acetona.	37
Tabela 5.1 – Caracterização do bagaço de uva.	39
Tabela 5.2 – Parâmetros do ajuste cinético para os dois solventes.	45
Tabela 5.3 – Condições operatórias e resultados obtidos na validação do modelo de regressão para a extração com etanol.	54
Tabela 5.4 – Pontos experimentais de validação do modelo de acetona.	58
Tabela A.1 – Pontos usados na curva de calibração do COD.	73
Tabela B.1 – Pontos experimentais na determinação da curva de calibração para o TPh.	75
Tabela C.1 – Propriedades dos solventes utilizados.	77
Tabela D.1 – Resultados experimentais obtidos nas experiências de seleção do solvente.	79
Tabela D.2 – Resultados experimentais para as experiências de efeito da mistura de solventes.	79
Tabela D.3 – Resultados experimentais para as experiências de cinética com etanol.	80
Tabela D.4 – Resultados experimentais para as experiências de cinética com acetona.	80
Tabela D.5 – Resultados experimentais obtidos nas experiências de determinação do efeito da temperatura.	80
Tabela D.6 - Resultados experimentais obtidos nas experiências para determinar o efeito do pH.	80
Tabela D.7 – Resultados experimentais obtidos nas experiências de DoE (etanol).	81
Tabela D.8 – Condições e resultados experimentais obtidos na validação do modelo (etanol).	82
Tabela D.9 – Resultados experimentais obtidos nas experiências de DoE para a acetona.	83
Tabela D.10 – Condições e resultados experimentais obtidos na validação do modelo (acetona).	84

Acrónimos

Abs – Absorvância

Ac – Acetona

Amb – Ambiente

BOD – Carência bioquímica de oxigénio (*Biochemical Oxygen Demand*)

CHP – *Combined heat and power*

CL – Celulose (*Cellulose*)

COD – Carência química de oxigénio (*Chemical Oxygen Demand*)

Desv – Desvio padrão amostral

DoE – Desenho de experiências (*Design of Experiments*)

EC – Condutividade elétrica (*Electrical Conductivity*)

EtOH – Etanol

GAE – Equivalentes a ácido gálico (*Gallic Acid Equivalent*)

HM – Hemiceluloses (*Hemicelluloses*)

LG – Lenhina (*Lignin*)

MeOH – Metanol

Rend – Rendimento

TKN – Azoto Kjeldahl total (*Total Kjeldahl Nitrogen*)

TPh – Compostos fenólicos totais (*Total Phenolics*)

TPh_{exp} – TPh experimental

TPh_{pred} – TPh previsto pelo modelo de regressão

TS – Sólidos totais (*Total solids*)

VS – Sólidos voláteis (*Volatile solids*)

Nomenclatura

a – Recuperação de fenóis em equilíbrio cinético (mg GAE/g TS)

C – Concentração (g/L)

C_0 – Concentração de soluto na partícula no instante inicial (g/L)

C_p – Concentração de soluto na partícula (g/L)

C_s – Concentração de soluto no solvente (g/L)

D – Coeficiente de difusão (m^2/s)

K – Coeficiente de partição

k – Constante cinética (h^{-1})

L/S – Razão Líquido/Sólido (mL/g)

m – Massa (g)

t – Tempo (h)

T – Temperatura (°C)

(v/v) – Fração volúmica (%)

x – Dimensão da partícula (m)

%Ac – Concentração de acetona

%Et – Concentração de etanol

1 Introdução

1.1 Motivação e âmbito do trabalho

A indústria vinícola é um setor com elevada relevância em Portugal, na Europa e no mundo (Portugal, 2019; Wine, 2019; Wine, 2018), gerando para além do vinho (produto desejado), uma elevada quantidade de resíduos sólidos, e efluentes líquidos (Zacharof, 2017; Kalli, et al., 2018; Oliveira & Duarte, 2016; Schieber, et al., 2002).

O vinho é uma bebida alcoólica produzida a partir de uma sequência de processos aplicados às uvas, incluindo a remoção de engaços, esmagamento, fermentação e prensagem (Zacharof, 2017). Os resíduos sólidos começam a ser produzidos a partir da remoção dos engaços. De entre os resíduos sólidos produzidos, o bagaço de uva (*grape pomace*) é o que mais se destaca, que pode ser constituído pelos engaços, peles e sementes (Kalli, et al., 2018; Zacharof, 2017). As borras de vinho são um resíduo com elevado teor de líquido, formado durante o processo de fermentação, constituído por leveduras e sólidos suspensos depositados (Zacharof, 2017). Os resíduos líquidos consistem nas águas residuais resultantes da pré e pós lavagens dos equipamentos onde decorrem as várias etapas de produção de vinho (Conradie, et al., 2014; Oliveira & Duarte, 2016; Zacharof, 2017).

A produção destes tipos de resíduo ocorre sazonalmente, dependendo do período de cultivo da vinha e da produção do vinho (Zacharof, 2017). Apesar da sazonalidade, a deposição deste tipo de resíduo na natureza sem qualquer tratamento apresenta alguns impactos ambientais negativos, uma vez que é um resíduo muito rico em matéria orgânica, destacando-se a presença de compostos fenólicos (Kalli, et al., 2018; Muhlack, et al., 2018). Os compostos fenólicos têm algumas implicações ambientais como por exemplo, a inibição da germinação de sementes (Pinho, et al., 2017). Por outro lado, estes resíduos não devem ser utilizados diretamente para alimentação animal porque os compostos fenólicos poliméricos reduzem a digestibilidade do resíduo (Fontana, et al., 2013). No entanto, os compostos fenólicos podem ser removidos usando técnicas de extração, podendo ser aplicados em várias áreas (por exemplo, como suplemento dietético ou como constituinte de cosméticos), devido aos seus múltiplos benefícios biológicos (Kalli, et al., 2018; Muhlack, et al., 2018).

Os compostos fenólicos são uma família de moléculas com pelo menos um anel fenólico na sua constituição. Estes compostos podem ser classificados como ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavanóis, flavonóis, flavonas, estilbenos, antocianinas e procianidinas (Fontana, et al., 2013; Teixeira, et al., 2014). Os compostos fenólicos são

frequentemente quantificados como equivalentes de ácido gálico (GAE), que é um composto fenólico simples ($C_6H_2(OH)_3COOH$) (Dai & Mumper, 2010; Amendola, et al., 2010).

Existem diversos métodos para extrair compostos fenólicos de materiais naturais. A extração sólido-líquido é uma das principais técnicas de extração, em que o resíduo é colocado em contacto direto com um solvente, ocorrendo transferência dos compostos fenólicos para o solvente. A extração por solvente apresenta elevados tempos de extração, baixa seletividade e para evitar problemas de toxicidade, o solvente usado deve ser criteriosamente escolhido (Kalli, et al., 2018). Apesar destas limitações, a extração sólido-líquido tem vindo a ser muito estudada e os parâmetros de operação têm vindo a ser otimizados. Como alternativa, têm sido também estudados outros métodos que potenciem a velocidade da extração, usando mecanismos que aumentam a *driving force* aplicada. São exemplo disso as técnicas de extração com fluidos supercríticos, extração assistida por ultrassons e extração assistida por micro-ondas (Fontana, et al., 2013).

1.2 Objetivos

O objetivo deste trabalho consiste na valorização de resíduos sólidos provenientes da indústria vinícola, recorrendo a técnicas de extração sólido-líquido que permitam a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos. Neste contexto, são objetivos específicos deste trabalho:

- caracterizar o resíduo vinícola relativamente aos parâmetros físicos e químicos de maior relevo no contexto da extração;
- avaliar o(s) solvente(s) mais eficaz(es) para atingir eficiências aceitáveis;
- realizar estudos cinéticos com os solventes selecionados de modo a determinar o tempo de extração e selecionar as melhores gamas de operação para o processo de otimização;
- realizar ensaios de otimização das condições de operação das experiências, através de desenhos de experiências, de modo a determinar o efeito da temperatura, do tempo de contacto e agitação, da razão sólido:líquido e da concentração do solvente;
- validar os modelos de regressão obtidos.

1.3 Estrutura da tese

Esta tese está estruturada em seis capítulos. No primeiro capítulo é apresentada a motivação e o âmbito deste trabalho, bem como os seus objetivos e a sua estrutura. No segundo capítulo é descrito o processo de produção do resíduo em estudo, o bagaço de uva, assim como as várias metodologias possíveis para a sua valorização. Neste capítulo serão também apresentados os compostos fenólicos presentes no bagaço de uva, bem como as suas

propriedades e aplicações, uma vez que o objetivo deste trabalho incide na sua recuperação e valorização. São também abordadas as técnicas de extração sólido-líquido usadas neste processo de recuperação, bem como as variáveis que afetam este processo. No terceiro capítulo será abordado o estado da arte no que toca a metodologias de caracterização e a metodologias de extração. O quarto capítulo descreve os materiais e métodos aplicados neste trabalho e o no quinto capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos, aplicando os métodos descritos no capítulo anterior. O sexto capítulo contempla as conclusões obtidas após a execução deste trabalho laboratorial bem como as propostas para trabalhos futuros.

2 Fundamentos teóricos

2.1 Indústria vinícola e a geração de resíduos

A indústria vinícola é um importante setor de atividade em Portugal, na Europa e no mundo, que produz como principal produto o vinho. Esta é a bebida alcoólica mais procurada no mundo, tendo-se registado uma produção de 29,2 mil milhões de litros de vinho no ano de 2018 (Wine, 2019). O vinho é produzido a partir da uva, o fruto da videira, pertencente ao género botânico *Vitis*. A produção de vinho concentra-se tipicamente na zona mediterrânica do continente europeu, em países como Itália, França e Espanha, com uma área de cultivo de vinha correspondente a cerca de 2467 mil hectares, sendo a maioria destas vinhas exploradas com o objetivo de produzir vinho. A espécie de videira dominante para a produção de vinho é a *Vitis vinifera*. No entanto, atualmente, os Estados Unidos da América surgem como 4º maior produtor de vinho a nível mundial (Zacharof, 2017; Wine, 2019). A Figura 2.1 apresenta os principais produtores mundiais de vinho, e as quantidades produzidas no ano de 2018, em milhões de hectolitros.

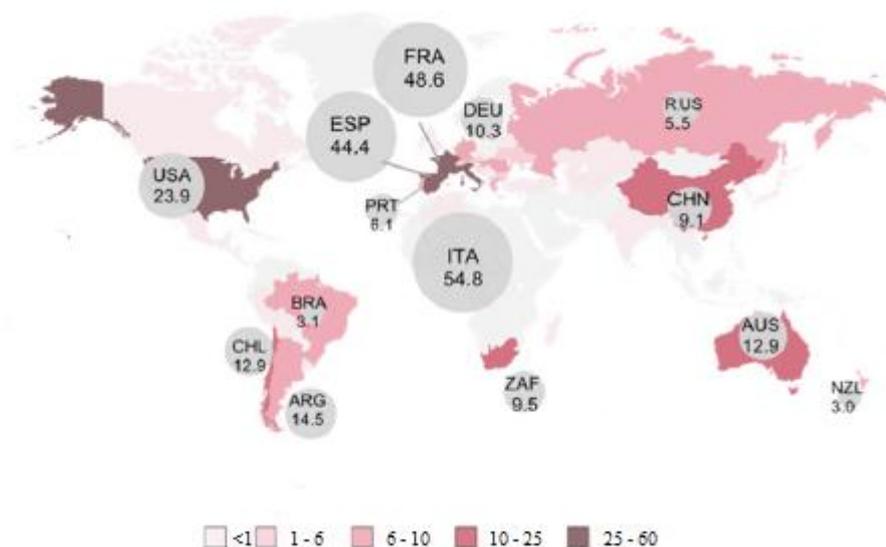


Figura 2.1 – Produção mundial de vinho no ano de 2018 (MhL)(adaptado de Wine, 2019).

Por sua vez, Portugal ocupa a 11ª posição no que toca à capacidade de produção, reportando esta posição ao ano de 2018 (Wine, 2019), em que foram produzidos cerca de 610 milhões de litros. Este setor apresenta, portanto, grande relevância na balança comercial nacional, movimentando anualmente mais de 700 milhões de euros (Portugal, 2019).

A produção de vinho é uma atividade sazonal, decorrendo a colheita da uva e a produção de vinho entre os meses de agosto e outubro no hemisfério norte. A esta atividade está associada uma produção de resíduos equivalente a cerca de cinco toneladas de resíduo sólido (bagaço e vides) por cada hectare de cultivo durante o período de um ano, sendo este valor mais expressivo considerando a sazonalidade desta atividade (Kalli, et al., 2018; Zacharof, 2017). A produção de efluentes líquidos também é considerável, sendo da ordem dos milhões de litros em países com elevada produção, como os países da região mediterrânea (Zacharof, 2017). Os vários tipos de resíduos são produzidos ao longo dos vários estágios da produção de vinho.

O processo de produção de vinho decorre em várias etapas após a colheita das uvas. As primeiras etapas correspondem a tratamentos mecânicos aplicados às uvas, sendo comuns à produção de vinho tinto ou vinho branco, começando-se pelo processo de remoção total ou parcial dos caules presentes no cacho de uvas, vulgarmente designados de engaços, como se pode observar na Figura 2.2. (Arvanitoyannis, et al., 2006; Zacharof, 2017).



Figura 2.2 – Engaços de uva.

A etapa seguinte passa pelo esmagamento das uvas, podendo esta etapa ser realizada mecanicamente ou manualmente, em processos mais tradicionais. A partir desta etapa, a tecnologia de produção de vinho é diferente caso se esteja a fazer vinho branco ou vinho tinto, uma vez que a fermentação do vinho tinto ocorre na presença dos componentes sólidos da uva, como as sementes, as peles e os engaços (no caso da remoção parcial) e a fermentação do vinho branco só ocorre após a separação destes componentes. As etapas fundamentais de produção como prensagem, fermentação, sedimentação, maturação e estabilização do vinho são comuns para os dois tipos de tecnologias, havendo diferenças no encadeamento dos vários processos, de modo a cumprir as especificações de produção de cada um dos tipos de vinho. A Figura 2.3 apresenta a sequência de estágios aplicada para a produção de cada um dos tipos de vinho, evidenciando as etapas onde ocorre geração de resíduos (Arvanitoyannis, et al., 2006; Conradie, et al., 2014; Zacharof, 2017).

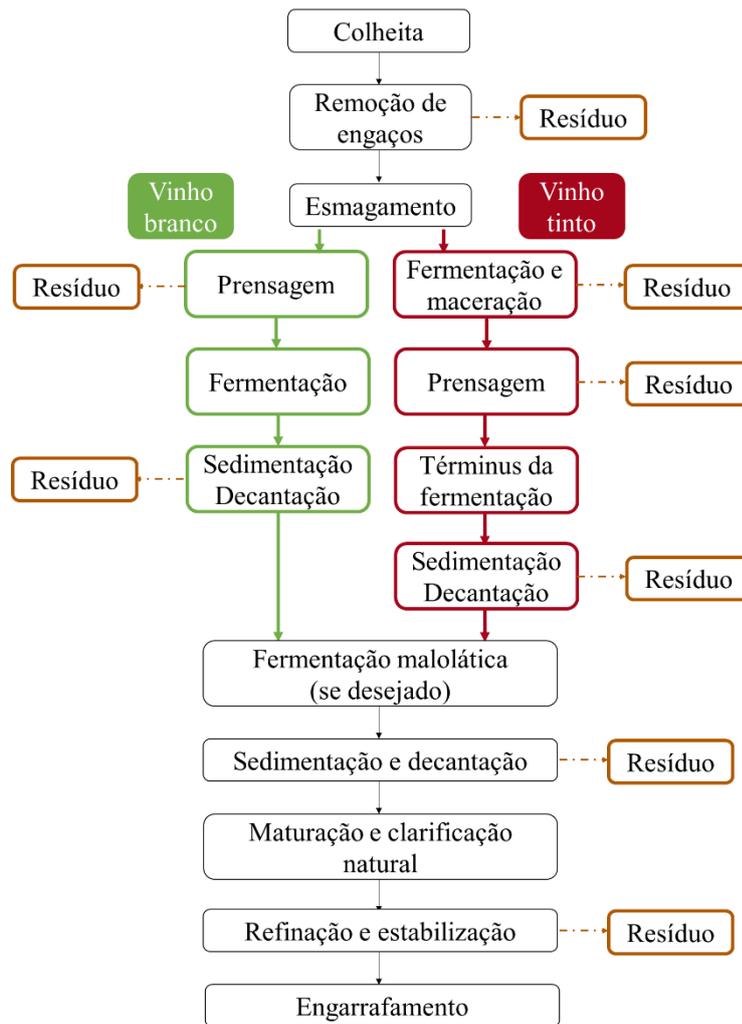


Figura 2.3 – Sequência de etapas na produção de vinho (Adaptado de *Conradie, et al., 2014*).

A etapa fulcral de produção de vinho é a fermentação alcoólica, que é mediada por leveduras. Durante esta etapa, os açúcares presentes na uva são convertidos em etanol pelas leveduras, proporcionando simultaneamente o crescimento da cultura microbológica. Este passo deve ser realizado na presença de agitação, uma vez que as leveduras são matéria sólida, e, portanto, com tendência a depositar. A prensagem tanto pode ocorrer antes como depois, consoante o tipo de vinho a produzir. De qualquer forma, esta etapa conclui o processo de remoção das partes sólidas da uva, como as sementes, as peles e os restantes engaços. Ao conjunto destes resíduos sólidos e dos engaços removidos na primeira etapa dá-se o nome de bagaço de uva (*grape pomace*) (Nerantzis & Tataridis, 2006). A aparência do bagaço de uva é a apresentada na Figura 2.4.



Figura 2.4 – Resíduo de bagaço de uva (*Stockfeeds, s.d.*).

Ao líquido resultante após as etapas de prensagem dá-se o nome de mosto, que é formado numa proporção de aproximadamente 80 L por cada 100 kg de uvas (Zacharof, 2017). Deste modo, os resíduos sólidos que constituem o bagaço da uva contribuem em cerca de 20 a 30 % da massa inicial de uvas (Brezoiu, et al., 2019; Drousou, et al., 2015; Nerantzis & Tataridis, 2006; Zacharof, 2017).

Outra etapa fundamental na produção de vinho é a sedimentação. Na etapa que sucede à fermentação ou à sua finalização, o vinho sobrenadante é separado das borras que se depositam na base do depósito por ação da gravidade. As borras são um resíduo com elevadas quantidades de líquido, sendo que a fase sólida (5%, v/v) é essencialmente constituída por leveduras presentes na fermentação, alguns hidratos de carbono insolúveis e vestígios de resíduos sólidos que não tenham sido eliminados nas etapas anteriores como peles, sementes e caules (Zacharof, 2017). A fase líquida é constituída principalmente pelo caldo de fermentação (Pérez-Bibbins, et al., 2015). Na Figura 2.5 pode observar-se o aspeto típico de borras de vinho tinto.



Figura 2.5 – Borrás de vinho tinto.

As últimas etapas de produção do vinho consistem no armazenamento para maturação, clarificação e estabilização, terminando com o processo de engarrafamento. Apesar destas etapas não gerarem diretamente quantidades significativas de resíduos sólidos, todos os equipamentos que entraram em contacto com o vinho são devidamente lavados com água, solventes, detergentes e agentes químicos, tanto antes da produção de vinho, para garantir a segurança alimentar e a qualidade da bebida, como depois da sua utilização. Deste modo, estas etapas geram elevadas quantidades de águas residuais, sendo este valor estimado entre 0,5 e 14 L de água residual por cada litro de vinho produzido. Este valor é dependente da quantidade de vinho produzida em cada instalação (Zacharof, 2017).

2.2 Resíduos sólidos da indústria vinícola

De entre os resíduos sólidos, o bagaço de uva é aquele com maior impacto uma vez que é produzido em elevadas quantidades. A composição do bagaço de uva em sementes, peles e engaços é muito variável, dependendo do tipo de uva e da forma como estes resíduos são removidos do processo de produção e se pretendem aproveitar (Dwyer, et al., 2014). De entre estes constituintes, as peles encontram-se em maior abundância, podendo contribuir para aproximadamente 70 a 90 % do peso do bagaço em base húmida. As sementes, por sua vez, contribuem entre cerca de 7 a 20 % do peso do bagaço, enquanto que a quantidade de engaços pode variar entre 1 e 11 % (Jiang & John Simonsen, 2011; Toscano, et al., 2013). O teor de humidade do bagaço varia geralmente entre 50 e 72% (Teixeira, et al., 2014). Também a sua composição química é muito variável, sendo este um resíduo rico em lenhina, celulose e hemiceluloses, açúcares e compostos fenólicos (Zacharof, 2017). A deposição deste resíduo diretamente no ambiente apresenta impactos negativos, tanto ao nível do solo como nos cursos de água envolventes, nomeadamente, acidificando o meio, alterando a sua condutividade elétrica e cor. Por outro lado, a elevada carga orgânica do resíduo (avaliada em termos de carência química ou bioquímica de oxigénio, COD e BOD) reduz significativamente a disponibilidade de oxigénio nos ecossistemas aquáticos, o que se traduz na morte da fauna e flora aquática, bem como na produção de odores desagradáveis, resultantes de processos de anaerobiose (Dwyer, et al., 2014; Zacharof, 2017).

Com o aumento da consciência ambiental, é cada vez mais urgente tratar os resíduos, não só tendo como objetivo a sua minimização, mas também, procurando e desenvolvendo processos de valorização que permitam reintegrar os constituintes dos resíduos em produtos de valor acrescentado, de acordo com os conceitos de economia circular e de biorrefinaria. De acordo com estes conceitos, procura-se utilizar um resíduo como fonte de matéria prima para bioconversões, com o objetivo de produzir compostos químicos de valor acrescentado ou como

forma de gerar calor combinado com energia (*Combined Heat and Power – CHP*) (Kalli, et al., 2018; Zacharof, 2017).

O bagaço de uva tem sido valorizado na forma de fertilizante ou como corretivo para solos. No entanto, a presença de compostos fenólicos pode causar inibição na germinação de sementes, diminui o pH deste resíduo e aumenta a sua carência química de oxigênio (COD) (Pinho, et al., 2017; Dwyer, et al., 2014). Por outro lado, muitos dos compostos fenólicos presentes no resíduo apresentam propriedades fitotóxicas e efeito antibacteriano, o que confere a este resíduo uma elevada resistência à biodegradação (Bustamante, et al., 2008). Deste modo, o bagaço de uva só deveria ser aplicado no solo após uma remoção destes compostos. Para além destes aspetos, os resíduos sólidos provenientes da indústria vinícola apresentam em geral elevadas quantidades de macronutrientes, sendo deficitárias em micronutrientes, tornando-se incompatível com as necessidades agrícolas (Devesa-Rey, et al., 2011).

Este tipo de resíduo também pode ser utilizado como suplementos para alimentação animal, devido ao seu valor nutritivo. No entanto, a presença de lenhina (composto fenólico polimérico) reduz a digestibilidade do alimento, uma vez que afeta negativamente a atividade de enzimas e o crescimento de microrganismos do trato digestivo em ruminantes (Bonilla, et al., 1998; Fontana, et al., 2013; Gómez-Brandón, et al., 2019; Kalli, et al., 2018).

A produção de biogás por digestão anaeróbia é também uma das formas mais estudadas para a valorização do bagaço de uva. Neste processo, os resíduos são inoculados com um consórcio de microrganismos que, na ausência de oxigênio, degradam a matéria orgânica complexa até obter uma mistura gasosa de dióxido de carbono e metano (Moletta, 2005). A digestão anaeróbia decorre em quatro etapas principais: hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese. O metano produzido pode ser utilizado para geração de energia elétrica, que em muitos casos pode alimentar a unidade industrial onde foram gerados os resíduos (Cáceres, et al., 2012). No entanto, o elevado teor de lenhina presente no bagaço reduz a sua biodegradabilidade, o que se traduz num baixo rendimento de produção de metano (Dinuccio, et al., 2010).

Seguindo o conceito de biorrefinaria, o bagaço de uva pode ainda ser valorizado ou tratado de diferentes formas que se encontram resumidas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Possíveis aplicações/tratamentos de valorização do bagaço de uva.

Tratamento	Descrição
Hidrólise de hemiceluloses	O bagaço de uva é rico em hemiceluloses que podem ser hidrolisadas, produzindo-se misturas de xilose e glicose. Na presença de microrganismos, esta mistura pode ser convertida em ácido láctico, produzindo-se simultaneamente biossurfactantes (Rivera, et al., 2007).
Fermentação no estado sólido	A fermentação no estado sólido é um processo aplicável a compostos insolúveis, como o material lenhocelulósico das plantas, ocorrendo na presença de um elevado teor de humidade. Neste processo, o bagaço pode ser fermentando, produzindo-se enzimas hidrolíticas e bioetanol (Sánchez, et al., 2015; Zacharof, 2017).
Compostagem	A compostagem é um dos processos de estabilização mais utilizados, e, à semelhança da digestão anaeróbia, degrada os compostos mais complexos da biomassa em compostos mais simples, estabilizando o resíduo. Este processo decorre na presença de oxigénio e o composto pode ser usado como fertilizante ou corretivo de solos. Devido à abundância de compostos fenólicos no bagaço, que aumentam a resistência à biodegradação e inibem a germinação de sementes, alguns autores referem que deve ser aplicado um pré-tratamento ao resíduo antes do processo de compostagem (Muhlack, et al., 2018; Zacharof, 2017).
Remoção de metais pesados	A utilização de engaços de uva para remoção de metais pesados presentes em águas residuais é uma via de valorização possível para este resíduo. A abundância de grupos hidroxilo, carboxilo, sulfato, fosfato e amina (presentes nos hidratos de carbono, proteínas e compostos fenólicos) confere aos engaços um elevado poder de adsorção, permitindo a captação de metais pesados de águas residuais, através de um mecanismo de permuta iónica (Villaescusa, et al., 2004).
Fracionamento do resíduo	O bagaço de uva pode ser fracionado por hidrólise química ou enzimática, com o objetivo de obter celulose, hemiceluloses, fenóis, lenhina e outros polímeros, que podem ser convertidos posteriormente em outros compostos de valor, como álcoois, cetonas e ácidos carboxílicos (Kalli, et al., 2018).
Recuperação de ácido tartárico	O bagaço de uva é uma fonte de ácido tartárico, que pode ser removido por extração, com água quente ou ácido clorídrico, sendo depois precipitado na forma de tartaratos, que são reconvertidos em ácido tartárico. O ácido tartárico pode ainda ser recuperado por processos de membranas, como a eletrodialise com membranas bipolares (Muhlack, et al., 2018).
Fermentação para produção de bebidas	O bagaço de uva contém uma elevada quantidade de açúcares solúveis residuais, que podem ser fermentados para produzir etanol. O etanol é removido do bagaço por destilação, podendo ser usado para a produção de bebidas com elevado teor alcoólico, ou seja, as bebidas destiladas (Williams & Strauss, 1978).

Tabela 2.1 – Possíveis aplicações/tratamentos de valorização do bagaço de uva (continuação).

Tratamento	Descrição
Conversão térmica	Uma das aplicações possíveis para o bagaço de uva é a conversão térmica, produzindo-se energia e outros compostos. A combustão é um processo de valorização do resíduo, em que toda a biomassa é oxidada na presença de oxigênio em excesso. O calor libertado pode ser usado para aquecimento ou para produção de energia elétrica por cogeração (Celma, et al., 2007). O resíduo pode ser valorizado por gaseificação, que consiste na oxidação parcial da matéria orgânica. Deste processo resulta uma mistura gasosa que pode ser queimada para produção de energia ou fracionada, separando-se nos seus diferentes compostos (Hernández, et al., 2010). O resíduo pode também ser valorizado termicamente na ausência de oxigênio, através de pirólise, podendo-se produzir uma gama variada de produtos consoante as condições de operação (Muhlack, et al., 2018).
Extração de compostos lenhocelulósicos	A abundância de celulose, hemiceluloses e lenhina nos engaços de uva contribui para um valor elevado da carência química de oxigênio, o que torna problemática a sua deposição na natureza. Uma forma de reduzir este problema é a extração dos compostos lenhocelulósicos utilizando solventes orgânicos e recorrendo a um pré-tratamento de auto-hidrólise. Neste processo de valorização, é possível decompor as hemiceluloses em açúcares redutores e alguns compostos fenólicos. Por sua vez, é também possível remover os compostos fenólicos ligados à lenhina. A fibra recuperada neste processo pode ser utilizada como suplemento dietético (Amendola, et al., 2012).
Recuperação de compostos fenólicos	Os fenóis representam uma família de compostos relativamente abundantes no bagaço de uva. Durante o processo de produção de vinho, estes compostos são extraídos em baixas quantidades para a bebida, permanecendo a maioria nos resíduos sólidos. Estes compostos podem ser recuperados utilizando diferentes técnicas de extração, podendo ser utilizados com diferentes aplicações, como a indústria alimentar, farmacêutica e cosmética, devido às suas propriedades bioativas (Fontana, et al., 2013; Muhlack, et al., 2018).

2.2.1 Compostos fenólicos presentes no bagaço de uva

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários produzidos durante o normal desenvolvimento das plantas como resposta a *stresses* ambientais, nomeadamente, lesões nos tecidos, infeções ou radiação ultravioleta (Nacz & Shahidi, 2004). Estes compostos são responsáveis pela maioria das propriedades organoléticas dos vinhos, nomeadamente, a cor, o sabor, a adstringência e o corpo (Teixeira, et al., 2014). A composição dos vinhos e do bagaço de uva em compostos fenólicos é muito dependente da variedade da uva, do clima e da região

de cultivo, do tipo de solos e do processo de vinificação (Lafka, et al., 2007; Teixeira, et al., 2014).

Os compostos fenólicos englobam uma vasta família de compostos constituídos por um anel aromático substituído por um ou mais grupos hidroxilo e todos os seus derivados. Atualmente, estão identificados mais de 8000 compostos fenólicos existentes na natureza. Os compostos fenólicos englobam também os polifenóis, ou seja, os compostos fenólicos que apresentem mais do que um anel aromático na sua estrutura (Muhlack, et al., 2018; Robbins, 2003). Estes compostos podem ser divididos em vários grupos, consoante a sua estrutura química. Os mais simples são os ácidos fenólicos, apresentando um anel aromático com uma funcionalidade de ácido carboxílico e grupos hidroxilo. Estes compostos são divididos em derivados dos ácidos hidroxibenzoicos e em derivados dos ácidos hidroxicinâmicos. De entre os ácidos hidroxibenzoicos, o ácido gálico é o mais abundante em todos os componentes do bagaço de uva, apresentando-se a sua estrutura na Figura 2.6 (a). Os ácidos hidroxicinâmicos encontram-se em maior abundância nas peles de uva e os principais compostos identificados são o ácido caftárico (Figura 2.6 (b)), p-coutárico e o ácido fertárico (Teixeira, et al., 2014).

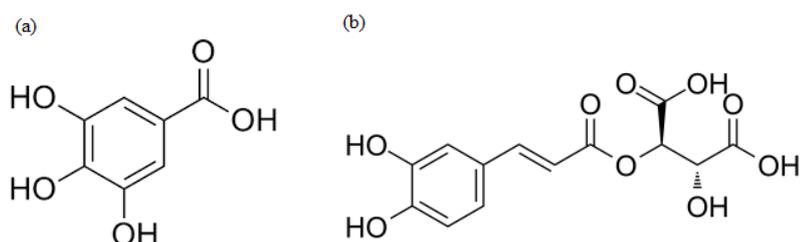


Figura 2.6 – Estrutura molecular do ácido gálico (a) e do ácido caftárico (b).

Os flavonóides são o grupo de compostos fenólicos mais abundante na alimentação humana, sendo a sua unidade funcional o núcleo flavano, constituído por 15 átomos de carbono distribuídos em 3 anéis, na forma C6-C3-C6. Estes compostos são derivados da flavona, cuja estrutura é apresentada na Figura 2.7. A classe dos flavonóides divide-se em seis subclasses, de acordo com o estado de oxidação do anel central: flavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas (Dai & Mumper, 2010; Teixeira, et al., 2014). A presença de flavonóides é atribuída à capacidade de atuar como filtro de radiação ultravioleta e como agentes atrativos de polinizadores. Os flavanóis e as antocianinas, em particular, são respetivamente uma fonte de pigmentos e responsáveis pela cor nas uvas tintas. Os flavonóides encontram-se sobretudo nas peles e, uma vez que estes compostos são altamente solúveis, são facilmente transferidos para o vinho durante o processo de vinificação (Teixeira, et al., 2014).

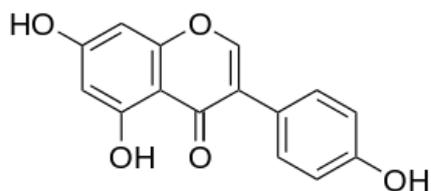


Figura 2.7 – Estrutura molecular da flavona.

Os taninos são responsáveis pela adstringência do vinho, e podem ser subdivididos em dois tipos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis contêm um núcleo de glicose ou um outro polioli esterificado com um ácido fenólico, nomeadamente ácido gálico ou ácido hexa-hidroxi-difênico, podendo o seu peso molecular variar entre 500 e 2800 g/mol (Dai & Mumper, 2010). Estes compostos fenólicos podem ser hidrolisados por ação do pH, ou por hidrólise enzimática e não-enzimática, obtendo-se açúcares e ácidos fenólicos (Garrido & Borges, 2013). Os taninos hidrolisáveis mais frequentes no vinho e nos resíduos da sua produção são os galotaninos (Figura 2.8 (a)) e os elagitaninos (Garrido & Borges, 2013). Por sua vez, os taninos condensáveis são oligómeros ou polímeros cuja unidade de repetição tem por base um composto derivado do flavan-3-ol (Figura 2.8 (b)). Os taninos condensáveis são também conhecidos como proantocianidinas uma vez que originam antocianinas se forem decompostos com reações de oxidação em soluções alcoólicas ácidas (Dai & Mumper, 2010).

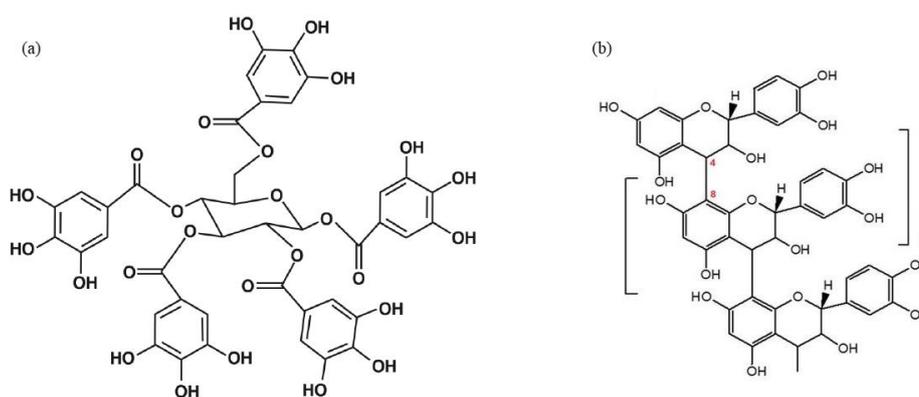


Figura 2.8 – Estrutura de um tanino hidrolisável (a) e de um tanino condensado (b).

Os vários componentes do bagaço de vinho são muito ricos em compostos fenólicos. Os engaços de uva são ricos em flavan-3-óis, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis monoméricos e oligoméricos e estilbenos, correspondendo a cerca de 5,8% da sua massa em base seca (Teixeira, et al., 2014). Os polifenóis presentes nas sementes correspondem a cerca de 60 a 70

% do seu material extratável, correspondendo entre 5 a 8% da sua massa em base seca (Shi, et al., 2003; Teixeira, et al., 2014). Os principais compostos fenólicos encontrados em sementes são as catequinas e os seus polímeros. Nas peles de uva, os compostos fenólicos perfazem cerca de 3% da massa de resíduo, em base seca, sendo que a maioria dos compostos fenólicos presentes é do tipo flavonóides (Teixeira, et al., 2014; Negro, et al., 2003; Shi, et al., 2003).

Os compostos fenólicos podem também dividir-se quanto à sua solubilidade. Os fenóis solúveis são aqueles que estão presentes nos vacúolos celulares do resíduo, sendo facilmente extratáveis, enquanto que compostos fenólicos insolúveis são aqueles que fazem parte da estrutura das paredes celulares, como é o caso da lenhina (polímero de compostos fenólicos) ou os compostos que se encontram ligados por pontes de hidrogénio aos polissacarídeos da parede celular (Naczki & Shahidi, 2004; Pinelo, et al., 2006).

No entanto, durante o processo de vinificação, os compostos fenólicos presentes nos constituintes sólidos da uva são apenas parcialmente extraídos para o vinho. Este facto é devido ao baixo tempo de contacto e de maceração com o mosto ou mesmo devido à ocorrência da fermentação na ausência dos constituintes sólidos (caso da produção de vinho branco). Estima-se que o bagaço de uva resultante permaneça ainda com cerca de 70% do teor original de fenóis presentes na uva, e por este motivo, há um aumento da resistência à biodegradabilidade do resíduo pelo que é um fator impeditivo da sua deposição no meio ambiente (González-Manzano, et al., 2004; Kalli, et al., 2018; Porto & Natolino, 2018).

2.2.2 Propriedades e aplicações dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários produzidos pelas plantas e que podem atingir concentrações com relevo para valorização industrial. Como tal, ao longo das últimas décadas têm sido investigadas as propriedades e efeitos potenciais deste compostos na saúde humana e animal, tentando obter-se novas aplicações para os compostos fenólicos, valorizando deste modo os resíduos da indústria vinícola (Kalli, et al., 2018; Teixeira, et al., 2014).

Neste âmbito, têm sido atribuídos aos polifenóis alguns efeitos biológicos importantes como é o caso do efeito antioxidante, evitando a degradação de lipoproteínas de baixa densidade (Leopoldini, et al., 2011). Os compostos fenólicos exercem o seu poder antioxidante através de diferentes mecanismos, como a eliminação de radicais livres, doação de hidrogénio, formação de quelatos com iões metálicos ou atuando como substrato para ataques de superóxidos (Lafka, et al., 2007). Esta característica dos polifenóis permite que estes sejam usados como substitutos de antioxidantes sintéticos, que em doses elevadas apresentam toxicidade, sendo potenciais

agentes carcinogénicos (Jayaprakasha, et al., 2001). Os efeitos antioxidantes dos polifenóis apresentam ainda a capacidade de prevenção de problemas cardíacos. Segundo a Organização Mundial de Saúde, os problemas cardíacos são a maior causa de morte no mundo, sendo que este tipo de doença engloba vários tipos de patologias, como aterosclerose, arteriosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca, arritmias e enfarte do miocárdio, entre outras (Organization, 2018; Bagchi, et al., 2003). Alguns fatores de risco associados a estas doenças são a idade, o colesterol, a diabetes, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, a agregação de plaquetas ou uma resposta inflamatória no organismo. Por possuírem uma ação contra alguns destes fatores de risco, os compostos fenólicos revelam-se muito eficazes na prevenção deste tipo de problemas (Lutz, et al., 2019). Para além destes aspetos, o consumo de extratos ricos em polifenóis tem vindo a ser prescrito pela comunidade médica como suplemento dietético e complemento de outros medicamentos (Kalli, et al., 2018). Os polifenóis apresentam também um efeito antimicrobiano muito importante, uma vez que interagem com microrganismos como bactérias alimentares, bactérias patogénicas, vírus, fungos, parasitas e toxinas (Kalli, et al., 2018). Como consequência, os polifenóis têm vindo a ser incorporados como suplementos em produtos alimentares, como lacticínios, sumos e carne, incrementando o seu valor nutricional e o seu tempo de prateleira, uma vez que a sua presença previne ou atrasa a sua deterioração (Tseng & Zhao, 2013; Kalli, et al., 2018). Um outro efeito estudado dos polifenóis é a sua atuação contra a formação de compostos químicos potencialmente perigosos e cancerígenos, como a acrilamida, formada como produto de reação durante o processamento de alguns alimentos, uma vez que a aplicação de polifenóis bloqueia a reação que produz acrilamida, reduzindo substancialmente a sua presença nos alimentos (Xu, et al., 2015). Os compostos fenólicos exibem também atividade anti tumoral significativa, comprovada em ensaios *in vitro*, *in vivo* e em humanos (Dai & Mumper, 2010). A aplicação de compostos fenólicos tem efeito anticancerígeno, tanto minimizando o risco de surgimento do carcinoma como controlando a proliferação e o crescimento das células tumorais (Dai & Mumper, 2010). Os compostos fenólicos podem também ser aplicados na indústria de produção de cosméticos uma vez que possuem efeitos antienvhecimento. O envelhecimento da pele ocorre por ação da radiação UV, que induz a produção de espécies de oxigénio reativo na pele. Devido ao seu poder antioxidante, os compostos fenólicos atuam eliminando as espécies de oxigénio reativo, bloqueando as reações que levam ao envelhecimento da pele (Wittenauer, et al., 2015). Os compostos fenólicos contribuem significativamente para a cor dos alimentos onde se encontram presentes, principalmente, devido à presença de antocianinas. Deste modo, os compostos fenólicos podem ser inseridos em alimentos como corantes alimentares de origem natural (Lapornik, et al., 2005).

Devido à sua vasta gama de aplicações e propriedades bioativas, os compostos fenólicos são considerados produtos com alto valor acrescentado, e aliado aos problemas ambientais causados pela deposição do bagaço de uva sem tratamento na natureza, considera-se muito relevante o isolamento e a recuperação destes compostos (Bonilla, et al., 1998).

2.3 Recuperação de compostos fenólicos por processos de extração

Uma das formas mais comuns de valorizar o bagaço de uva e os compostos fenólicos nele presentes passa pelo isolamento destes compostos. O isolamento dos compostos fenólicos, de um modo geral pode atingir-se numa ou mais etapas de extração, em que os fenóis solúveis presentes nos organelos celulares do bagaço são removidos para uma outra fase. A extração é, então, a etapa mais importante no que diz respeito à recuperação destes compostos, podendo ser seguida do seu isolamento e purificação, de modo a serem posteriormente inseridos/convertidos em outros produtos (Kalli, et al., 2018; Hogervorst, et al., 2017).

As técnicas de extração mais usadas são a extração sólido-líquido e a extração Soxhlet, em que a fase sólida é extraída com um solvente (geralmente orgânico). Estas técnicas requerem elevados tempos e grandes quantidades de solvente, pelo que se forem aplicadas a nível industrial, representa custos elevados de operação (Kalli, et al., 2018). No entanto, são também os tipos de extração mais simples em termos processuais e cujos equipamentos necessários são mais acessíveis, tanto na escala laboratorial como na escala industrial (Kalli, et al., 2018; Wang & Weller, 2006).

Recentemente, têm sido desenvolvidas outras técnicas mais “verdes”, que permitem diminuir os tempos de extração, os consumos de solvente ou mesmo evitar a utilização de solventes orgânicos, obtendo-se simultaneamente maiores recuperações de compostos fenólicos. São exemplos disso a extração recorrendo a fluidos supercríticos, como dióxido de carbono supercrítico, a extração assistida por ultrassons, por micro-ondas ou por pulsos elétricos e a extração com água subcrítica (Barba, et al., 2016). No entanto, devido aos requisitos de equipamentos ou pela complexidade dos processos e das condições de operação (pressões elevadas), estas técnicas nem sempre são possíveis de operar à escala industrial (Fontana, et al., 2013; Barba, et al., 2016).

2.3.1 Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido é uma das técnicas de extração mais usadas para recuperação de compostos fenólicos. Nesta técnica, a matriz sólida onde se encontram os analitos em estudo é colocada em contacto com um determinado solvente, geralmente, uma mistura de água e um

álcool, a uma temperatura controlada, durante um tempo de contacto pré-definido (Fontana, et al., 2013). Geralmente, a extração sólido-líquido ocorre sob agitação mecânica, que à escala laboratorial pode ser do tipo agitação magnética (*stirring*) ou agitação num banho agitado (*shaking*) (Fontana, et al., 2013).

A extração sólido-líquido é essencialmente um processo de transferência de massa em que os compostos solúveis migram da matriz sólida para o solvente, com o qual apresentam afinidade. Este processo engloba quatro etapas dominantes:

1. Difusão do solvente até ao interior das partículas da matriz sólida;
2. Dissolução dos compostos solúveis no solvente, dentro da partícula;
3. Difusão dos solutos até à superfície da partícula;
4. Lavagem do solvente concentrado da superfície da partícula para o seio do líquido.

No processo de extração de compostos ativos em resíduos vegetais, a difusão dos solutos até ao exterior da partícula sólida é a etapa limitante, que pode ser descrita pela segunda lei de Fick para a difusão, Eq. (2.1):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2.1)$$

em que C representa a concentração do soluto (g/L), D o coeficiente de difusão do mesmo (m^2/s) e x o diâmetro da partícula (m) (Gertenbach, 2002). Tendo em consideração uma geometria esférica para o sistema da partícula, é definida a condição inicial Eq. (2.2) e as condições fronteira (Eq. (2.3) e (2.4)):

$$C = C_0, \quad t = 0, \quad \forall x \quad (2.2)$$

$$C = C_p = 0, \quad t > 0, \quad x = R \quad (2.3)$$

$$\frac{\partial C}{\partial x} = 0, \quad t > 0, \quad x = 0 \quad (2.4)$$

em que C_0 é a concentração inicial do analito na partícula (g/L) (Chan, et al., 2014).

Deste modo, este processo vai ser significativamente limitado pelos coeficientes de difusão dos compostos fenólicos no solvente e também pelos gradientes de concentração existentes, pelo que estas variáveis devem ser manipuladas de modo a maximizar a recuperação destes compostos (Corrales, et al., 2009). O grau de polimerização dos polifenóis é um fator importante na solubilidade destes compostos no solvente (Nacz & Shahidi, 2004). A capacidade de extração de compostos fenólicos neste processo é ainda dependente da

coeficiente de partição, K , entre a concentração de soluto no solvente (g/L), C_s , e a concentração do soluto na matriz sólida (g/L), C_p , Eq. (2.5) (Gertenbach, 2002):

$$K = \frac{C_s}{C_p} \quad (2.5)$$

A extração sólido-líquido não é uma técnica específica para a recuperação de fenóis, sendo extraídos juntamente com os compostos fenólicos outros componentes como açúcares, proteínas ou gorduras que possam ser solubilizados na fase líquida. De acordo com Amendola *et al.* (2010), uma secagem parcial do extrato (12.5 % de humidade) obtido por extração de bagaço de vinho tinto utilizando etanol a 60% resultou num extrato com um teor de compostos inorgânicos igual a 6,7%, 2,8% de gorduras e 1,5 % de azoto (que estará correlacionado com a presença de proteínas no extrato).

2.3.2 Parâmetros de operação para a extração

A extração sólido-líquido é um processo complexo que é afetado por diversas variáveis, entre as quais o tempo de contacto entre o sólido e o solvente, a razão entre a quantidade de líquido e a quantidade de sólido (razão L/S), o tipo de solvente e a sua concentração e a temperatura de operação, que serão abordadas ao longo deste trabalho (Fontana, et al., 2013; Gertenbach, 2002). Para além destas variáveis, outras também apresentam impacto significativo na recuperação de compostos fenólicos, apesar de não serem otimizadas neste trabalho. Entre elas, encontram-se o pH do meio de extração, a granulometria das partículas, o tipo de agitação, o tipo de sistema de extração, a pressão de operação, a biomassa utilizada, o seu pré-tratamento e a presença de compostos interferentes no resíduo (Teixeira, et al., 2014; Drousou, et al., 2015; Corrales, et al., 2009; Fontana, et al., 2013).

3 Estado da arte

3.1 Caracterização do resíduo

De modo a valorizar o bagaço de uva, vários autores têm conduzido experiências com o objetivo de estudar a eficiência dos tratamentos abordados na secção 2.1. Um dos primeiros passos desses estudos consiste na caracterização detalhada do resíduo.

O termo bagaço pode referir-se tanto à mistura das peles e sementes, como também ao conjunto de todos os resíduos sólidos produzidos durante o processo de vinificação, englobando também os engaços e as polpas das uvas (Nerantzis & Tataridis, 2006). Uma vez que o bagaço pode ter origem em castas de uvas diferentes e é uma mistura dos diversos componentes sólidos da uva, podendo a proporção destas partes ser variável, o resíduo acaba por ser bastante heterogéneo, de modo a que as suas características são igualmente variáveis.

Na Tabela 3.1 encontram-se compilados os valores reportados na literatura para os parâmetros mais estudados quanto à caracterização do resíduo e das várias partes que o constituem. Para cada parâmetro, apresenta-se a média e, entre parênteses, os valores máximos e mínimos reportados.

Da análise da Tabela 3.1 é possível antever algumas das propriedades do resíduo em estudo. Um dos parâmetros com maior variabilidade é o teor de sólidos totais, que é afetado pela forma como o resíduo foi produzido e é condicionado antes dos processos de caracterização. A percentagem de sólidos voláteis apresenta uma gama de variação mais apertada, sendo o seu valor bastante elevado (geralmente acima de 90 %). A quantificação da matéria orgânica do resíduo em termos de COD apresenta valores entre 1343 e 1405 mg O₂/g TS, o que é um valor elevado. Este valor é inferior ao reportado para as sementes, o que pode significar que este é o elemento do bagaço que mais contribui para este parâmetro. O pH do resíduo apresenta valores acídicos, sendo os engaços o componente que mais contribui para a variabilidade deste parâmetro. O valor da condutividade elétrica reportado é de cerca de 2,58 mS/cm, apresentado uma gama de variação semelhante à dos engaços. A composição elementar indica que o carbono é o elemento mais abundante, seguido pelo oxigénio e pelo hidrogénio. A composição elementar reportada indica valores muito semelhantes para o bagaço e para os seus diferentes constituintes. O teor de azoto total e o teor de azoto Kjeldahl (TKN) (orgânico e amoniacal), para o resíduo e os seus constituintes apresentam valores muito semelhantes, sendo que por vezes o valor de TKN pode ultrapassar o teor de azoto total. Este facto pode resultar da grande variabilidade do resíduo e da falta de rigor dos métodos analíticos. A análise da biomassa lenhocelulósica revela que a lenhina é o polímero mais abundante do resíduo, seguido pela

celulose e por fim, por hemiceluloses. No caso dos engaços, a lenhina surge em menor quantidade que no resíduo e a celulose é o polímero menos abundante.

Tabela 3.1 – Gammas de valores reportados para os parâmetros selecionados para a caracterização do resíduo.

Parâmetro	Engaços (1)	Sementes (2)	Peles (3)	Bagaço (4)
pH	4,58 (3,8 - 6,1)	4,6	-	4,04 (3,4 - 5,4)
EC (mS/cm ²)	4,54 (3,1 - 6,1)	-	-	2,58 (1,3 - 5,4)
TS (%)	51,7 (31,1 - 92,9)	51,4 - 65,2	39,1	44,46 (26,4 - 95,5)
VS (%TS)	91,78 (87,9 - 93,9)	93,6 - 96,6	89,4	92,41 (77,1 - 98,8)
COD (mg O ₂ /g TS)	-	1595,1 ± 61,3	-	1374,6 (1343,6 - 1405,5)
Composição elementar (%TS)	C: 48,2 H: 5,8 O: 37,6 N: 1,45 (1,0 - 1,7)	C: 55,4; H: 7,0 O: 28,7 N: 2,5	C: 49,82 H: 6,06 O: 31,33 N: 2,08	C: 49,68 (41,2 - 54,9) H: 6,13 (5,7 - 9,3) O: 38,17 (34,2 - 45,5) N: 1,95 (0,5 - 2,6)
TKN (mg N/g TS)	19,9	21,9 ± 0,2	-	13,7 (6,9 - 23,0)
LG insolúvel (%TS)	-	-	-	21,5 (10,5 - 32,5)
LG solúvel (%TS)	23,3	-	-	23,9
LG (%TS)	32,35 ± 0,31	-	-	41,47 (31,9 - 51,6)
CL (%TS)	17,85 (12,2 - 23,5)	-	-	19,38 (10,5 - 33,0)
HM (%TS)	20,8 (15,9 - 25,7)	-	-	11,74 (6,1 - 21,0)

EC – Condutividade elétrica; TS – Sólidos totais; VS – Sólidos voláteis; COD – Carência química de oxigênio; TKN – Azoto Kjeldahl total; LG – Lenhina; CL – Celulose; HM – Hemiceluloses;

Referências

- (1) Engaços: (Dinuccio, et al., 2010; Toscano, et al., 2013; Bustamante, et al., 2008; Amendola, et al., 2012)
 (2) Sementes: (Achkar, et al., 2016; Toscano, et al., 2013)
 (3) Peles: (Toscano, et al., 2013)
 (4) Bagaço: (Pedras, et al., 2020; Corbin, et al., 2015; Zhihui, et al., 2008; Achkar, et al., 2018; Achkar, et al., 2016; Dinuccio, et al., 2010; Toscano, et al., 2013; Gómez-Brandón, et al., 2019; Bustamante, et al., 2008; Gowman, et al., 2019) (Domínguez, et al., 2016; Baumgärtel, et al., 2007; Ciuta, et al., 2011; Lafka, et al., 2007; Muhlack, et al., 2018)

3.2 Metodologias de extração

Com o objetivo de recuperar os compostos fenólicos abundantes no bagaço de uva, vários autores têm vindo a otimizar o processo de extração sólido-líquido para o bagaço ou para as várias frações que o constituem, manipulando as variáveis descritas na secção 2.3.2.

Na Tabela 3.2, encontram-se resumidos os valores ou gammas de valores das variáveis do processo de extração. Os solventes utilizados variam entre água e misturas aquosas com diversos solventes orgânicos, como etanol (EtOH), metanol (MeOH) e acetona (Ac).

Tabela 3.2 – Valores reportados para os diferentes parâmetros de operação durante a extração e para o teor de compostos fenólicos recuperados.

Biomassa	t (h)	T (°C)	Solvente	L/S	pH	TPh (mg GAE/g TS)	Referência
Sementes	2	45	EtOH 70%	50	-	25,3 ± 0,6	(Li, et al., 2008)
Sementes	2	45	Ac 70%	50	-	29,8 ± 0,4	(Li, et al., 2008)
Sementes	2	45	MeOH 100%	50	-	20,2 ± 0,7	(Li, et al., 2008)
Sementes	2	45	Água	50	-	7,5 ± 0,2	(Li, et al., 2008)
Engaços	1-5	22	EtOH 40-60%	20	2 - 6	85,29 - 129,6 56,4 - 93,44 84,04 - 115,65	(Karvela, et al., 2009)
Bagaço	0,5-1,5	25-50	MeOH 100%	1 - 5	-	0,41-1,63	(Pinelo, et al., 2005)
Bagaço	0,5-1,5	25-50	EtOH 96%	1 - 5	-	0,25 - 1,28	(Pinelo, et al., 2005)
Bagaço	0,5-1,5	25-50	Água	1 - 5	-	0,16 - 0,93	(Pinelo, et al., 2005)
Bagaço	2	60	Água	20	-	~ 6	(Vatai, et al., 2009)
Bagaço	2	60	Ac 50-100%	20	-	3 - 20	(Vatai, et al., 2009)
Bagaço	2	60	EtOH 50-100%	20	-	10 - 18	(Vatai, et al., 2009)
Bagaço	5 min - 5 h	60	EtOH 60%	4	-	16 - 32	(Amendola, et al., 2010)
Bagaço	1	60	EtOH 5-95 %	10 - 90	a	4,36 - 22,61	(Sant'Anna, et al., 2012)
Bagaço	0,25-0,75	40-60	EtOH Ac	12,5	-	17,91 - 35,10	(Casagrande, et al., 2019)
Bagaço	6 - 24	T amb	EtOH 40 – 90%	10 a 50	-	7,89 - 23,36	(Porto & Natolino, 2018)
Sementes	0,75	T amb	EtOH 0-100%	10	-	5 - 28	(Yilmaz & Toledo, 2006)
Sementes	0,75	T amb	MeOH 0-100%	10	-	8 - 30	(Yilmaz & Toledo, 2006)
Sementes	0,75	T amb	Ac 0-100%	10	-	8 - 40	(Yilmaz & Toledo, 2006)
Bagaço	-	-	EtOH 80%	30	b	41,9 ± 0,4	(Negro, et al., 2003)
Sementes	-	-	EtOH 80%	30	b	85,8 ± 0,3	(Negro, et al., 2003)
Peles	-	-	EtOH 80%	30	b	33,3 ± 0,3	(Negro, et al., 2003)
Sementes	2	25-80	EtOH 50%	10 - 40	-	19 - 31	(Bucić-Kojić, et al., 2007)
Bagaço	1	4	MeOH 100%	50	c	74,75 ± 2,22 46,23 ± 1,63 63,31 ± 2,40 32,62 ± 0,68	(Rockenbach, et al., 2011)
Bagaço	24	25	EtOH 40%	50	-	28; 31; 42; 25	(Ribeiro, et al., 2015)

t (h); T (°C); Concentração de solvente (% (v/v)); L/S (mL solvente / g resíduo); TPh (mg GAE/g TS)

a – acidificado com 1,2 mM de HCl

b – acidificado com 0,5%, 0,1 N HCl

c – acidificado com 01% HCl

A análise da Tabela 3.2 permite identificar as melhores condições para a operação da extração sólido-líquido, que para os vários parâmetros em estudo neste trabalho se encontram resumidos abaixo.

Tempo de contacto

Quando a extração ocorre em regime descontínuo, o tempo de contacto é uma variável muito importante uma vez que a libertação de compostos fenólicos da matriz ocorre de forma gradual e à medida que o tempo avança, a sua concentração no extrato (solução dos compostos fenólicos dissolvidos no solvente em operação) aumenta. Apesar de o teor de fenóis extraído aumentar com o tempo de operação, prolongar excessivamente o contacto entre o sólido e o líquido pode levar à oxidação dos compostos fenólicos, o que se traduz numa perda da sua atividade antioxidante (Naczka & Shahidi, 2004). Este efeito é indesejável, uma vez que o objetivo da recuperação destes compostos é tirar partido das propriedades antioxidantes dos polifenóis.

Por outro lado, apesar do tempo de contacto promover a recuperação de compostos fenólicos, a cinética de extração é relativamente rápida, sendo geralmente suficientes tempos de extração entre uma hora e uma hora e meia para que se atinja um patamar de equilíbrio, usando misturas de água e álcoois (Bucić-Kojić, et al., 2007). Alguns autores referem ainda que no caso de se usar apenas água como solvente, prolongar o tempo de extração acima de meia hora não resultará num incremento do teor de fenóis recuperados (Pinelo, et al., 2005).

É ainda importante referir que se for aplicado o processo de extração sólido-líquido a uma escala industrial, não é economicamente rentável prolongar o tempo de operação excessivamente para recuperar uma quantidade de fenóis apenas ligeiramente superior, uma vez que se traduz em custos acrescidos (tanto custos associados à agitação mecânica como à manutenção da temperatura de operação).

Solvente

O solvente é um dos fatores que mais influencia a eficiência da extração sólido-líquido porque a solubilidade dos compostos fenólicos é dependente do meio usado para extração (Augustin-Salazar, et al., 2014). Devido à sua natureza polar, os compostos fenólicos são solúveis em meios próticos polares, como soluções de álcoois e água (Spigno, et al., 2007). Deste modo, os solventes mais estudados para o processo de recuperação de fenóis são água, etanol, metanol e também a acetona, sendo testadas misturas em diversas proporções destes solventes. Para além destes solventes, também têm sido usados solventes menos polares, como

acetato de etilo, para recuperar outros compostos que não sejam solúveis nos solventes acima indicados (Fontana, et al., 2013; Spigno, et al., 2007).

As misturas de água com álcoois ou acetona apresentam desempenhos na extração de fenóis muito superiores à utilização de cada um dos solventes individualmente. Este fenómeno é explicado por um efeito sinérgico causado pela utilização dos dois solventes em conjunto. Por um lado, o solvente orgânico terá maior afinidade para extrair compostos fenólicos do que a água, enquanto que a presença de água, em simultâneo com o solvente, aumentará a permeabilidade das células do resíduo, uma vez que impregna a matriz sólida, permitindo uma melhor difusão do álcool ou acetona até ao interior das células (Fontana, et al., 2013; Spigno, et al., 2007). A nível laboratorial, as misturas de solvente com melhor desempenho na extração de fenóis em resíduo vinícola apresentam aproximadamente 50% de água e 50% do solvente orgânico (Porto & Natolino, 2018; Shi, et al., 2003; Yilmaz & Toledo, 2006). No entanto, Spigno, *et al* (2007) sugerem que o teor de fenóis extraídos aumenta até uma concentração de 30% de água e diminui se for superior a 50%. Neste estudo, os autores identificaram o teor de fenóis extraídos com diferentes misturas de solventes em várias proporções a par da atividade antioxidante dos extratos obtidos. Uma vez que não houve aumento do poder antioxidante acima de 30% de água, os autores deduziram que apenas varia a quantidade de compostos extraídos. Para além disso, refere-se ainda que o aumento da percentagem de água favorece também a extração de compostos não fenólicos, diminuindo a concentração destes nos extratos (Spigno, et al., 2007; Kalli, et al., 2018). Outros estudos indicam ainda que para misturas de metanol e água, a proporção ótima é de 70% em metanol, enquanto que para o sistema etanol/água, a proporção ótima é de 60% de etanol (Augustin-Salazar, et al., 2014).

A recuperação de compostos fenólicos é muito dependente do solvente selecionado para a operação, uma vez que diferentes solventes orgânicos apresentam diferentes afinidades para cada uma das classes de polifenóis existentes (Kallithraka, et al., 1995). Comparando entre metanol a 50%, etanol a 50% e acetona a 50%, a solução de acetona é o solvente que apresenta geralmente melhor desempenho na extração de fenóis, seguindo-se o metanol e por fim o etanol (Yilmaz & Toledo, 2006; Pinelo, et al., 2005). No entanto, quando se pretende utilizar os extratos como suplementos e aditivos alimentares, a utilização de misturas de etanol é preferível uma vez que este solvente é reconhecido como seguro para aplicações alimentares, para além de ser, de entre estes três solventes orgânicos, o mais barato (Fontana, et al., 2013).

Temperatura

A temperatura é um parâmetro de operação extremamente importante no processo de extração sólido-líquido, uma vez que, em geral, a solubilidade dos compostos fenólicos é

favorecida pelo aumento da temperatura (Spigno, et al., 2007) O efeito da temperatura é também muito relevante no processo de transferência dos compostos fenólicos desde o interior até ao exterior da partícula, uma vez que o coeficiente de difusão é proporcional ao aumento de temperatura (Cacace & Mazza, 2003).

Apesar de apresentar um efeito positivo na extração de compostos fenólicos, há que ter em atenção que temperaturas elevadas podem levar à degradação destes mesmos compostos e à redução do seu poder antioxidante nos extratos. Deste modo, têm sido citadas temperaturas de operação entre a temperatura ambiente e 60 °C (Pinelo, et al., 2005; Fontana, et al., 2013; Spigno, et al., 2007). No entanto, a temperatura de extração é também limitada pela temperatura de ebulição do solvente utilizado, uma vez que a extração decorre na fase líquida (Gertenbach, 2002).

A temperatura de operação selecionada para o processo de extração (a nível industrial) deve resultar de um compromisso entre a quantidade de fenóis recuperada, a atividade antioxidante do extrato obtido e os custos de operação, uma vez que temperaturas mais elevadas acrescem os custos necessários com aquecimento do solvente e do meio de operação.

Razão L/S

A razão entre o volume de líquido e a quantidade de sólido durante o processo de extração é uma variável que afeta o gradiente de concentração dos compostos fenólicos $\left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}\right)$ (Gertenbach, 2002). Utilizando razões L/S mais elevadas, a concentração dos compostos fenólicos na superfície das partículas será menor, o que favorece a velocidade de difusão do soluto até ao exterior. Para além deste aspeto, aumentando a razão L/S, a concentração de fenóis no extrato diminuirá, o que permite que uma maior quantidade de compostos seja solubilizada até se atingir o equilíbrio (Gertenbach, 2002).

À semelhança da temperatura, é necessário optar por um compromisso para a seleção da razão L/S, uma vez que maiores razões L/S envolvem maiores quantidades de solvente, o que se traduz em maiores custos de operação, e equipamentos de maiores dimensões, que se reverte em maiores custos de investimento. Para além disso, maiores razões L/S implicam uma maior complexidade de processamento dos extratos obtidos, no que toca a remoção e recuperação do solvente (Gertenbach, 2002).

A nível laboratorial, as razões L/S mais utilizadas para a recuperação de fenóis a partir de bagaço de uva variam entre 4 e 50 mL/g, sendo 10 mL/g o valor mais utilizado (Kammerer, et al., 2004; Mildner-Szkudlarz, et al., 2010; Pinelo, et al., 2005; Yilmaz & Toledo, 2006; Negro, et al., 2003; Rockenbach, et al., 2011).

pH do solvente

O pH do solvente é uma das variáveis estudadas durante o processo de extração sólido-líquido, sendo geralmente considerado o efeito da acidificação do solvente. A utilização de condições ácidas no processo de extração pode estar relacionada com os equilíbrios de dissociação do ácido gálico, que apresenta um pKa para a desprotonação do grupo funcional ácido carboxílico igual a 4,44 (Mera, et al., 2016). Librán *et al* (2013) estudaram o efeito simultâneo do pH e da concentração de etanol em misturas de etanol e água, para a extração de compostos fenólicos presentes no bagaço de uva onde foram testados cinco níveis de concentração de etanol (entre 0 e 100% (v/v)) e 4 níveis de pH (entre 2 e 12). Os autores concluíram que para o caso da água ou de etanol a 25%, a extração é favorecida no nível de pH mais elevado (12). No entanto, a tendência reverte-se se forem usados solventes mais concentrados em etanol, onde valores de pH mais baixos favorecem a extração de polifenóis (Librán, et al., 2013). Num outro estudo conduzido por Vatai *et al* (2009), a acidificação do solvente com ácido clorídrico até pH 1 levou a que a quantidade de compostos fenólicos no extrato triplicasse. A acidificação do solvente permite ainda preservar a estabilidade dos extratos obtidos (Amendola, et al., 2010). Outros estudos citam que a acidificação dos solventes pode ser feita adicionando entre 0,1 e 1 % de ácido clorídrico (Fontana, et al., 2013).

Dimensão das partículas

A dimensão das partículas interfere diretamente no processo de difusão dos solutos até à superfície, uma vez que, quanto menor for a dimensão da partícula, maior será o gradiente de concentração, o que potenciará a velocidade da extração (Gertenbach, 2002; Cacace & Mazza, 2003). Deste modo, a utilização de menores granulometrias afetará positivamente o tempo de operação, na medida em que é possível obter as mesmas recuperações de compostos fenólicos (ou superiores) em tempos de operação mais curtos, o que se traduz em menores custos de operação. Bucic-Kojic *et al* (2007) estudaram o efeito da cinética e da dimensão das partículas na recuperação de polifenóis a partir de sementes de uva e concluíram que para dimensões entre 0,125 e 0,16 mm, a cinética foi mais rápida e a recuperação de fenóis triplicou face às amostras com dimensão superior a 0,63 mm. Para além deste aspeto, a redução do tamanho das partículas leva a um aumento da área superficial da matriz sólida, o que promove a transferência de massa (Spigno, et al., 2007).

4 Materiais e métodos

A amostra de resíduo sólido proveniente da indústria vinícola continha engaços, sementes e peles de uva, e por isso, pode ser referido como bagaço. As amostras foram cedidas por um produtor local da região centro de Portugal, produzidas na colheita do ano de 2019. Os ensaios de caracterização do resíduo e de avaliação das condições operatórias no processo de extração foram conduzidos em triplicado. Os ensaios realizados no âmbito do desenho de experiências e da validação dos modelos de regressão obtidos foram conduzidos em duplicado.

4.1 Amostragem e armazenamento das amostras

Após a receção do resíduo, este foi seco a 40 °C até massa constante, triturado através de um moinho (Retsch, modelo 5657), de modo a obter uma granulometria inferior a 1 mm e acondicionado, de modo a preservar as suas propriedades e evitar a sua degradação. As Figuras 4.1 (a) e (b) mostram o resíduo sólido antes e após os processos de secagem e moagem, respetivamente.

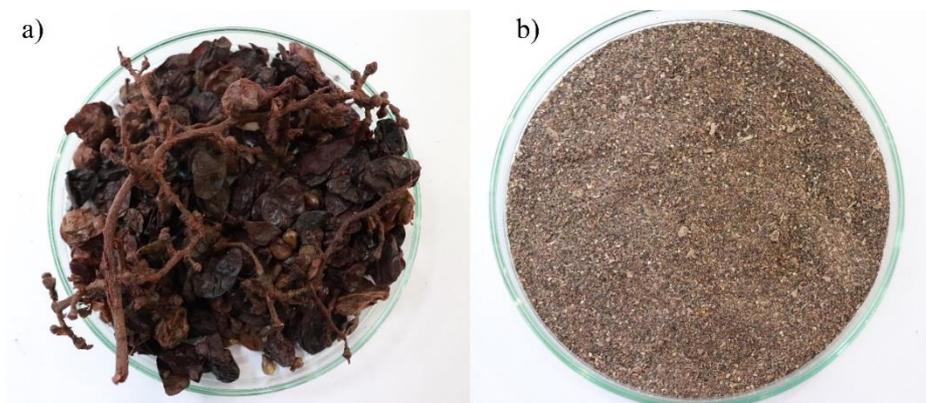


Figura 4.1 – Resíduo (a) tal qual: (b) após secagem e moagem.

4.2 Caracterização

4.2.1 Humidade, sólidos totais e sólidos voláteis

Os sólidos totais (TS) foram determinados durante o processo de preparação das amostras, na fase de secagem, descrita na secção 4.1. A temperatura de secagem foi mantida a 40 °C para evitar a degradação dos compostos termolábeis do bagaço de uva, sendo o processo de secagem prolongado até o resíduo ter peso constante para garantir a evaporação de água a

uma velocidade de secagem mais lenta. A percentagem de sólidos totais pode ser calculada de acordo com a Eq. (4.1)

$$TS(\%) = \frac{m_{amostra\ recebida} - m_{amostra\ seca}}{m_{amostra\ recebida}} \times 100\% \quad (4.1)$$

em que $m_{amostra\ recebida}$ representa a massa da amostra antes do processo de secagem e $m_{amostra\ seca}$ a massa de amostra após a secagem.

A partir da percentagem de sólidos totais calculada, é possível calcular também o teor de humidade do resíduo, por diferença de massa, sendo esse valor complementar ao teor de sólidos totais: $Humidade (\%) = 100 - TS (\%)$.

Os sólidos voláteis (VS) foram determinados calcinando uma amostra de resíduo previamente seco. Nesta etapa, as amostras de resíduo foram colocadas em cadinhos e levados a uma mufla, a 550 °C. Para evitar a combustão viva dos sólidos, a temperatura da mufla foi aumentada de forma gradual. Após o período de aquecimento gradual da amostra, esta permaneceu a 550 °C durante 2 h. A percentagem de sólidos voláteis pode ser calculada recorrendo à Eq. (4.2)

$$VS(\%) = \frac{m_{amostra\ seca} - m_{amostra\ calcinada}}{m_{amostra\ seca}} \times 100\% \quad (4.2)$$

em que $m_{amostra\ calcinada}$ corresponde à massa de amostra após a calcinação a 550 °C (g).

4.2.2 pH e condutividade elétrica

O pH e a condutividade elétrica (EC) da amostra foram medidos usando um sensor multivariável Consort, modelo C1020. A calibração do eletrodo de pH foi feita com duas soluções padrão, para pH igual a 4 e pH igual a 7 (HI 7004 e HI 7007, Hanna Instruments). A calibração do eletrodo de condutividade foi feita com uma solução padrão de KCl a 0,1 M.

Para efetuar estas medições, a amostra de resíduo sólida foi posta em contacto com água, numa razão de 1:10, ou seja, 1 g de resíduo sólido seco para 10 mL de água. A mistura foi agitada durante 2 h num agitador orbital. Após este passo, o sobrenadante foi filtrado e o pH e a condutividade foram medidas.

4.2.3 Carência química de oxigênio

A carência química de oxigênio (COD) foi determinada de acordo com os métodos *standard* da APHA (APHA 1992). As amostras a testar foram compostas por:

- 3 mg de resíduo sólido seco;
- 197 mg de água destilada;
- 1,8 mL de solução de digestão;
- 1,8 mL de solução ácida.

Para a preparação de 1 L de solução de digestão, utilizou-se 24 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), adquirido à Merk, com um grau de pureza de 99,9%, 60 g de sulfato de mercúrio (II) ($HgSO_4$), adquirido a Carlo Erba Reagents, e 300 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4), adquirido à Scharlau, com um grau de pureza entre 95 e 98%, perfazendo-se com água destilada. A solução ácida foi preparada com 90,4% w/v de ácido sulfúrico e 9,6% w/v de sulfato de prata (Ag_2SO_4), adquirido a Carlo Erba Reagents.

Depois de preparadas, as amostras foram colocadas durante 2 h num termorreator, a 150 °C. Após o período de reação, as amostras foram agitadas e colocadas em ambiente escuro durante 1 h, até atingirem a temperatura ambiente.

Decorrido o período de arrefecimento das amostras, foi medida a absorvância das mesmas num fotômetro (Photolab WTW series, photolab S6) a 605 nm. Por último, para o cálculo do CQO ($mg\ O_2\ eq/g\ TS$) utilizou-se a Eq. (4.3)

$$COD = \frac{3,8003 \times (Abs - Abs_0) - 0,5302}{m_{amostra}} \quad (4.3)$$

em que Abs representa o valor de absorvância lido, correspondente à amostra com resíduo, Abs_0 representa a absorvância lida na ausência de amostra, ou seja, o ensaio em branco e $m_{amostra}$ a massa de amostra que foi usada para cada análise (g). Esta equação foi obtida a partir da equação da curva de calibração utilizando como padrão o hidrogenoftalato de potássio, $C_5H_5KO_4$ (KHP), em que 1 mg de KHP corresponde a um valor de COD de 1,176 $mg\ O_2$. A curva de calibração encontra-se detalhada no Anexo A.

4.2.4 Caracterização elementar

A caracterização elementar do resíduo teve como objetivo conhecer as frações mássicas de carbono (C), hidrogênio (H), azoto (N) e enxofre (S) no resíduo. A percentagem de oxigênio (O) foi obtida por diferença, entrando em consideração com o teor de sólidos voláteis. Para a

caracterização elementar foram analisados 2 mg de resíduo num analisador do tipo EA-1108 CHNS-O Element Analyser (Fisons Instruments). Os resultados da análise vêm expressos em base seca de resíduo.

A fórmula empírica do resíduo ($C_aH_bO_cN_d$) foi obtida, dividindo o valor de cada fração elementar pela massa molar do respetivo elemento e dividindo cada um destes valores pelo menor valor resultante (teor de N).

4.2.5 Caracterização química da biomassa lenhocelulósica

As frações de lenhina, celulose e hemiceluloses foram calculadas de acordo com o procedimento descrito pelo National Renewable Energy Laboratory. Para tal, adicionaram-se 3 mL de ácido sulfúrico a 72 % a 300 mg de amostra sólida e a suspensão foi incubada num banho a 30 °C, durante 1h, sendo agitada a cada 5 ou 10 min. Após este período, foram adicionados 84 mL de água desionizada, com o objetivo de reduzir a concentração do ácido até 4 %, levando depois a suspensão diluída a autoclave, durante 1 hora, a 121 °C. Após a autoclavagem, a suspensão foi filtrada e a fração de lenhina insolúvel foi determinada pesando os sólidos remanescentes (após secagem do retido a 105 °C). Assim, a percentagem de lenhina insolúvel pode ser definida através da Eq. (4.4)

$$\%LG \text{ insolúvel} = \frac{m_{\text{lenhina insolúvel}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (4.4)$$

em que $m_{\text{lenhina insolúvel}}$ corresponde à massa de lenhina insolúvel no filtro e m_{amostra} , a massa de amostra inicialmente utilizada para a determinação.

A fração de lenhina solúvel foi determinada lendo a absorvância do filtrado a 205 nm, num espectrofotómetro UV-Vis (Beckman DU 650), usando uma cuvete de quartzo. A percentagem de lenhina solúvel relaciona-se com o valor de absorvância lido pelo equipamento usando a Eq. (4.5)

$$\%LG \text{ solúvel} = \frac{Abs \times FD \times 86,73}{110 \times 1000 \times m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (4.5)$$

em que Abs corresponde à absorvância da amostra, e FD , o fator de diluição, caso seja aplicado.

Os hidratos de carbono foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O filtrado foi neutralizado e filtrado novamente e a solução sobrenadante foi injetada na coluna de HPLC, do tipo Phenomenex Rezex ROA Organic Acid H+ (300 x 7.8 mm), de

modo a quantificar os hidratos de carbono, ácidos orgânicos, álcoois e produtos resultantes da degradação de hidratos de carbono. Para cada um dos monossacarídeos obtidos no cromatograma, a sua percentagem pode ser calculada de acordo com a Eq. (4.6):

$$\% \text{ Monossacarídeo} = \frac{C_{\text{monossacarídeo}} \times 0,8673}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (4.6)$$

em que $C_{\text{monossacarídeo}}$ corresponde à concentração do monossacarídeo (mg/L).

Uma vez que estes produtos resultam da degradação por hidrólise da celulose e das hemiceluloses, a fração de cada um destes hidratos de carbono foi calculada multiplicando o teor de hexoses e pentoses por um fator, respetivamente, de acordo com as equações 4.7 e 4.8:

$$\% \text{ Celulose} = 0,9 \times \text{Hexoses} \quad (4.7)$$

$$\% \text{ Hemiceluloses} = 0,88 \times \text{Pentoses} \quad (4.8)$$

4.2.6 Azoto Kjeldahl

A determinação do azoto orgânico e amoniacal foi determinado de acordo com o método de Kjeldahl e compreende três etapas: digestão, destilação e titulação. Na etapa de digestão, 0,5 g de resíduo foram colocadas num tubo de digestão, juntamente com uma pastilha de catalisador de Kjeldahl e 10 mL de solução de ácido sulfúrico a 96 %. Os tubos foram colocados no digestor (DKL Fully Automatic Digestion Units, VELP Scientifica), a 400 °C, com o sistema de exaustão de vapores ativos, durante cerca de 2 h (tempo necessário até surgirem vapores brancos e a amostra ficar transparente). Depois do processo de digestão, as amostras arrefeceram até à temperatura ambiente, durante 1 h. Simultaneamente, foram digeridas as amostras de branco, em que se colocaram 10 mL de água ultrapura em vez da amostra de resíduo.

Para a etapa de destilação, que ocorreu num destilador automático (UDK Distillation Unit, VELP Scientifica), adicionou-se à amostra digerida 100 mL de água desionizada. Foram adicionados no destilador 50 mL de NaOH (40% p/v). Num erlenmeyer para a recolha do destilado foram introduzidos previamente 20 mL de solução de ácido bórico (H_3BO_3 , 2%) com indicadores de pH e operou-se a destilação durante cerca de 8 min, obtendo-se 200 mL de destilado.

A solução de H_3BO_3 foi preparada dissolvendo 100 g de H_3BO_3 em 4 L de água ultrapura. Após o arrefecimento da solução, adicionaram-se 75 mL de indicador verde de

bromocresol a 0,1 % e 30 mL de vermelho de metilo a 0,1 % e fez-se a solução com água ultrapura num balão de 5 L. Os indicadores foram preparados dissolvendo 0,1 g de indicador para um total de 100 mL em etanol.

Os destilados (de amostra e de branco) foram titulados com ácido clorídrico a 0,1 M até ao ponto de viragem de verde para vermelho. O teor de azoto Kjeldahl (TKN) foi depois calculado de acordo com a Eq. (4.9)

$$TKN (mg_N/g_{TS}) = \frac{V_{amostra} - V_{branco}}{m_{amostra}} \cdot 14,01 \cdot 1000 \cdot C_{HCl} \quad (4.9)$$

em que $V_{amostra}$ representa o volume de ácido clorídrico consumido na titulação do destilado da amostra (L), V_{branco} , o volume de ácido clorídrico consumido na titulação do destilado do ensaio branco (L), $m_{amostra}$, a massa de amostra colocada no início da experiência (g) e C_{HCl} , a concentração de ácido clorídrico (M). O termo $14,01 \cdot 1000$ representa a massa molar do azoto (mg/mol).

4.3 Determinação do teor de fenóis

O teor de fenóis dos vários extratos obtidos foi determinado por espectrofotometria UV-Vis, usando um espectrofotómetro do tipo T60 UV/Vis Spectrophotometer. Para a preparação das amostras a analisar, adicionou-se numa cuvete 20 μ L do extrato a analisar e 1580 μ L de água destilada. De seguida, adicionou-se 100 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu (fornecido por Panreac) e agitou-se a solução. Cinco minutos após a adição do reagente de Folin-Ciocalteu, foram adicionados 300 μ L de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e agitou-se novamente a amostra. As cuvetes foram levadas a uma estufa a 40 °C, durante 30 min. Após este período de reação, foi determinada a absorbância das amostras num comprimento de onda de 765 nm. O teor de fenóis normalizado por massa de resíduo seco foi calculado recorrendo à Eq. (4.10):

$$TPh (mg_{GAE}/g_{res}) = \frac{(1574.0286 \times Abs - 4.9337) \times FD \times V_{solvente}}{m_{amostra}} \quad (4.10)$$

em que Abs corresponde à absorbância registada por uma amostra, à qual já está subtraída a absorbância do ensaio branco, FD , o fator de diluição aplicado ao extrato, $V_{solvente}$, o volume de solvente inicialmente utilizado para a extração (L), e $m_{amostra}$, a massa de resíduo usada na extração (g). A equação foi deduzida com base na curva de calibração construída para soluções

padrão de ácido gálico, para uma gama de concentração de ácido gálico entre 25 e 1000 mg/L, que se encontra detalhada no Anexo B.

A solução de carbonato de sódio foi preparada dissolvendo 50 g de Na_2CO_3 em 150 mL de água.

As amostras foram preparadas em triplicado e foram incluídas duas amostras de branco em cada determinação.

4.4 Ensaio às condições de operação de extração

Antes da realização dos ensaios de otimização da extração foram realizados ensaios preliminares de modo a selecionar um solvente para a extração sólido-líquido e conhecer o seu comportamento em diversas condições de operação. Foram inicialmente selecionados cinco solventes, nomeadamente, água, etanol (Carlo Erba Reagents, 99,9 %), acetona (Fisher Chemical, 99,8 %), metanol (Carlo Erba Reagents, 99,9 %) e butanol (Fisher Chemical, 99,5 %). Para cada solvente foram testadas duas concentrações (50 e 100%), de modo a estudar o seu efeito.

A razão sólido-líquido entre substrato e solvente nestes ensaios foi de 10 mL/g, em que 4g de resíduo foram misturadas com 40 mL de solvente em cada experiência. As experiências decorreram em frascos de 80 mL, completamente fechados. A temperatura de operação foi fixada em 50 °C, num banho térmico agitado a 160 rpm (VWR, 18 L Shaking Bath) e com um tempo fixo de extração igual a 1 h. Os solventes utilizados foram previamente colocados no banho, antes do contacto com o sólido, de modo a garantir que estavam à temperatura pretendida no início da extração.

Após cada extração, a mistura foi retirada e foi filtrada, recorrendo a uma bomba de vácuo do tipo Büchi Vac V-500. Do extrato coletado, uma fração foi reservada num frasco, para determinação do teor de fenóis e o restante foi seco numa estufa (Pol-eko Aparatura, SLW 115 STD), a 50 °C, até ocorrer a evaporação completa do solvente. O resíduo sólido retido no filtro foi lavado com água destilada e filtrado novamente para garantir a remoção de solvente e dos compostos nele dissolvidos. Após este passo, o resíduo sólido lavado foi colocado na estufa. Os extratos reservados para determinação do teor de fenóis foram guardados num frigorífico até ao momento da determinação. A Figura 4.2 retrata a fração líquida obtida por filtração da suspensão após o processo de extração.

O rendimento de extração (em termos de sólidos dissolvidos) pode ser calculado segundo a Eq. (4.11):

$$Rend (\%) = \frac{m_{ext}}{V_{ext}} \times L/S \times 100 \quad (4.11)$$

em que $m_{extrato}$ corresponde à massa de extrato após a evaporação completa do solvente (g), $V_{extrato}$, o volume de extrato que foi colocado a secar (mL), e L/S a razão L/S (mL/g).



Figura 4.2 – Filtração da suspensão obtida.

Os solventes com melhor desempenho nas experiências de seleção de solvente, foram selecionados para o estudo da cinética de extração, fixando um solvente, mantendo-se a temperatura de 50 °C e a razão L/S igual a 10 mL/g. Para o estudo cinético, realizaram-se extrações de 15 e 30 min, 1, 2 e 3 h. Os resultados da cinética foram modelados através de um modelo de primeira ordem, Eq. (4.12), e os parâmetros foram estimados através de regressão não linear, utilizando o *software* SigmaPlot,

$$TPh = a \times (1 - e^{-kt}) \quad (4.12)$$

em que o parâmetro a indica a quantidade de polifenóis extraída em equilíbrio (mg GAE/g TS), k é a constante cinética associada à extração (h^{-1}) e t é o tempo de operação (h).

Estudou-se ainda o efeito da temperatura na extração, variando este parâmetro entre 25 e 70 °C e fixando o tempo em 1 h. Realizaram-se ainda experiências para avaliar o efeito do pH, fixando o tempo em 1 h, a temperatura em 50 °C, para valores de pH de cerca de 2, 4,5 e 7. Para cada um destes conjuntos de experiências procedeu-se de modo semelhante ao descrito para o processo de seleção do solvente, desde o aquecimento prévio dos solventes ao acondicionamento dos extratos e resíduos.

4.5 Ensaios de otimização da extração

A otimização de modo a maximizar o conteúdo fenólico extraído foi realizada para dois solventes (etanol e acetona) selecionados após a fase de *screening*. Para a otimização do processo de extração, selecionou-se um desenho de experiências do tipo *Central Composite Design* com os quatro fatores considerados com maior influência na recuperação de compostos fenólicos, nomeadamente a razão L/S, temperatura, tempo e concentração de solvente. Este tipo de desenho de experiências permite obter uma resposta de superfície avaliando os possíveis efeitos de segunda ordem do sistema, de acordo com a Eq. (4.13)

$$TPh = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^4 \gamma_i x_i^2 \quad (4.13)$$

em que x_i e x_j representam os vários fatores selecionados para a otimização, β_0 é o termo independente e os coeficientes β_i , β_{ij} e γ_i são os coeficientes das variáveis do modelo. As experiências de extração não foram realizadas de modo aleatório, mas sim, ordenadas por valor de temperatura, para maximizar a capacidade de utilização do banho agitado. A Tabela 4.1 mostra os níveis testados na otimização com etanol e a Tabela 4.2 na otimização com acetona. As experiências foram planeadas no *software JMP – Statistical Discovery*, e de acordo com o modelo *Central Composite Design*, foram testadas 26 condições experimentais diferentes para cada solvente, em duplicado (52 experiências para cada solvente). As condições experimentais testadas encontram-se presentes nas Tabelas D.7 e D.9 do Anexo D.

Tabela 4.1 – Níveis testados na otimização com etanol.

Variável testada	Nível inferior	Nível central	Nível superior
T (°C)	30	45	60
t (h)	0,5	1	1,5
%Et (%)	20	55	90
L/S (mL/g)	10	20	30

Tabela 4.2 – Níveis testados na otimização com acetona.

Variável testada	Nível inferior	Nível central	Nível superior
T (°C)	30	40	50
t (h)	0,5	1	1,5
%Ac (%)	20	55	90
L/S (mL/g)	10	20	30

As experiências decorreram em copos de 100 mL, devidamente fechados e o volume de solvente foi fixo em 60 mL, variando apenas a massa de modo a cumprir as razões L/S definidas. A velocidade de agitação foi fixada em 120 rpm. As experiências foram realizadas em duplicado e o restante procedimento experimental realizado como o descrito na seção 4.4.

Os resultados obtidos foram analisados no *software* JMP, obtendo-se um modelo de regressão de acordo com a Eq. (4.13). Os modelos foram validados, testando-se cinco condições operatórias diferentes das condições experimentares resultantes do desenho de experiências (incluindo as condições ótimas obtidas) e os valores obtidos nestas experiências foram confrontados com as previsões dos modelos. As experiências de validação dos modelos de regressão foram realizadas em duplicado.

5 Resultados e discussão

Os resultados apresentados discutidos em seguida foram organizados em três vertentes: caracterização do bagaço de uva, avaliação das condições de operação do processo de extração e otimização da extração de polifenóis.

5.1 Caracterização do resíduo

O resíduo sólido foi caracterizado física e quimicamente. Os parâmetros físicos selecionados para a caracterização do resíduo foram a humidade, o teor de sólidos totais, o teor de sólidos voláteis e a condutividade elétrica. Em termos químicos, analisou-se o pH do resíduo, a carência química de oxigénio e o teor de azoto Kjeldahl. Procedeu-se a uma análise elementar do resíduo, que permitiu estimar a sua fórmula molecular empírica e analisou-se a biomassa lenhocelulósica, quantificando as frações dos vários biopolímeros. Na Tabela 5.1 encontra-se um resumo dos valores médios e dos desvios-padrão para os diversos parâmetros medidos.

Tabela 5.1 – Caracterização do bagaço de uva.

Parâmetro	Valor
pH	3,88 ± 0,02
EC (mS /cm)	4,20 ± 0,05
TS (%)	76,3 ± 5,3
VS (%TS)	92,54 ± 0,06
COD (mg O ₂ /g TS)	1396,6 ± 50,2
C (%TS)	47,96 ± 0,01
N (%TS)	1,42 ± 0,01
O (%TS)	34,55 ± 0,03
H (%TS)	6,15 ± 0,02
LG insolúvel (%TS)	46,21 ± 1,15
LG solúvel (%TS)	4,43 ± 0,32
CL (%TS)	19,03 ± 0,30
HM (%TS)	8,18 ± 0,02
TKN (mg N/g TS)	22,51 ± 2,13
Fórmula empírica	C _{39,3} H _{60,5} O _{21,2} N

O bagaço de uva seco apresentou um pH de 3,88, o que é comparável com as gamas de pH reportadas na literatura (3,4 – 5,4). Este valor corresponde a um pH ácido, que resulta da presença de compostos como ácidos fenólicos ou ácidos gordos, como se refere no segundo capítulo. Um baixo valor do pH é favorável à conservação do bagaço, porque limita a

proliferação de microrganismos, como fungos e bactérias, que acontece favoravelmente a valores de pH na gama de 4,5 – 5 e 6,5 – 7, respetivamente (Sousa, et al., 2014).

A condutividade elétrica de um resíduo sólido é definida como a condutividade da solução aquosa que resulta do contacto com o sólido. Esta propriedade mede a capacidade da solução aquosa para conduzir corrente elétrica e está diretamente relacionada com a quantidade de sólidos solúveis presentes no resíduo (Rhoades, 1996). O resíduo em estudo apresentou uma condutividade elétrica igual a 4,20 mS/cm, o que está de acordo com os valores reportados na literatura (entre 1,3 e 5,4 mS/cm).

O teor de sólidos totais do bagaço de uva foi determinado aquando do processo de secagem, correspondendo a 76,3 % da massa total de resíduo. Por diferença de massa, o valor de humidade inicial do resíduo foi avaliado em 23,7 %. Estes valores estão de acordo com os vários estudos reportados, que situam o teor de sólidos totais entre 26,4 e 95,5 %. É importante referir que a gama de valores reportados para o teor de sólidos totais do resíduo é bastante alargada, uma vez que está muito dependente de como o resíduo foi processado e acondicionado até ao início das análises. Por outro lado, o teor de sólidos totais também está dependente das proporções das várias frações da uva presentes no bagaço (engaços, sementes e peles), uma vez que cada uma destas frações apresenta diferentes valores para este parâmetro. O teor de sólidos voláteis do resíduo foi avaliado em 92,54 % (em base seca), o que também está de acordo com os dados presentes na literatura (entre 77,1 e 98,8 %). O teor de sólidos totais está diretamente relacionado com a quantidade de matéria orgânica presente no resíduo. Por diferença de massa, o teor de sólidos fixos (ou cinzas) foi calculado, sendo igual a 7,46 %, o que corresponde à matéria inorgânica presente no resíduo, que resiste ao processo de calcinação.

A carência química de oxigénio (COD) é um parâmetro que também permite quantificar a matéria orgânica, correlacionando-a com a quantidade de oxigénio necessário para que seja completamente oxidada. O bagaço de uva em estudo apresentou um valor de COD igual a 1396,6 mg O₂/g TS, que é compatível com os dados da literatura, que referem valores entre 1343,6 e 1405,5 mg O₂/g TS. O valor em causa é elevado e é revelador do potencial impacto nos recursos hídricos.

Da caracterização elementar do bagaço resultou uma percentagem de 47,96 % de C, 1,42 % de N, 34,55 % de O e 6,15 % de H (em base seca). Os valores obtidos estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores e permitem determinar a fórmula empírica do resíduo como C_{39,3}H_{60,5}O_{21,2}N. Para o resíduo em causa, determinou-se também o teor total de azoto Kjeldahl (TKN). Este parâmetro permite quantificar o azoto orgânico e amoniacal no resíduo relacionado com a matéria orgânica. Esta medida engloba o azoto presente em proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos e também o azoto amoniacal, excluindo o azoto contido

em nitratos e nitritos (Baird, et al., 2017). Deste modo, em teoria, o valor do TKN deve ser inferior ou igual ao valor do teor de azoto total. Para o bagaço de uva, o valor de TKN determinado correspondeu a 22,51 mg N/g TS, o que está dentro da gama de valores indicada na literatura (entre 6,9 e 23 mg N/g TS). Convertendo estas unidades para uma percentagem do total de sólidos, o teor de azoto Kjeldahl corresponde a 2,251 % dos sólidos totais, o que é superior ao valor do azoto total determinado através de análise elementar. Estes resultados discordantes podem ser consequência de alguns fatores como o baixo rigor dos métodos analíticos usados, que têm como alvo uma família de compostos e não um composto específico, e também, da variabilidade do resíduo. O resíduo é bastante heterogéneo e, efetivamente, as amostras recolhidas para a determinação do TKN e para a caracterização elementar poderiam apresentar algumas diferenças significativas. A preparação da amostra para análise elementar, ao requerer secagem, envolve também potenciais perdas de N.

As frações de lenhina, solúvel e insolúvel, celulose e hemiceluloses foram também analisadas. No caso das frações de lenhina solúvel e insolúvel, os valores obtidos estão fora das gamas reportadas na literatura, o que pode ser explicado por variabilidade na biomassa de origem. No entanto, o teor total de lenhina é concordante com a literatura, que situa este valor entre 31,9 e 51,6 %. Os teores de celulose e hemiceluloses também são concordantes com os dados reportados na literatura, de 10,5 a 33 % e de 6,1 a 21 %, respetivamente (Achkar, et al., 2018; Dinuccio, et al., 2010; Domínguez, et al., 2016; Gowman, et al., 2019; Gómez-Brandón, et al., 2019).

5.2 Avaliação das condições de operação do processo de extração

Antes de iniciar o processo de otimização da extração de compostos fenólicos foi necessário conhecer o comportamento do sistema de extração em várias condições de operação, não só para perceber como é que os vários parâmetros de operação condicionam o processo, mas também para selecionar a gama de pesquisa do ótimo durante o processo de otimização. Neste âmbito, avaliou-se o desempenho de vários solventes na extração de polifenóis, o efeito da mistura de vários solventes, o efeito do tempo de operação (cinética de extração), o efeito da temperatura e o efeito do pH.

5.2.1 Seleção de solventes

A fase de seleção de solventes teve como objetivo evitar este fator (“tipo de solvente”) na lista de variáveis para a otimização. Os solventes a utilizar neste processo de *screening* foram selecionados com base nos dados reportados por outros autores, que citam a utilização de etanol,

metanol e acetona como os solventes mais adequados ao processo de extração sólido-líquido (Fontana, et al., 2013). Para além destes solventes, utilizou-se também água, uma vez que é o solvente mais barato e mais “verde”. Apesar de não ser muito referido como solvente para recuperação de polifenóis, testou-se a utilização de butanol, uma vez que tem sido reconhecido como um solvente com menor perigosidade ambiental (GlaxoSmithKlein, 2010). As propriedades físicas dos vários solventes encontram-se compiladas no Anexo C. Foram testadas também misturas de cada um destes solventes orgânicos com água, a 50 % (v/v). Os resultados obtidos para o teor de fenóis recuperados com cada solvente encontram-se na Figura 5.1.

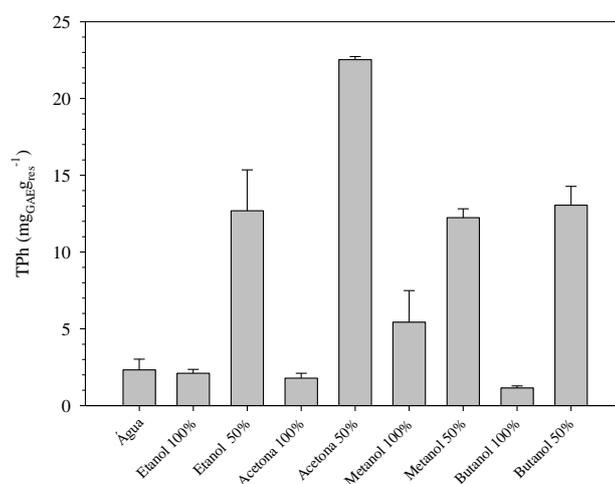


Figura 5.1 – Desempenho de cada um dos solventes na extração de polifenóis (L/S=10 mL/g, T= 50 °C, t=1 h).

Uma das conclusões mais evidentes é a de que as misturas aquosas de solventes têm um desempenho muito superior ao dos solventes puros. De facto, vários autores têm referido o efeito sinérgico da mistura de um solvente orgânico com água para a recuperação de polifenóis, como já foi referido na secção 3.2. Este estudo do efeito do solvente, revelou que a adição de 50 % de água a cada um dos solventes incrementou a recuperação de polifenóis entre 2,3, no caso do metanol e 12,5 vezes, no caso da acetona, face à utilização do solvente puro. Por outro lado, comparando o desempenho dos solventes a 50 % com o da água, a adição de 50 % de solvente levou a um aumento da recuperação de fenóis entre 5,3, no caso do metanol e 9,8 vezes, no caso da acetona.

De entre os vários solventes testados, a acetona a 50 % foi o que apresentou melhor desempenho, permitindo a recuperação de 22,5 mg GAE/g TS, seguida pela mistura de butanol a 50 %, etanol a 50 % e metanol a 50 %. Apesar do butanol ser um solvente “verde” e aquele que, em conjunto com água, tem o segundo melhor desempenho na recuperação de fenóis, a sua utilização tem algumas limitações. O butanol é insolúvel em água, formando uma mistura

bifásica, como se pode observar na Figura 5.2 (a), onde é visível uma interface entre as duas fases. A observação das Figuras 5.2 (b) e 5.2 (c) revelam que o resíduo e os compostos extraídos têm diferentes afinidades com cada uma das fases (orgânica e aquosa). A imiscibilidade entre as duas fases dificultou o processo de análise do teor de fenóis, havendo necessidade de usar etanol na diluição dos extratos para a preparação das amostras, de acordo com o método de Folin. Para além deste aspeto, o ponto de ebulição do butanol é elevado (entre 117 e 118 °C (EPA, s.d.)), o que a nível industrial, dificulta a recuperação do solvente, requerendo mais energia.

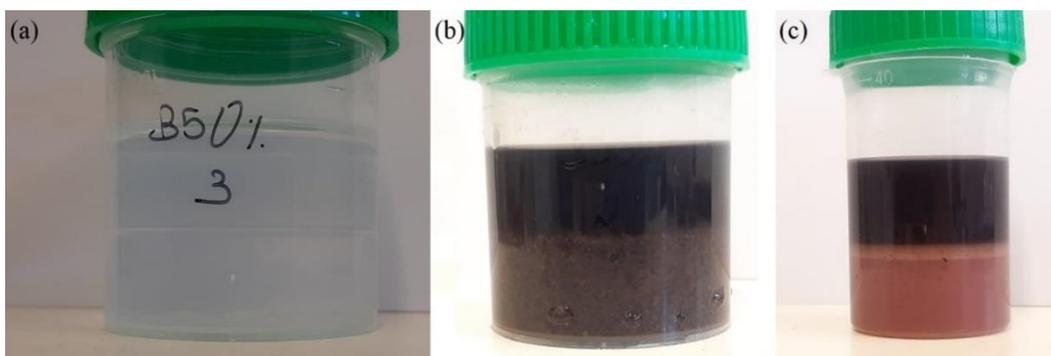


Figura 5.2 – (a) mistura de água e butanol; (b) extrato + resíduo; (c) extrato obtido com butanol a 50 %.

Relativamente aos vários solventes testados nesta fase de experiências, observou-se que a cor dos extratos obtidos é muito dependente do solvente utilizado. No caso da água, obteve-se um extrato rosado e para cada um dos solventes orgânicos puros, o extrato variou entre tonalidades de verde claro e castanho. Os extratos mais carregados foram os que se obtiveram utilizando misturas a 50 % do solvente orgânico com água, sendo a sua cor próxima da cor de vinho tinto, o que era indicativo, à partida, de que a recuperação de fenóis seria superior com misturas de solventes. Para além disso, a simples observação da cor revela que diferentes solventes removem diferentes compostos. A Figura 5.3 evidencia a cor dos extratos obtidos, pela ordem apresentada no gráfico da Figura 5.1.

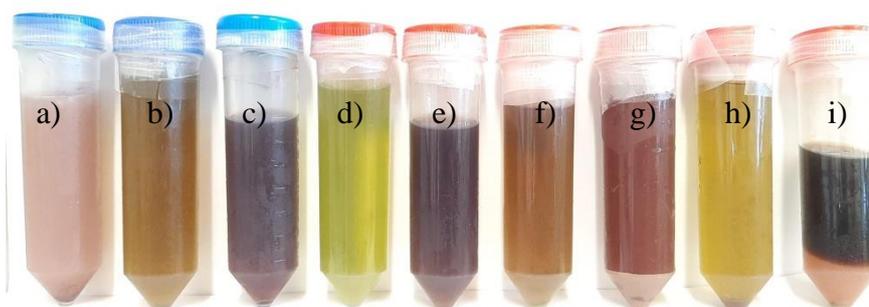


Figura 5.3 – Extratos obtidos com os solventes testados: a) água; b) etanol 100%; c) etanol 50 %; d) acetona 100%; e) acetona 50 %; f) metanol 100 %; g) metanol 50 %; h) butanol 100%; i) butanol 50 %.

5.2.2 Efeito das misturas de solventes

Face aos resultados obtidos durante as experiências para a seleção do solvente, testou-se a mistura de 3 solventes, para verificar as eventuais vantagens na recuperação de compostos fenólicos, uma vez que diferentes solventes podem ter afinidades para diferentes compostos. Deste modo, foi estudado o efeito da mistura de solventes, em várias proporções, com misturas de água, etanol e metanol (A:E:M) e água, etanol e acetona (A:E:Ac). Nestas experiências, foi mantida a percentagem de água em 50 % e as percentagens dos solventes orgânicos tomaram valores entre 12,5, 25 e 37,5. Na Figura 5.4 encontram-se resumidos os resultados obtidos nestas experiências, bem como os obtidos no caso dos solventes puros e a 50 %, como termo de comparação.

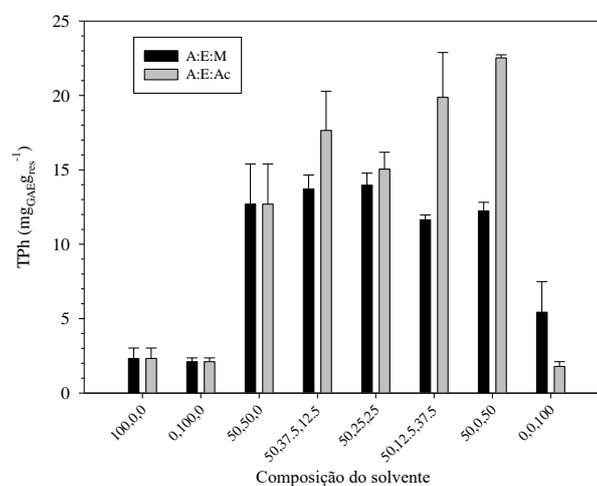


Figura 5.4 – Efeito da mistura de solventes na recuperação de polifenóis.

Para o caso das misturas de água, etanol e metanol, efetivamente, observa-se que o teor de fenóis atinge um máximo usado etanol e metanol a 25 %, sendo o teor de fenóis recuperado igual a 14,0 mg GAE/g TS, o que é cerca de 10% superior ao teor de fenóis recuperado apenas com etanol a 50 % (12,7 mg GAE/g TS). Apesar do aumento do teor de fenóis recuperados, a nível industrial, a mistura dos três solventes pode não compensar, uma vez que implica a separação e purificação dos três componentes, e, portanto, maior complexidade no processamento dos extratos. Para além disso, o metanol é um solvente tóxico, pelo que a sua utilização deve ser minimizada ou mesmo evitada. No caso das misturas de água, etanol e acetona, nenhuma das misturas dos três componentes obteve melhores resultados do que a acetona a 50%.

Face a estes resultados, selecionou-se a acetona e o etanol como solventes para a otimização da extração. Apesar do etanol não ter resultados tão altos quanto a acetona, optou-se por investigar a otimização da extração com misturas à base de etanol, uma vez que é o

solvente mais aceite no caso de se pretender utilizar o extrato para fins alimentares, para além de ser mais barato, sendo reconhecido como seguro (Fontana, et al., 2013).

5.2.3 Cinéticas de extração

Tendo-se selecionado a acetona e o etanol, ambos a 50 %, para a fase de otimização, conduziram-se previamente alguns estudos, no sentido de facilitar o processo de otimização. O primeiro passo consistiu na investigação da cinética de extração para cada um destes solventes, tendo sido testados tempos entre 15 min e 3 h. O teor de fenóis dos extratos foi avaliado e os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.5, bem como as linhas de ajuste a um modelo cinético de 1ª ordem para cada um dos solventes testados.

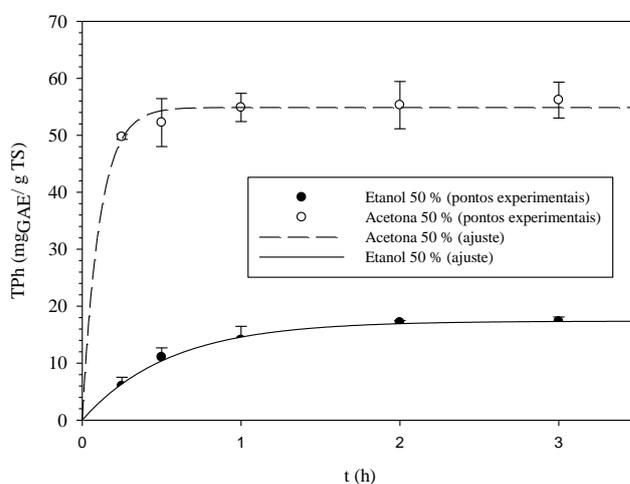


Figura 5.5 – Cinética de extração de polifenóis a 50 °C, com acetona e etanol a 50 %.

Para os resultados de cada um dos solventes ajustou-se um modelo cinético de primeira ordem (com dois parâmetros), de acordo com a Eq. (4.11). Os valores obtidos para os parâmetros do modelo cinético para os dois solventes encontram-se reportados na Tabela 5.2, assim como o valor do coeficiente de ajuste.

Tabela 5.2 – Parâmetros do ajuste cinético para os dois solventes.

Solvente	a (mg GAE/g TS)	k (h ⁻¹)	R ²
Acetona (50%)	54,89	9,14	0,77
Etanol (50%)	17,39	1,82	0,99

Comparando os dois modelos, (R²=0,77 e 0,99, para a acetona e etanol, respetivamente), observa-se que a cinética de extração com acetona a 50 % é muito mais rápida que a do etanol

a 50 %. De facto, a extração com a acetona envolve uma constante cinética de $9,14 \text{ h}^{-1}$ e o etanol de $1,82 \text{ h}^{-1}$. Para o caso da acetona a 50 %, de acordo com o ajuste cinético calculado, atinge-se 95 % do TPh de equilíbrio ao fim de cerca de 20 min. No caso do etanol, é necessário cerca de 100 min. Para além disso, comparando as assíntotas dos dois gráficos, que correspondem ao valor máximo que é possível recuperar prolongando o tempo de extração, verifica-se que a acetona permite recuperações de polifenóis mais do que três vezes superiores às recuperações com etanol.

Os resultados obtidos foram muito semelhantes aos resultados descritos por Bucić-Kojić, *et al* (2007), onde se estudou a cinética de extração de polifenóis em sementes, com etanol a 50 % e a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Para partículas de dimensão superior a $0,63 \text{ mm}$, o TPh recuperado foi de aproximadamente 20 mg GAE/g TS , tendo sido atingido o equilíbrio após cerca de 100 min de extração. Sant'Anna, *et al.* (2012) também obteve como 20 mg GAE/g TS como TPh de equilíbrio para a cinética de extração de polifenóis a partir de bagaço, com etanol a 50 %. Neste estudo, o patamar de equilíbrio foi atingido a partir de 1 h de operação, o que pode ser consequência da utilização de uma razão L/S superior, que leva a maiores gradientes de concentração, e, por conseguinte, maiores velocidades de extração.

5.2.4 Efeito da temperatura

Após avaliar a extração de polifenóis em função do tempo, estudou-se o efeito da temperatura para o caso da mistura entre etanol e água, a 50 %. No gráfico da Figura 5.6 encontram-se os resultados obtidos em função da temperatura, no que respeita ao teor de fenóis recuperado e ao rendimento de sólidos solubilizados.

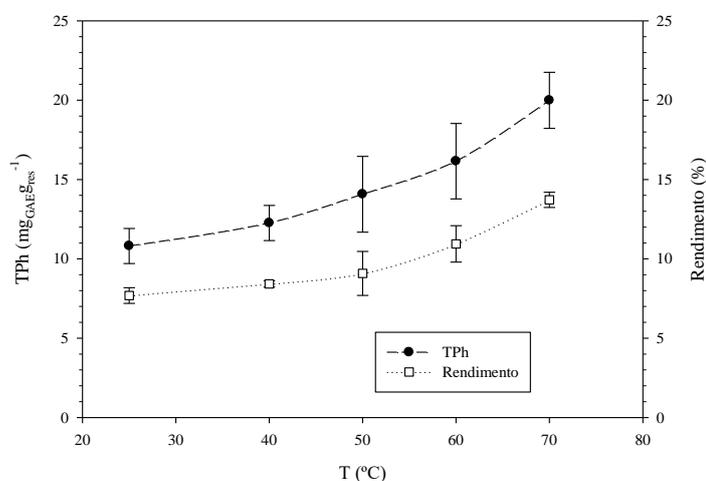


Figura 5.6 – Efeito da temperatura na recuperação de polifenóis e no rendimento de extração.

Da observação dos resultados obtidos, verifica-se que a temperatura exerce um efeito positivo na recuperação de fenóis e na solubilização dos componentes do bagaço (rendimento). A alteração da temperatura de operação de 25 para 70 °C levou à duplicação do TPh recuperado, havendo um incremento de 10,8 para 20,0 mg GAE/g TS. Estes resultados estão em concordância com o que é referido na literatura sobre o modo como a temperatura afeta a extração sólido-líquido. Casagrande, *et al.* (2019) e Pinelo, *et al.* (2005) otimizaram a temperatura (entre outras variáveis) e nos seus estudos, verifica-se que esta variável apresenta sempre um coeficiente positivo nos modelos de extração de polifenóis. No estudo de Bucić-Kojić, *et al.* (2007), para o tamanho de partículas superior a 0,63 mm, os autores obtiveram valores de TPh recuperados entre 14,7 e 23,9 mg GAE/g TS, para temperaturas entre 25 e 80 °C.

Apesar de altas temperaturas favorecerem a remoção de compostos fenólicos do resíduo, não se estudou o efeito da temperatura para valores superiores a 70 °C, uma vez que temperaturas demasiado elevadas podem deteriorar os compostos fenólicos, reduzindo o poder antioxidante dos extratos. No entanto, tal só poderia ser confirmado realizando um estudo da atividade antioxidante dos extratos. Para além deste aspeto, o ponto de ebulição do etanol é de 78,4 °C, e, para misturas de etanol e água a 50 %, o líquido começa a entrar em ebulição a partir de 82 °C (Benedetti, *et al.*, 2014), o que se torna um fator impeditivo de aumentar a temperatura de operação.

Não se efetuou o estudo do efeito da temperatura na extração sólido-líquido usando acetona a 50 %. Contudo, a partir das evidências de outros estudos (Casagrande, *et al.*, 2019) e dos fundamentos teóricos do processo de transferência de massa na extração (Gertenbach, 2002), é expectável que a temperatura também exerça um efeito positivo na concentração dos extratos obtidos com acetona. No entanto, uma vez que a temperatura de ebulição da acetona é de 56 °C e a da mistura a 50 % é de 64 °C (Reinders & Minjer, 1947), as experiências deveriam decorrer no máximo até a uma temperatura de 55 ou 60 °C.

5.2.5 Efeito do pH inicial

O efeito do pH inicial do solvente (etanol a 50%) foi também testado na gama ácida e os resultados obtidos nestas experiências encontram-se resumidos na Figura 5.7.

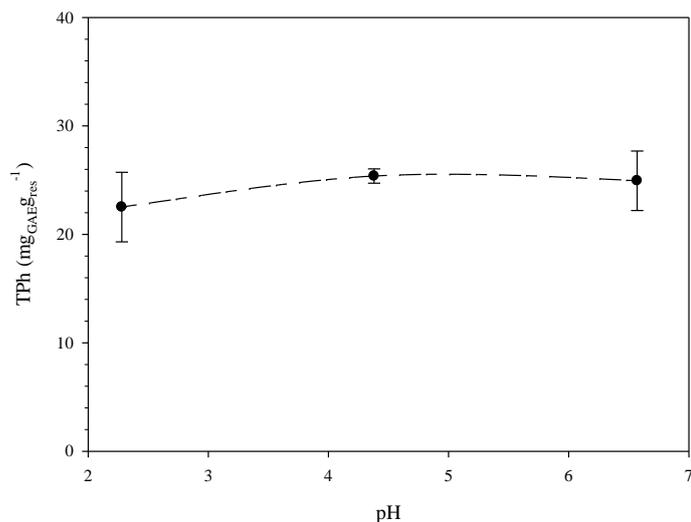


Figura 5.7 – Efeito do pH inicial na extração de compostos fenólicos com etanol a 50 % (T=50 °C, L/S=10 mL/g, t=1h).

Os resultados obtidos evidenciam que o efeito da acidificação não foi muito significativo na recuperação de compostos fenólicos com etanol a 50 %. Adicionalmente, verificou-se que esta é uma variável de difícil controlo neste tipo de sistemas. No entanto, os resultados obtidos não são concordantes com os descritos por Librán, *et al.* (2013), em que para mistura de água e etanol a 50 %, o pH de 2 foi aquele em que se recuperou maior quantidade de fenóis. No entanto, Karvela, *et al.* (2009) estudaram também o efeito simultâneo da concentração de etanol e do pH para bagaços de diferentes castas, obtendo um comportamento do TPh em função do pH semelhante ao obtido no presente estudo para duas castas consideradas.

5.3 Otimização da extração de polifenóis

Após a análise das variáveis consideradas mais relevantes, é agora considerada a otimização do processo de extração, através de um desenho de experiências (DoE) do tipo *Central Composite Design* (CCD). Selecionaram-se neste caso como fatores para a otimização a temperatura da operação, o tempo de contacto entre o sólido e o líquido, a concentração do solvente em solução aquosa e a razão L/S, o que resulta em 52 experiências (incluindo os duplicados). O pH foi excluído da lista de fatores a testar, em face aos resultados da secção 5.2.5.

5.3.1 Desenho de experiências com misturas de etanol

Na otimização de experiências com solventes à base de etanol, foram testadas as variáveis nos níveis indicados na Tabela 4.1.

O teor de fenóis dos extratos obtidos durante as experiências de DoE com etanol foi avaliado nos 52 extratos e os resultados obtidos foram analisados e construiu-se um modelo de regressão, incluindo efeitos principais, efeitos de segunda ordem e efeitos cruzados e foram removidos do modelo os efeitos cujo valor de prova (*PValue*) excedia 0,05, sendo apenas considerados efeitos significativos os indicados na Figura 5.8. A Figura 5.9 representa graficamente o valor do TPh calculado em cada experiência face ao valor de TPh previsto pelo modelo de regressão.

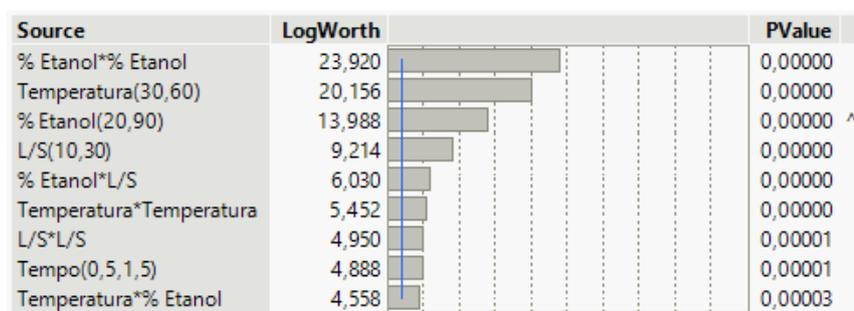


Figura 5.8 – Efeitos considerados na construção do modelo de previsão para misturas de etanol.

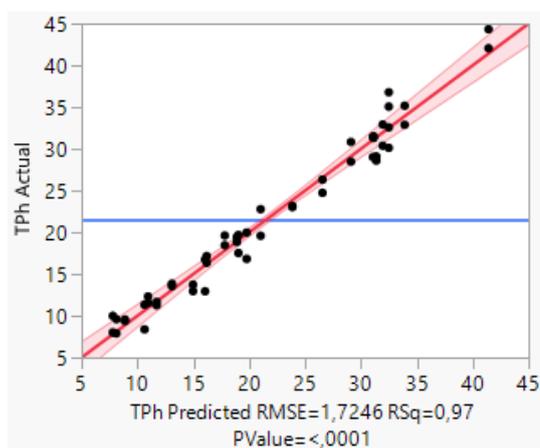


Figura 5.9 – Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o TPh (mg GAE/g TS) e os previstos pelo modelo de regressão na extração com etanol.

Da observação da Figura 5.8, verifica-se que o efeito quadrático da concentração de etanol é o mais significativo, seguido imediatamente pelo efeito da temperatura. Estes dados vão ao encontro das expectativas para estas experiências, uma vez que existe um efeito sinérgico muito forte decorrente da adição de água a um solvente. O efeito significativo da

temperatura também está de acordo com as experiências realizadas no âmbito do estudo do efeito da temperatura, em que o aumento da temperatura de operação levou a uma duplicação da quantidade de compostos fenólicos extraídos. O efeito da razão L/S é o quarto mais significativo, sendo também importante o efeito cruzado entre a razão L/S e a concentração de solvente. O tempo é o fator com menos impacto na recuperação de compostos fenólicos, o que também era expectável face à elevada velocidade de extração. Nas experiências cinéticas de extração com etanol, ao fim de pouco mais de 1 h já tinha sido atingido 85 % do total de compostos fenólicos em equilíbrio, pelo que se previa que nas experiências de DoE, o prolongamento do tempo de extração para lá deste valor não se traduziria em aumentos significativos do valor de TPh.

A Figura 5.9 traduz a capacidade de previsão do modelo obtido com os efeitos selecionados e verifica-se que esta é elevada, uma vez que o teor de fenóis recuperado em cada experiência é muito semelhante ao previsto. No gráfico está também representada a banda do intervalo de confiança com significância de 95 % e como é possível observar, a maioria dos pontos experimentais encontra-se dentro da gama de valores com esta significância. O modelo de previsão construído tem um valor de R^2 igual a 0,97, o que, para as 52 experiências realizada é indicativo de uma correlação forte entre os valores experimentais e os valores previstos. Já para o modelo com os efeitos completos, o R^2 tomou o valor de 0,98, o que indica que a qualidade do modelo não se “deteriorou” significativamente removendo os efeitos menos significativos. Através do *software* foram também analisados os erros residuais do modelo, que se revelaram aleatórios, não indicando um enviesamento dos resultados. No Anexo D encontram-se as várias representações dos erros residuais calculados pelo modelo (Figura D.3 e D.4).

A equação de regressão do modelo que expressa o TPh (mg GAE/g TS) em função dos quatro fatores experimentais estudados encontra-se na Eq. (5.3) (sendo as variáveis x_1 a x_4 definidas pelas Eq. (5.4) a (5.7)):

$$TPh = 32,50 + 5,02x_1 + 1,42x_2 - 3,34x_3 + 2,29x_4 - 1,43x_1x_3 - 1,75x_3x_4 + 3,90x_1^2 - 16,07x_3^2 - 3,65x_4^2 \quad (5.3)$$

$$x_1 = \frac{T-45}{15} \quad (5.4)$$

$$x_2 = \frac{t-1}{0,5} \quad (5.5)$$

$$x_3 = \frac{\%Et-55}{35} \quad (5.6)$$

$$x_4 = \frac{L/S-20}{10} \quad (5.7)$$

sendo T a temperatura de operação ($^{\circ}\text{C}$), t o tempo de contacto (h), $\%Et$ a concentração de etanol (%) e L/S a razão L/S (mL/g).

O *software* permitiu ainda a representação da resposta de superfície do TPh para diferentes pares de variáveis selecionadas. Das seis combinações possíveis, destacam-se o efeito conjunto da razão L/S e da concentração de solvente e o efeito conjunto da concentração de solvente e da temperatura, que se encontram representados na Figura 5.10.

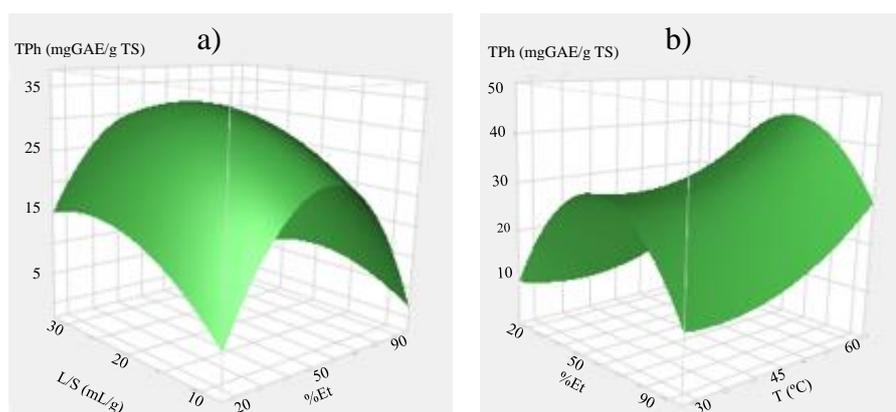


Figura 5.10 – Resposta de superfície relativa ao TPh para o efeito combinado da (a) concentração de solvente e da razão L/S e (b) para o efeito da concentração de solvente e da temperatura.

A cor dos extratos obtidos em cada uma das experiências também reflete os efeitos dos fatores mais significativos em estudo, tal como se mostra na Figura 5.11. No primeiro conjunto de extratos (Figura 5.11 (a)) é evidente o efeito da concentração do solvente, sendo as cores muito semelhantes às obtidas nas experiências de seleção de solventes. Cada um destes extratos foi obtido a uma temperatura de 45°C , ao fim de 1 h de extração e com razão L/S igual a 20 mL/g, usando percentagens de etanol de 20 % (copos 21 e 22), 55 % (25 a 28) e 90% (31 e 32). Nas Figuras 5.11 (b) e 5.11 (c) é evidente o efeito da razão L/S. Estes extratos foram obtidos usando etanol a 20 % como solvente, a 30°C (b) e 60°C (c). Em cada uma das imagens, compara-se a razão L/S de 10 mL/g (copos 1, 2, 35 e 36) com uma razão L/S de 30 mL/g (3, 4, 37 e 38). Apesar dos extratos obtidos com razão L/S igual a 30 mL/g serem mais diluídos, é importante realçar que a quantidade de resíduo usada foi menor e que, portanto, a quantidade de compostos fenólicos recuperada por unidade de massa de resíduo é superior. A Figura 5.11 (d) evidencia o efeito da temperatura para extratos obtidos com etanol a 20% e razão L/S de 10 mL/g, comparando os extratos obtidos a 30°C (1 e 2) e os extratos obtidos a 60°C (35 e 36) que apresentam uma cor mais intensa, sendo portanto mais concentrados que os primeiros. Os

extratos resultantes de extrações com etanol a 90 % apresentam uma tendência semelhante variando a razão L/S e da temperatura.

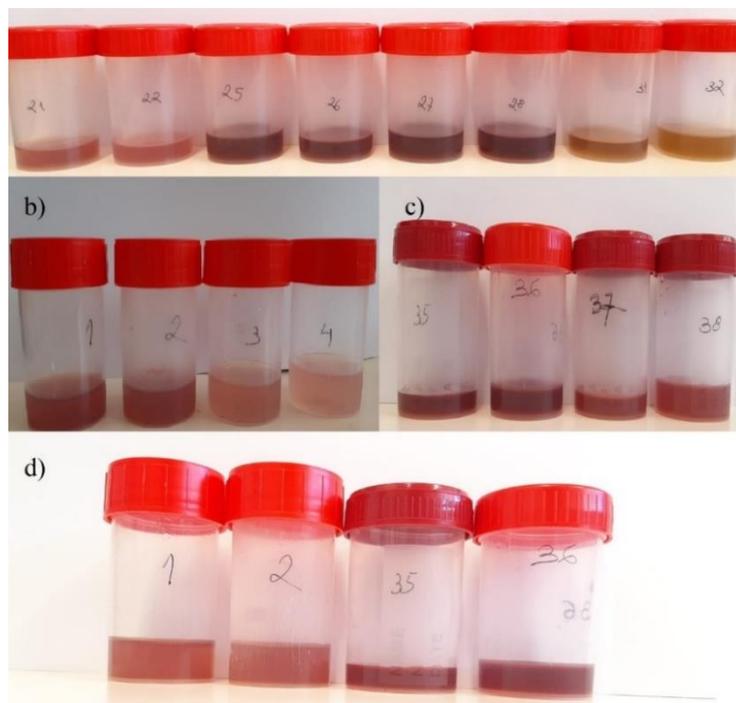


Figura 5.11 – Efeito de algumas variáveis na cor dos extratos obtidos: a) efeito da concentração de solvente, T=45 °C, t=1 h; L/S=20 mL/g; b) efeito da razão L/S, T=30°C, t=1,5 h, % ET=20; c) efeito da razão L/S, T=60°C, t=1,5 h, % Et=20; d) efeito da temperatura, t=1,5 h; % Et=20, L/S= 10 mL/g.

Após a análise do modelo de regressão, procedeu-se à otimização do sistema, maximizando a função de *desirability* do modelo. O *software* identificou, dentro da gama de valores estudados, aqueles que maximizavam a resposta desejada. Na Figura 5.12 é possível observar quais foram os valores selecionados para cada variável, bem como o comportamento de cada fator individualmente e a previsão do teor máximo de fenóis recuperados, correspondendo a 43,65 mg GAE/g TS.

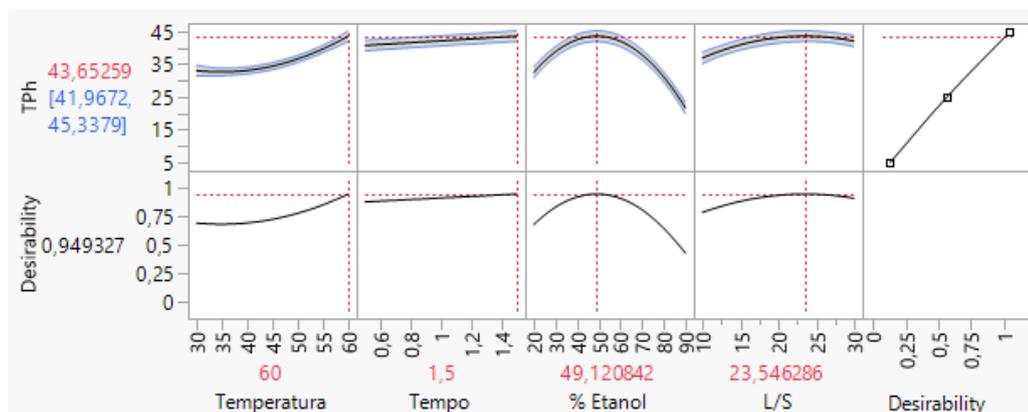


Figura 5.12 – Identificação dos valores que maximizam a resposta do TPh na extração com etanol.

As condições ótimas para o processo de extração com misturas à base de etanol foram identificadas, correspondendo a: 60 °C, 1,5 h, 49,12 % de etanol e L/S 23,55 mL/g. A Figura 5.12 reflete ainda o efeito de cada um dos vários fatores, destacando-se o tempo, que apresenta um declive muito baixo, mostrando que o aumento do tempo de contacto não altera significativamente o valor de TPh recuperado. O gráfico individual da temperatura indica que se esta variável fosse aumentada para lá de 60 °C, o valor de TPh recuperado poderia aumentar. No entanto, devido à sensibilidade dos compostos fenólicos, o aumento da temperatura pode levar à deterioração dos compostos de valor e do poder antioxidante dos extratos. Tanto para a percentagem de solvente como para a razão L/S, é muito fácil identificar qual o valor que otimiza a remoção de compostos fenólicos do extrato, uma vez que as curvas exibem um máximo.

Outros estudos de otimização da extração de polifenóis a partir de bagaço de uva foram realizados, segundo uma metodologia de resposta de superfície. No estudo conduzido por Karvela, *et al.* (2009), o teor de fenóis foi maximizado para uma percentagem de etanol muito próxima de 50 %, para cada uma das castas. No caso da variável tempo, esta revelou um efeito quadrático, apresentando um mínimo a 3 h, para duas das castas estudadas e um máximo a 3 h para a outra casta, o que indica a dependência na origem da biomassa. Neste estudo, o máximo de compostos fenólicos recuperado por massa de resíduo seco correspondeu a 129,6 mg GAE/g TS. Este valor é bastante superior aos obtidos no presente estudo, contudo, o resíduo foi triturado até se tornar um pó fino, o que terá favorecido a extração. No trabalho de Porto & Natolino (2018), otimizou-se a extração, variando a concentração de etanol, o tempo de operação e a razão L/S. O ótimo foi identificado e correspondeu a uma razão L/S de 50 mL/g, um tempo de contacto de cerca de 22 h e uma percentagem de etanol entre 50 e 60 %, prevendo-se um TPh superior a 24 mg GAE/g TS. Este valor é um pouco inferior aos obtidos neste trabalho de investigação, o que pode dever-se ao facto de os autores terem procedido à extração de compostos fenólicos à temperatura ambiente.

Depois da análise da otimização do processo, procedeu-se ao processo de validação do modelo obtido. Para tal, testaram-se cinco condições experimentais não testadas anteriormente, incluindo o ponto ótimo, e confrontaram-se os valores obtidos com a previsão do modelo. A concentração de etanol e a razão L/S do ponto ótimo foram arredondadas a 50 % e a 25 mL/g, respetivamente. As condições experimentais testadas na validação e os respetivos resultados e desvios-padrão encontram-se apresentados na Tabela 5.3. Na última coluna está presente a percentagem de recuperação de fenóis, comparando com as condições ótimas.

Tabela 5.3 – Condições operatórias e resultados obtidos na validação do modelo de regressão para a extração com etanol.

T (°C)	t (h)	%Et	L/S	TPh _{exp} (mg _{GAE} /g _{TS})	TPh _{pred} (mg _{GAE} /g _{TS})	Erro (%)	% recuperação
60	1,5	50	25	40,4	43,6	7,3	-
50	1,5	50	25	34,4	36,6	6,0	85
50	1,25	30	15	28,3	27,2	4,0	70
40	0,75	30	15	20,7	21,7	4,6	51
50	1	70	20	27,5	30,0	8,3	68

Da análise dos resultados obtidos, obteve-se uma recuperação de fenóis de 40,4 mg GAE/g TS para as condições próximas do ótimo indicado. Para além da aproximação ao ponto ótimo, testou-se uma temperatura de 50 °C, mantendo os restantes parâmetros, o que levou a uma recuperação de 34,4 mg GAE/g TS. Comparando com o ponto obtido a 60 °C, uma diminuição de 10 °C levou a uma perda na recuperação de fenóis de 15 % (relativamente às condições ótimas). Os pontos testados para a validação do modelo de regressão estão de acordo com a previsão e na Figura 5.13 estão representados os pontos de validação do modelo de regressão, juntamente com os pontos testados nas experiências de DoE.

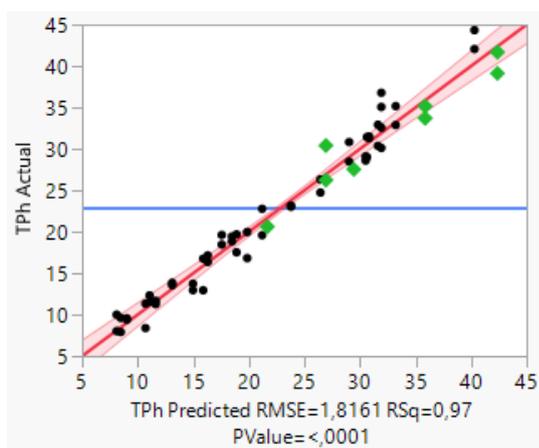


Figura 5.13 – Comparação dos valores experimentais e previstos pelo modelo de regressão para a extração com etanol incluindo os pontos das experiências de validação (a verde).

5.3.2 Desenho de experiências com misturas de acetona

Os níveis testados das variáveis para avaliar o efeito da acetona encontram-se resumidos na Tabela 4.2. O aspeto visual dos extratos obtidos usando misturas de acetona foi muito semelhante ao dos extratos obtidos com etanol, seguindo os mesmos padrões de variação, apresentando apenas uma tonalidade mais carregada. Após as experiências de DoE e a análise dos extratos obtidos com misturas de acetona, os resultados foram tratados no *software* e

analisados, de modo semelhante ao caso das misturas de etanol. Os efeitos sem significado estatístico foram removidos do modelo, segundo o mesmo critério usado para as misturas de etanol, e os efeitos que permaneceram no modelo estão presentes na Figura 5.14. A Figura 5.15 representa o valor real de TPh, comparando com a previsão do modelo.

Source	LogWorth	PValue
% Et*% Et	23,920	0,00000
T(30,60)	20,156	0,00000
% Et(20,90)	13,988	0,00000 ^
L/S(10,30)	9,214	0,00000
% Et*L/S	6,030	0,00000
T*T	5,452	0,00000
L/S*L/S	4,950	0,00001
t(0,5,1,5)	4,888	0,00001
T*% Et	4,558	0,00003

Figura 5.14 – Efeitos considerados na construção do modelo de regressão com misturas de acetona.

À semelhança do modelo de regressão com etanol, o efeito quadrático da concentração de solvente é também o mais dominante, o que é coerente com os resultados das experiências de seleção de solvente e com as informações recolhidas na literatura sobre o efeito sinérgico da utilização de água e de um solvente orgânico. No caso do modelo para misturas de acetona, a razão L/S e o tempo de contacto prevalecem sobre o efeito da temperatura. No entanto, o facto de o tempo de contacto surgir como quinto efeito mais significativo não é muito consistente com os dados cinéticos estudados para acetona a 50 %, em que o valor de TPh é praticamente estável a partir de cerca de 20 minutos. Sendo a cinética de extração com acetona mais rápida do que com etanol, esperava-se que o fator tempo apresentasse menor significado que o fator temperatura. No entanto, o efeito da temperatura não foi estudado individualmente para o sistema de extração com acetona a 50 %, o que não permite tirar conclusões. O modelo de regressão para as misturas de acetona é mais complexo que o obtido com etanol, considerando mais efeitos cruzados.

A análise da Figura 5.15 revela também uma forte correlação entre as previsões do modelo de regressão e os valores experimentais obtidos de TPh. O coeficiente de determinação R^2 , foi neste caso igual a 0,98, o que é muito significativo. Na verdade, os valores experimentais encontram-se dentro ou muito perto da gama de previsão com um intervalo de confiança de 95 % (representado na banda a rosa). O modelo simplificado foi também comparado com o modelo completo (antes da remoção de efeitos não significativos), que também apresentava um valor de R^2 igual a 0,98, o que indica que não houve deterioração da qualidade do modelo removendo efeitos. Os resíduos do modelo também se distribuíram aleatoriamente ao longo das

experiências realizadas e ao longo dos valores de previsão, o que permite descartar a hipótese de enviesamento do modelo, encontrando-se as representações gráficas dos erros nas Figuras D.6 e D.7 do Anexo D.

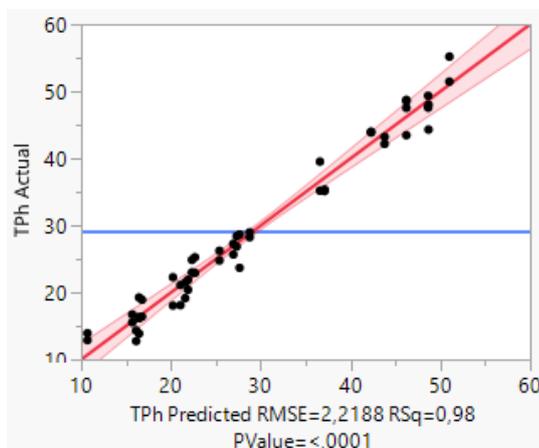


Figura 5.15 – Comparação entre os valores de TPh obtidos e os valores previstos para o modelo com misturas de acetona.

A equação do modelo de regressão simplificado para prever a recuperação de TPh (mg GAE/g TS), em função dos quatro fatores em estudo encontra-se na Eq. (5.8). As Eq. (5.9) a (5.12), referem-se às variáveis do modelo x_5 a x_8 .

$$TPh = 46,22 + 1,16x_5 + 2,43x_6 - 4,27x_7 + 2,59x_8 + 1,17x_5x_6 - 1,33x_5x_7 + 1,17x_5x_8 + 0,88x_6x_8 + 3,63x_5^2 - 21,73x_7^2 - 6,52x_8^2 \quad (5.8)$$

$$x_5 = \frac{T-40}{10} \quad (5.9)$$

$$x_6 = \frac{t-1}{0,5} \quad (5.10)$$

$$x_7 = \frac{\%Ac-55}{35} \quad (5.11)$$

$$x_8 = \frac{L/S-20}{10} \quad (5.12)$$

sendo T a temperatura de operação ($^{\circ}C$), t o tempo de contacto (h), $\%Ac$ a concentração de acetona (%) e L/S a razão L/S (mL/g). O modelo simplificado foi, também, comparado com o modelo completo, havendo algumas diferenças subtis nos coeficientes dos três efeitos quadráticos considerados e no termo independente (na ordem de uma décima).

Foi analisada a resposta de superfície para o modelo com misturas de acetona, destacando-se o efeito combinado da razão L/S e da concentração de acetona, Figura 5.16 (a) onde facilmente se identifica um máximo, e o efeito combinado da razão L/S e da temperatura,

onde a curvatura da superfície é bastante pronunciada, Figura 5.16 (b). As restantes respostas de superfície podem encontrar-se na Figura D.8 do Anexo D.

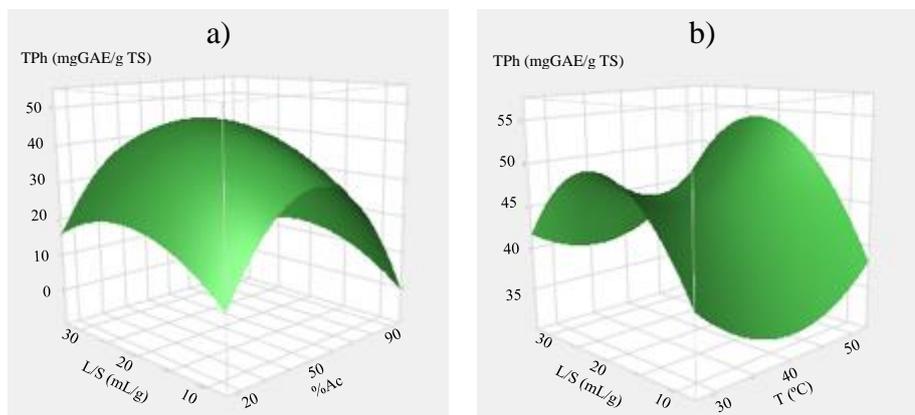


Figura 5.16 – Respostas de superfície relativa ao TPh na extração com acetona: a) influência de L/S e % Ac; b) influência de L/S e T.

Para este modelo, a função de *desirability* foi otimizada e os valores das variáveis são análogos aos do modelo para misturas de etanol, exceto no caso da temperatura, que é agora de 50° C, o que correspondeu a um valor de TPh de 55,79 mg GAE/g TS. Na Figura 5.17 pode observar-se como os quatro fatores estudados influenciam a recuperação de fenóis e, comparando com a Figura 5.12, efetivamente verifica-se que o fator tempo apresenta um declive ligeiramente mais acentuado do que no modelo de extração com misturas de etanol.

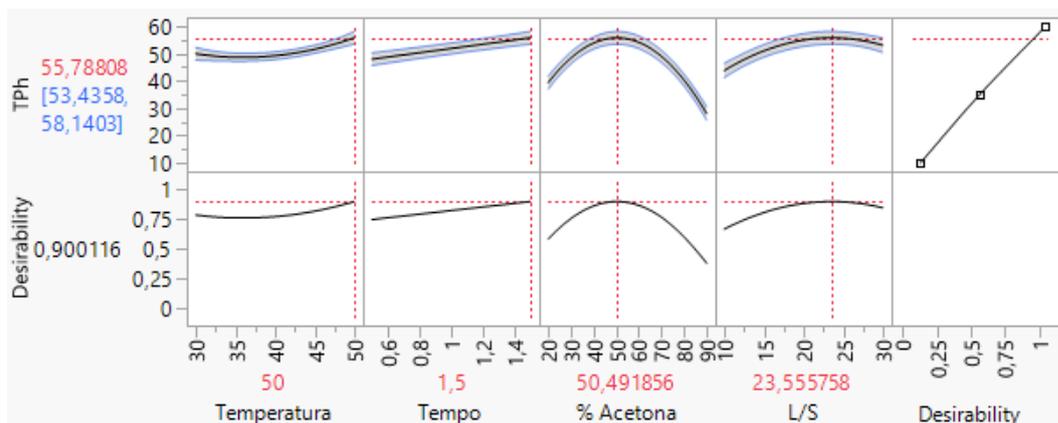


Figura 5.17 – Otimização da função de *desirability* para a extração de fenóis com acetona.

O modelo foi validado, testando o ponto ótimo (50 °C, 1,5 h, 50 % de acetona e L/S=25 mL/g) e outras combinações dos fatores não testadas anteriormente na construção do modelo. A Tabela 5.4 mostra as condições testadas na validação, os resultados de TPh experimentais e previstos pelo modelo e a fração de recuperação de fenóis face ao ótimo.

Tabela 5.4 – Pontos experimentais de validação do modelo de acetona.

T (°C)	T (h)	%Ac	L/S	TPh _{exp} (mg _{GAE} /g _{TS})	TPh _{pred} (mg _{GAE} /g _{TS})	Erro (%)	% recuperação
50	1,5	50	25	54,6	55,6	1,8	-
40	1,5	50	25	49,4	48,9	1,0	90
45	1,25	30	15	35,9	38,2	6,0	66
35	0,75	30	15	34,9	34,7	0,6	64
40	1	70	20	41,0	40,4	1,5	75

O ponto próximo do ótimo permitiu uma recuperação de fenóis de 54,6 mg GAE/g TS. Da análise da Tabela 5.5, verifica-se que uma diminuição da temperatura em 10 °C mantendo as restantes condições do ponto ótimo, levou a uma perda de 10 % na recuperação de compostos fenólicos. Os pontos experimentais para a validação do modelo de regressão com misturas de acetona foram representados face à previsão do modelo para as condições operatórias testadas (Figura 5.18).

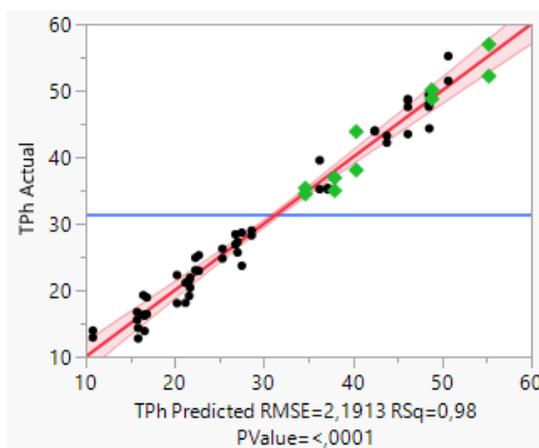


Figura 5.18 – Comparação dos valores experimentais e previstos pelo modelo de regressão para a extração com acetona, incluindo os pontos das experiências de validação (a verde).

5.3.3 Análise comparativa dos resultados obtidos com os dois solventes

A utilização de acetona em misturas de solvente levou a recuperações de fenóis superiores às conseguidas com misturas de etanol. Este resultado é coerente com os resultados obtidos por Casagrande, *et al.* (2019), em que, na metodologia de resposta de superfície aplicada identificou a acetona como ótimo.

Em termos de localização do ponto ótimo, para os dois solventes, as condições de operação são muito semelhantes, exceto no que respeita à temperatura. Utilizando as condições ótimas, a quantidade de compostos fenólicos recuperados por massa de resíduo foi de 40,4 mg GAE/g TS para o etanol e de 54,6 mg GAE/g TS para a acetona. Comparando estes dois

resultados, verifica-se que, apesar de se utilizar uma temperatura 10 °C mais baixa que na extração com etanol, o ponto ótimo com acetona permitiu extrair mais 35 % de polifenóis do que o etanol. No caso da diminuição da temperatura em 10 °C para a mistura de acetona a 50 %, mantendo as restantes condições de operação levou a uma recuperação de fenóis de 49,4 mg GAE/g TS, o que é superior em 22 % às condições ótimas testadas para o etanol, sendo possível operar a uma temperatura inferior em 20 °C. Por sua vez, a utilização de acetona a 70 %, durante 1 h, a 40 °C e a uma razão L/S de 20 mL/g conduz a uma recuperação de fenóis mais baixa (41,0 mg GAE/g TS), que ainda assim é superior ao valor ótimo com misturas de etanol. A utilização destas condições permite o processamento a uma temperatura relativamente baixa, num tempo de operação mais reduzido, requerendo um volume de solvente por unidade de massa de resíduo inferior às condições ótimas. No entanto, a quantidade de acetona a usar será superior, uma vez que o solvente nestas condições está mais concentrado. A tomada de decisão acerca do melhor solvente requer de estudos de *scale-up* e bem como de uma análise económica e também dos impactes ambientais mais relevantes em cada caso.

6 Conclusão e trabalho futuro

O objetivo deste trabalho consistiu no estudo da valorização de um resíduo da indústria vinícola, o bagaço de uva, por processos de extração, de modo a recuperar os compostos fenólicos.

O resíduo foi caracterizado física e quimicamente, estando em geral os valores da caracterização de acordo com os reportados na literatura. Ensaio de extração preliminares indicaram que acetona a 50 % e etanol a 50 % são os solventes com melhor desempenho na recuperação dos compostos fenólicos presentes no bagaço. Foi estudada a cinética de extração para estes dois solventes, a 50 °C e com uma razão L/S de 10 mL/g, que se revelou relativamente rápida. O efeito da temperatura foi estudado para o etanol a 50 %, observando-se que este parâmetro exerce um efeito positivo na extração de fenóis. O estudo do efeito do pH na extração com etanol a 50 % não evidenciou ser uma variável relevante na recuperação de fenóis.

O processo de extração foi otimizado para a acetona e para o etanol, recorrendo a dois desenhos de experiências do tipo *Central Composite Design*, selecionando a temperatura, o tempo de contacto, a concentração do solvente e a razão L/S como fatores em estudo. Da análise dos modelos de regressão obtidos, identificaram-se as condições ótimas de extração para cada um dos solventes. No caso do etanol, as condições ótimas de extração identificadas corresponderam a uma temperatura de 60 °C, durante 1,5 h, para etanol a 50 % e uma razão L/S de 25 mL/g, o que permitiu uma recuperação de fenóis de 40,4 mg GAE/g TS. No caso da acetona, as condições ótimas localizadas corresponderam a uma temperatura de 50 °C, durante 1,5 h, para uma concentração de acetona a 50 % e numa razão L/S de 25 mL/g, o que permitiu uma recuperação de fenóis de 54,6 mg GAE/g TS.

A nível industrial, optar pelas condições ótimas ou por outras condições que levem a menores recuperações de fenóis deve ser cuidadosamente ponderado. A ponderação deve ter em conta o valor acrescentado destes compostos, ou seja, as receitas que podem advir da sua recuperação e da sua qualidade, os custos energéticos associados à operação (custos de operar a temperaturas mais ou menos elevadas e também associados ao tempo de contacto e de agitação), e os custos de aquisição e purificação do solvente. A ponderação dos vários custos e receitas deverá ser feita mediante um processo de otimização. A seleção do solvente a utilizar também deve ser ponderada tendo em conta o tipo de aplicação a dar ao extrato, uma vez que o etanol é reconhecido como seguro para aplicações na indústria alimentar.

Como propostas para trabalhos futuro deixam-se as seguintes sugestões:

- Estudo da cinética de extração a outras temperaturas, de modo a poder calcular a constante cinética e a energia de ativação para os dois sistemas (etanol e acetona, ambos a 50 %);
- Estudo do efeito da temperatura e do pH na extração com acetona a 50 %;
- Estudo do efeito do pH na extração com as condições ótimas identificadas;
- Análise dos resíduos sólidos após a extração, comparando o resíduo tratado com o resíduo original em termos de COD, VS, EC e pH e análise elementar;
- Realização de ensaios de fitotoxicidade do resíduo, antes e após a extração nas condições ótimas;
- Avaliação do poder antioxidante dos extratos obtidos;
- Análise quantitativa por HPLC dos extratos obtidos de modo a identificar os principais compostos fenólicos extraídos.

7 Referências

- Achkar, J. H. E., Lendormi, T., Hobaika, Z., Salameh, D., Louka, N., Maroun, R. G., Lanoisellé, J.-L., 2016. Anaerobic digestion of grape pomace: Biochemical characterization of the fractions and methane production in batch and continuous digesters. *Waste Management*, 50, 275 - 282.
- Achkar, J. H. E., Lendormi, T., Salameh, D., Louka, N., Maroun, R. G., Lanoisellé, J.-L., Hobaika, Z., 2018. Anaerobic digestion of grape pomace: Effect of the hydraulic retention time on process performance and fibers degradability. *Waste Management*, 71, 137-146.
- Amendola, D., De Faveri, D. M., Egües, I., Serrano, L., Labidi, J., Spigno, G., 2012. Autohydrolysis and organosolv process for recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks. *Bioresource Technology*, 107, 267-274.
- Amendola, D., Faveri, D. M. D., Spigno, G., 2010. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts.. *Journal of Food Engineering*, 97, 384-392.
- Arvanitoyannis, I. S., Ladas, D., Mavromatis, A., 2006. Wine waste treatment methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1117-1151.
- Augustin-Salazar, S., Medina-Juárez, L. A., Soto-Valdez, H., Manzanares-López, F., Gámez-Meza, N., 2014. Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 208-213.
- Bagchi, D., Sen, C. K., Ray, S. D., Das, D. K., Bagchi, M., Preuss, H. G., Vinson, J. A., 2003. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523-524, 87-97.
- Baird, R. B., Eaton, A. D., Rice, E. W., 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23rd ed. Nova Iorque: American Public Health Association.
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Anna, A., Orlie, V., 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-109.
- Baumgärtel, T., Kluth, H., Epperlein, K., Rodehutschord, M., 2007. A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. *Small Ruminant Research*, 67, 302-306.
- Benedetti, R., Mariotti, E., Montalbano, V., 2014. *First steps into physics in the winery*. Istanbul, Pegem Akademi.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., 1998. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 66(2), 209-215.
- Brezoiu, A.-M., Matei, C., Deaconu, M., Stanciuc, A.-M., Trifan, A., Gaspar-Pintiliescu, A., Berger, D., 2019. Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices. *Food and Chemical Toxicology*, 133.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D., 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236-242.

- Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Casalles, J., Pérez-Murcia, M. D., 2008. Agrochemical characterization of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, 28, 372-380.
- Cacace, J. E., Mazza, G., 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59, 379-389.
- Cáceres, C. X., Cáceres, R. E., Hein, D., Molina, M. G., Pia, J. M., 2012. Biogas production from grape pomace: Thermodynamic model of the process and dynamic model of the power generation system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 10111-10117.
- Casagrande, M., Zanela, J., Pereira, D., de Lima, V. A., Oldoni, T. L. C., Carpes, S. T., 2019. Optimization of the extraction of antioxidant phenolic compounds from grape pomace using response surface methodology. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 1120-1129.
- Celma, A. R., Rojas, S., López-Rodríguez, F., 2007. Waste-to-energy possibilities for industrial olive and grape by-products in Extremadura. *Biomass and Bioenergy*, 31, 522-534.
- Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., 2014. Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(6), 1169-1186.
- Ciuta, M. S., Marculescu, C., Dinca, C., Badea, A., 2011. Primary characterization of wine making and oil refining industry wastes. *UPB Scientific Bulletin, Series C: Electrical Engineering*, 73(3), 307-320.
- Conradie, A., Sigge, G., Cloete, T. E., 2014. Influence of winemaking practices on the characteristics of winery wastewater and water usage of wineries. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(1), 10-19.
- Corbin, K. R., Hsieh, Y. S. Y., Betts, N. S., Byrt, C. S., Henderson, M., Stork, J., DeBolt, S., Fincher, G. B., Burton, R. A., 2015. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource Technology*, 193, 76-83.
- Corrales, M., García, A. F., Butz, P., Tauscher, B., 2009. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90, 415-421.
- Dai, J., Mumper, R. J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J. L., Barral, M. T., Cruz, J. M., Moldes, A. B., 2011. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*, 31, 2327-2335.
- Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., Menardo, S., 2010. Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresource Technology*, 101, 3780-3783.
- Domínguez, J., Martínez-Cordeiro, H., Lores, M., 2016. Earthworms and grape marc: Simultaneous production of a high-quality biofertilizer and bioactive-rich seeds. Em: A. Morata, I. Loira, edits. *Grape and Wine Biotechnology*. Rijeka, Croácia: Intech, 167-183.

- Drousou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Krokida, M., 2015. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141-149.
- Dwyer, K., Hosseinian, F., Rod, M., 2014. The market potential of grape waste alternatives. *Journal of Food Research*, 3(2), 91-106.
- EPA, s.d. *United States Environmental Protection Agency - Buthanol*. [Online] Available at: <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID1021740#details> [Acedido em 25 10 2020].
- Fontana, A. R., Antonioli, A., Bottini, R., 2013. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987-9003.
- Garrido, J., Borges, F., 2013. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, 54, 1844-1858.
- Gertenbach, D. D., 2002. Solid-Liquid Extraction Technologies for Manufacturing Nutraceuticals. Em: J. Shi, G. Mazza, M. L. Maguer, edits. *Functional Foods - Biochemical and Processing Aspects*. Boca Raton: CRC Press, 332-365.
- GlaxoSmithKlein, 2010. *Royal Society of Chemistry*. [Online] Available at: <http://www.rsc.org/suppdata/gc/c0/c0gc00918k/c0gc00918k.pdf> [Acedido em 12 03 2020].
- Gómez-Brandón, M., Lores, M., Insam, H., Domínguez, J., 2019. Strategies for recycling and valorization of grape marc. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(4), 437-450.
- González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C., 2004. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, 513, 283-289.
- Gowman, A. C., Picard, M. C., Rodriguez-Urbe, A., Misra, M., Khalil, H., Thimmanagari, M., Mohanty, A. K., 2019. Physicochemical analysis of apple and grape pomaces. *BioResources*, 14(2), 3210-3230.
- Hernández, J. J., Aranda-Almansa, G., Bula, A., 2010. Gasification of biomass wastes in an entrained flow gasifier: Effect of the particle size and the residence time. *Fuel Processing Technology*, 91, 681-692.
- Hogervorst, J. C., Miljić, U., Puškaš, V., 2017. Extraction of bioactive compounds from grape porocessin by-products. Em: *Handbook of grape processing by-products*. Londres: Academic Press, 105-135.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., Sakariah, K. K., 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73, 285-290.
- Jiang, Y., John Simonsen, Y. Z., 2011. Compression-molded biocomposite boards from red and white wine grape pomaces. *Jornal of Applied Polymer Science*, 119, 2834-2846.
- Kalli, E., Lappa, I., Bouchagier, P., Tarantilis, P. A., Skotti, E., 2018. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(46), 1-21.

- Kallithraka, S., Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Bakker, J., 1995. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical analysis*, 6, 265-267.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A., 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4360-4367.
- Karvela, E., Maakris, D. P., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V. T., 2009. Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta*, 79, 1311-1321.
- Lafka, T.-I., Sinanoglou, V., Lazos, E. S., 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104, 1206-1214.
- Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A. G., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125, 288-306.
- Librán, C. M., Mayor, K., Garcia-Castello, E. M., Vidal-Brotons, D., 2013. Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect. *Agricultural Sciences*, 4(2), 56-62.
- Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y., Wang, H., 2008. Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(6), 67-73.
- Lutz, M., Fuentes, E., Ávila, F., Alarcón, M., Palomo, I., 2019. Roles of phenolic compounds in the reduction of risk factors of cardiovascular diseases. *Molecules*, 24(366), 1-15.
- Mera, A. C., Contreras, D., Escalona, N., Mansilla, H. D., 2016. BiOI microspheres for photocatalytic degradation of gallic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 318, 71-76.
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Goslinski, M., 2010. Phenolic compounds from winemaking waste and its antioxidant activity towards oxidation of rapeseed oil. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 2272-2280.
- Moletta, R., 2005. Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 51(1), 137-144.
- Muhlack, R. A., Potumarthi, R., Jeffery, D. W., 2018. Sustainable wineries through waste valorization: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste Management*, 72, 99-118.
- Naczki, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A., 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87, 41-44.
- Nerantzis, E. T., Tataridis, P., 2006. Integrated enology-utilization of winery by-products into high added value products. *e-Journal of Science & Technology*, 1, 79-89.

Oliveira, M., Duarte, E., 2016. Integrated approach to winery waste: waste generation and data consolidation. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 10(1), 168-176.

Organization, W. H., 2018. *World Health Organization*. [Online]
Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
[Acedido em 01 10 2020].

Pedras, B. M., Regalin, G., Sá-Nogueira, I., Simões, P., Paiva, A., Barreiros, S., 2020. Fractionation of red wine grape pomace by subcritical water extraction/hydrolysis. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104793.

Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J. M., Oliveira, R. P. S., Domínguez, J. M., 2015. Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste Management*, 40, 72-81.

Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A. S., 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 579-590.

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M. J., 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2111-2117.

Pinho, I. A., Lopes, D. V., Martins, R. C., Quina, M. J., 2017. Phytotoxicity assessment of olive mill solid wastes and the influence of phenolic compounds. *Chemosphere*, 185, 258-267.

Porto, C. d., Natolino, A., 2018. Optimization of the extraction of phenolic compounds from red grape marc (*Vitis vinifera* L.) using response surface methodology. *Journal of Wine Research*, 29(1), 26-36.

Portugal, W. o., 2019. *ViniPortugal*. [Online]
Available at: <https://www.viniportugal.pt/WineSector>
[Acedido em 10 04 2020].

Reinders, W., Minjer, C. H. d., 1947. Vapour-liquid equilibria in ternary systems. VI. The system water-acetone-chloroform. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 66(9), 573-604.

Rhoades, J. D., 1996. Salinity: Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids. Em: D. L. Sparks, et al. edits. *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*, 5.3. Madison: Soil Science Society of America, Inc, 417-435.

Ribeiro, L. F., Ribani, R. H., Francisco, T. M. G., Soares, A. A., Pontarolo, R., Haminiuk, C. W.I., 2015. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *Journal of Chromatography B*, 1007, 72-80.

Rivera, O. M. P., Moldes, A. B., Torrado, A. M., Domínguez, J. M., 2007. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. *Process Biochemistry*, 42, 1010-1020.

Robbins, R. J., 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.

- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E. S. S., Fett, R., 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127, 174-179.
- Sánchez, S. R., Sánchez, I. G., Arévalo-Villena, M., Pérez, A. B., 2015. Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, 587-593.
- Sant'Anna, V., Brandelli, A., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., 2012. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology*, 100, 82-87.
- Schieber, A., Stintzing, F. C., Carle, R., 2002. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401-413.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., Kakuda, Y., 2003. Polyphenolics in grape seeds - Biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6(4), 291-299.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., Wu, Y., 2003. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food, Agriculture & Environment*, 1(2), 42-47.
- Sousa, E. C., Uchôa-Thomaz, A. M. A., Carioca, J. O. B., Morais, S. M., Lima, A., Martins, C. G., Alexandrino, C. D., Ferreira, P. A. T., Rodrigues, A. L. M., Rodrigues, S. P., Silva, J. N., Rodrigues, L. L., 2014. Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology*, 34(1), 135-142.
- Spigno, G., Tramelli, L., Faveri, D. M. D., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200-208.
- Stockfeeds, E. C., s.d. ECS. [Online]
Available at: <http://ecsf.com.au/product/grape-marc/>
[Acedido em 30 03 2020].
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C., 2014. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 15638-15678.
- Toscano, G., Riva, G., Duca, D., Pedretti, E. F., Corinaldesi, F., Rossini, G., 2013. Analysis of the characteristics of the residues of the wine production chain finalized to their industrial and energy recovery. *Biomass and Bioenergy*, 55, 260-267.
- Tseng, A., Zhao, Y., 2013. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138, 356-365.
- Vatai, T., Škerget, M., Knez, Z., 2009. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90, 246-254.

Villaescusa, I., Fiol, N., Martínez, M., Miralles, N., Poch, J., Serarols, J., 2004. Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions b grape stalks wastes. *Water Research*, 38, 992-1002.

Wang, L., Weller, C. L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300-312.

Williams, P. J., Strauss, C. R., 1978. Spirit recovered from heap-fermented grape marc: Nature, origin and removal of the off-odour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 29, 527-533.

Wine, I. O. o. V. a., 2018. *OIV*. [Online]

Available at: <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/statistical-analysis/statistical-data>

[Acedido em 10 04 2020].

Wine, I. O. o. V. a., 2019. *OIV*. [Online]

Available at: <http://www.oiv.int/en/oiv-life/oiv-2019-report-on-the-world-vitivinicultural-situation>

[Acedido em 10 4 2020].

Wittenauer, J., Mäckle, S., Sußmann, D., Schweiggert-Weisz, U., Carle, R., 2015. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, 101, 179-187.

Xu, C., Yagiz, Y., Marshall, S., Li, Z., Simonne, A., Lu, J., Marshall, M. R., 2015. Application of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace extract to reduce carcinogenic acrylamide. *Food Chemistry*, 182, 200-208.

Yilmaz, Y., Toledo, R. T., 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 41-48.

Zacharof, M.-P., 2017. Grape winery waste as feedstock for bioconversions: Applying the biorefinery concept. *Waste Biomass Valor*, 8, 1011-1025.

Zhihui, B., Bo, J., Yuejie, L., Jian, C., Zuming, L., 2008. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 353-358.

Anexos

- A. Curva de calibração do COD
- B. Curva de calibração de TPh
- C. Propriedades dos solventes usados
- D. Resultados experimentais

Anexo A – Calibração da carência química de oxigénio (COD)

Para a construção da curva de calibração do COD, a solução de digestão e a solução ácida foram preparadas de modo igual ao descrito na secção 4.2.2. A curva de calibração foi construída usando massas conhecidas de hidrogenoftalato de potássio (KHP), em que por 1 mg de KHP se obtém um valor de COD de 1,176 mg O₂. As amostras para determinação de COD foram preparadas de acordo com o procedimento de determinação de COD descrito na secção 4.2.2 e foram testadas massas de KHP entre 0,6 e 5,8 mg, o que correspondeu a uma gama e COD entre 0,7056 e 6,8208 mg O₂. Na Tabela A.1 encontram-se as massas de KHP utilizadas, os respetivos valores de COD e das absorvâncias registadas por cada amostra.

Tabela A.1 – Pontos usados na curva de calibração do COD.

m KHP (mg)	CQO (mg O ₂)	Abs-Abs ₀
0,6	0,7056	0,3532
0,7	0,8232	0,3402
1,1	1,2936	0,4778
1,4	1,6464	0,6112
1,5	1,764	0,5745
1,9	2,2344	0,7142
2,1	2,4696	0,7798
2,6	3,0576	0,9245
3,2	3,7632	1,1555
5,8	6,8208	1,9318

Na Figura A.1 estão presentes os pontos experimentais e a regressão linear usada para a calibração do COD.

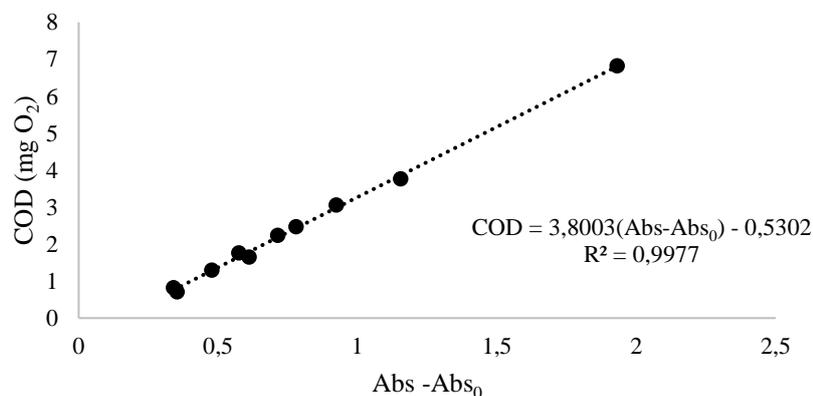


Figura A.1 – Curva de calibração de COD

Anexo B – Calibração do teor de fenóis (TPh)

Para a construção da curva de calibração do teor de fenóis, preparou-se uma solução de ácido gálico, com uma concentração de 2500 mg/L. A partir desta solução foram preparadas soluções padrão, por diluição, com concentrações variáveis de ácido gálico, entre 25 e 1000 mg/L. A absorvância das amostras foi lida, num comprimento de onda de 765 nm e os pontos experimentais usados encontram-se na Tabela B.1.

Tabela B.1 – Pontos experimentais na determinação da curva de calibração para o TPh.

TPh (mg GAE/L)	Abs
1000	0,636
750	0,476
500	0,323
250	0,165
150	0,115
100	0,073
50	0,025
25	0,007

Na Figura B.1 encontra-se a representação gráfica do TPh em função da absorvância registada e a regressão linear determinada.

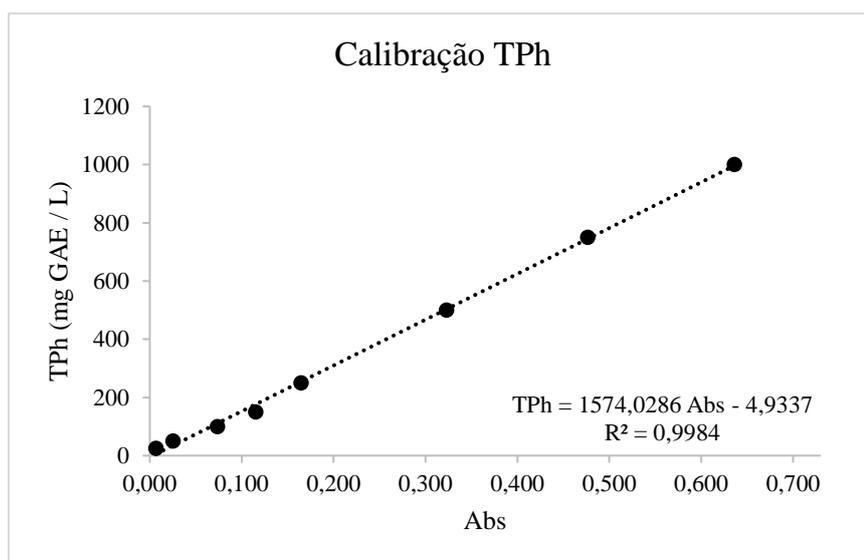


Figura B.1 – Curva de calibração para o TPh.

Anexo C – Propriedades dos solventes

A Tabela C.1 contem os pontos de ebulição e as densidades dos cinco solventes utilizados na seleção do solvente, no seu estado puro.

Tabela C.1 – Propriedades dos solventes utilizados.

Solvente	Ponto de ebulição (°C)	Densidade (kg/m³)
Água	100	997
Etanol	78,4	789
Acetona	56	784
Metanol	64,5	792
Butanol	117,7	810

Anexo D – Resultados experimentais

Este anexo compila todos os resultados experimentais obtidos nas experiências de extração, nomeadamente, as médias e desvios padrão do TPh determinado para cada tipo de condição experimental e as médias e desvios padrão dos rendimentos de extração.

Seleção de solventes

Tabela D.1 – Resultados experimentais obtidos nas experiências de seleção do solvente.

Solvente	TPh (mg _{GAE} /g TS)	Desvio	Rend (%)	Desvio
Água	2,3	0,7	15,1	0,2
Etanol 100%	2,1	0,2	6,8	0,2
Etanol 50%	12,7	2,7	9,1	1,4
Acetona 100%	1,8	0,3	9,0	0,0
Acetona 50%	22,5	0,2	11,8	0,1
Metanol 100%	5,4	2,1	9,6	0,4
Metanol 50%	12,2	0,6	10,0	0,3
Butanol 100%	1,1	0,1	7,7	0,2
Butanol 50%	13,0	1,2	20,9	0,9

Efeito da mistura de solventes

Tabela D.2 – Resultados experimentais para as experiências de efeito da mistura de solventes.

	A:E:M				A:E:Ac			
	TPh (mg _{GAE} /g TS)	Desv	Rend (%)	Desv	TPh (mg _{GAE} /g TS)	Desv	Rend (%)	Desv
100,0,0	2,3	0,7	15,1	0,2	2,3	0,7	15,1	0,2
0,100,0	2,1	0,2	6,8	0,2	2,1	0,2	6,8	0,2
50,50,0	12,7	2,7	9,1	1,4	12,7	2,7	9,1	1,4
50,37,5,12,5	13,7	0,9	10,7	0,3	17,7	2,6	11,3	0,5
50,25,25	14,0	0,8	11,0	0,6	15,0	1,1	11,2	0,7
50,12,5,37,5	11,6	0,3	10,2	1,0	19,9	3,0	12,1	1,4
50,0,50	12,2	0,6	10,0	0,3	22,5	0,2	11,8	0,1
0,0,100	5,4	2,1	9,6	0,4	1,8	0,3	9,0	0,0

Cinética de extração para etanol 50%

Tabela D.3 – Resultados experimentais para as experiências de cinética com etanol.

t (h)	TPh (mg_{GAE}/g TS)	Desv	Rend (%)	Desv
3	17,3	0,8	11,4	0,0
2	17,1	0,4	11,5	0,7
1	12,7	2,7	9,1	1,4
0,5	11,1	1,6	9,1	1,4
0,25	6,0	1,6	5,8	1,5

Cinética de extração para acetona 50%

Tabela D.4 – Resultados experimentais para as experiências de cinética com acetona.

t (h)	TPh (mg_{GAE}/g TS)	Desv	Rend (%)	Desv
3	56,2	3,2	14,9	0,8
2	55,3	4,2	13,1	0,3
1	54,9	2,5	13,8	0,4
0,5	52,2	4,2	12,5	0,8
0,25	49,7	0,4	11,6	0,6

Efeito da temperatura

Tabela D.5 – Resultados experimentais obtidos nas experiências de determinação do efeito da temperatura.

T (°C)	TPh (mg_{GAE}/g TS)	Desv	Rend (%)	Desv
25	10,8	1,1	7,7	0,5
40	12,3	1,1	8,4	0,2
50	13,5	3,2	9,1	1,4
60	16,2	2,4	10,9	1,1
70	20,0	1,8	13,7	0,5

Efeito do pH

Tabela D.6 - Resultados experimentais obtidos nas experiências para determinar o efeito do pH.

pH	TPh (mg_{GAE}/g TS)	Desv	Rend (%)
6,57	24,9	2,7	12,2
4,38	25,4	0,7	11,0
2,28	22,5	3,2	11,1

DoE Etanol

Tabela D.7 – Resultados experimentais obtidos nas experiências de DoE (etanol).

T (°C)	t (h)	%Et	L/S	TPh (mg _{GAE} /g TS)	Desv	Rend (%)	Desv
30	1,5	20	10	11,9	1,0	10,7	0,3
30	1,5	20	30	18,6	1,2	11,7	1,4
30	1,5	20	10	9,9	1,7	6,8	0,2
30	1,5	20	30	11,5	1,7	10,4	0,4
30	1	55	20	28,8	0,9	10,3	0,8
30	0,5	90	10	8,8	1,1	9,4	0,4
30	0,5	90	30	16,8	1,6	13,6	1,0
30	0,5	90	10	9,0	1,2	7,2	0,5
30	0,5	90	30	9,5	1,2	10,3	0,7
45	1,5	55	20	34,0	2,4	11,5	0,2
45	1	20	20	18,4	1,9	15,4	0,7
45	1	55	10	25,5	2,4	8,2	0,3
45	1	55	20	33,7	3,5	11,4	1,1
45	1	55	30	31,4	1,4	12,4	0,4
45	1	90	20	13,7	0,7	11,8	0,4
45	0,5	55	20	30,2	2,3	10,6	0,1
60	1,5	20	10	23,1	1,6	16,1	1,1
60	1,5	20	30	31,6	1,9	19,2	0,2
60	1,5	90	10	19,0	1,4	11,2	0,2
60	1,5	90	30	19,1	0,9	13,2	0,1
60	1	55	20	43,2	3,1	13,2	0,9
60	0,5	20	10	21,2	2,1	13,8	0,7
60	0,5	20	30	29,7	2,4	17,4	0,2
60	0,5	90	10	13,3	0,7	10,0	0,4
60	0,5	90	30	14,8	2,3	11,2	1,1

Resíduos

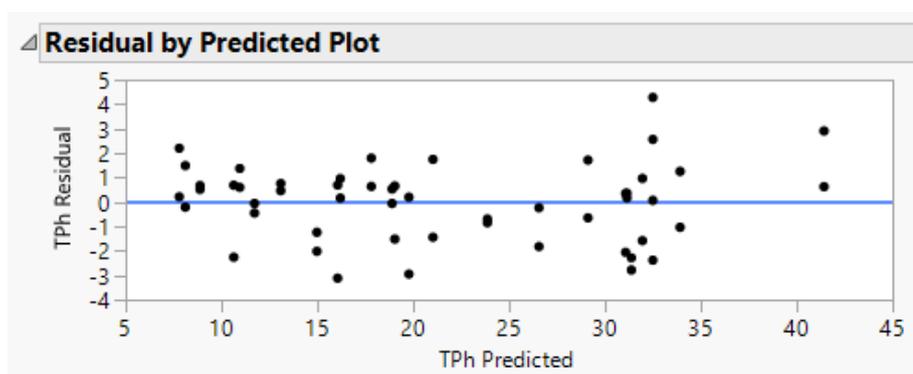


Figura D.1 – Representação dos valores residuais de TPh em função da previsão do modelo (etanol).

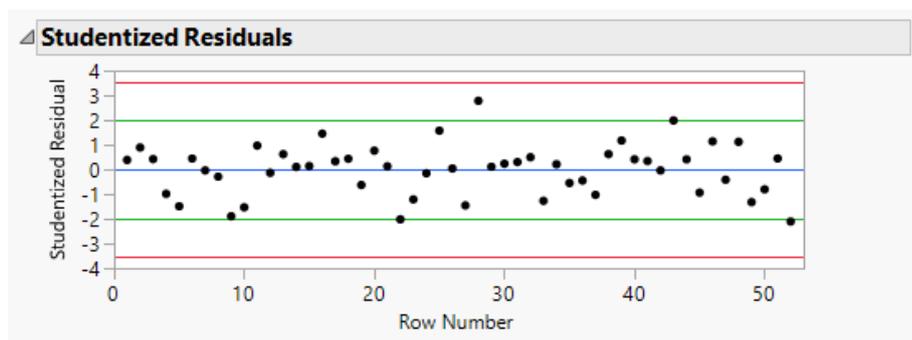


Figura D.2 – Representação dos resíduos em função da ordem das experiências (etanol).

Resposta de superfície

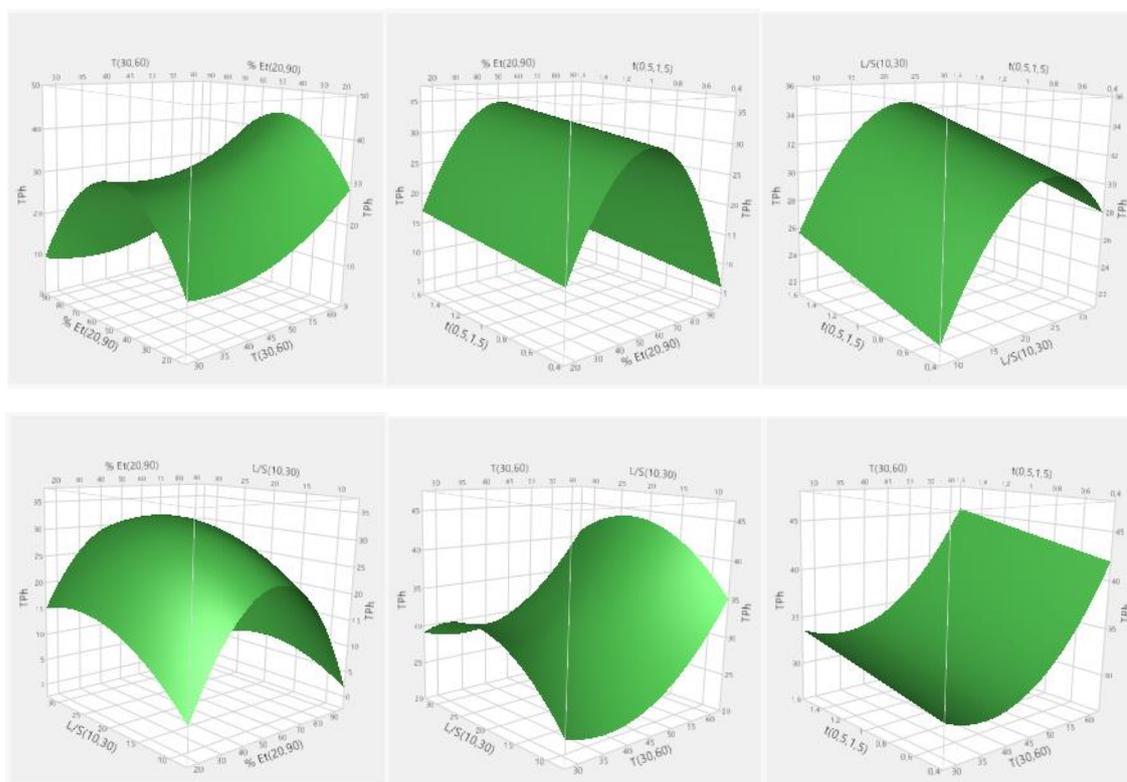


Figura D.3 – Resposta de superfície para as várias combinações de fatores (etanol).

Validação modelo de regressão – Etanol

Tabela D.8 – Condições e resultados experimentais obtidos na validação do modelo (etanol).

T (°C)	t (h)	%Et	L/S	TPh (mg _{GAE} /g TS)	Desv	Rend (%)	Desv
60	1,5	50	25	40,4	1,8	15,9	0,1
50	1,5	50	25	34,4	1,0	13,7	0,1
50	1,25	30	15	28,3	3,0	14,1	0,6
40	0,75	30	15	20,7	0,1	11,4	0,5
50	1	70	20	27,5	0,0	10,8	0,2

DoE Acetona

Tabela D.9 – Resultados experimentais obtidos nas experiências de DoE para a acetona.

T (°C)	t (h)	%Ac	L/S	TPh (mg _{GAE} /g TS)	Desv	Rend (%)	Desv
30	1,5	20	10	23,9	1,3	12,7	0,9
30	1,5	20	30	26,5	1,1	14,5	0,0
30	1,5	20	10	17,8	2,1	10,5	1,4
30	1,5	20	30	19,6	2,1	13,7	0,8
30	1	55	20	46,2	2,6	15,1	3,1
30	0,5	90	10	20,3	1,7	10,8	0,8
30	0,5	90	30	24,1	1,7	13,4	0,9
30	0,5	90	10	16,1	0,8	9,9	0,6
30	0,5	90	30	17,7	1,8	11,1	0,1
45	1,5	55	20	48,5	1,3	15,0	0,2
45	1	20	20	28,6	0,5	17,0	0,2
45	1	55	10	35,3	0,2	10,2	1,0
45	1	55	20	47,1	2,5	16,4	0,7
45	1	55	30	43,9	0,1	15,3	0,9
45	1	90	20	20,2	3,0	12,2	0,2
45	0,5	55	20	42,7	0,7	12,7	0,5
60	1,5	20	10	27,6	1,1	15,2	1,4
60	1,5	20	30	37,4	3,1	20,6	0,7
60	1,5	90	10	13,5	1,1	9,9	1,4
60	1,5	90	30	25,5	1,0	13,7	0,0
60	1	55	20	53,3	2,6	16,3	0,5
60	0,5	20	10	21,1	1,0	12,4	0,5
60	0,5	20	30	26,2	3,5	16,8	2,2
60	0,5	90	10	13,4	0,7	10,7	0,2
60	0,5	90	30	15,0	1,6	12,0	0,1

Resíduos

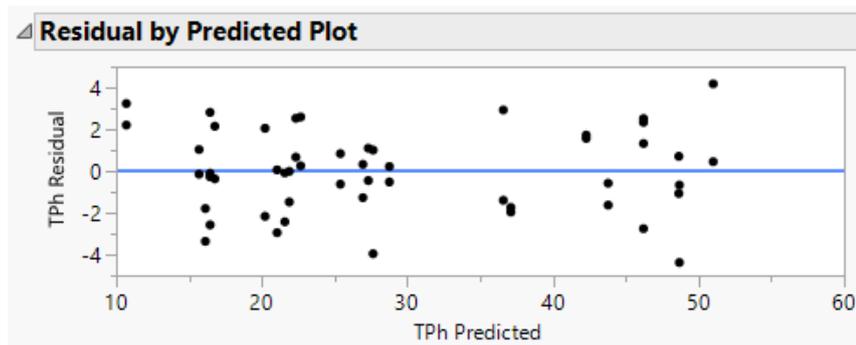


Figura D.4 – Representação dos resíduos de TPh em função da previsão do modelo (acetona).

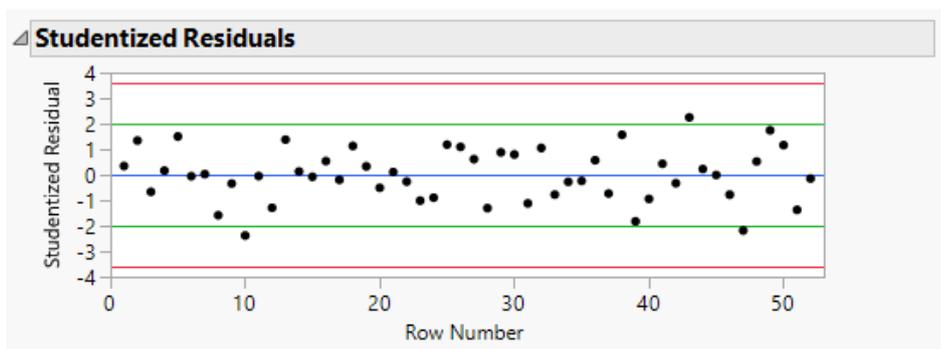


Figura D.5 – Representação dos resíduos de TPh em função da ordem de realização das experiências (acetona).

Resposta de superfície

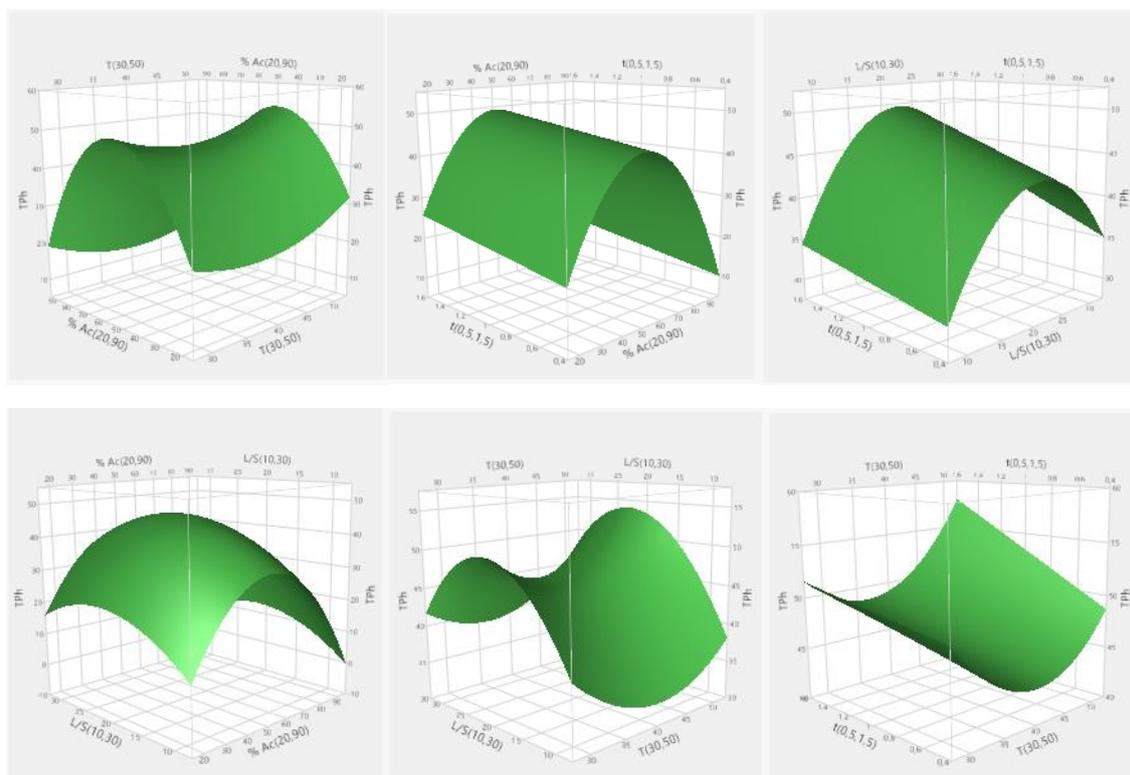


Figura D.6 – Resposta de superfície para as 6 combinações de fatores (acetona).

Validação do modelo de regressão – Acetona

Tabela D.10 – Condições e resultados experimentais obtidos na validação do modelo (acetona).

T (°C)	t (h)	%Ac	L/S	TPh (mgGAE/g TS)	Desv	Rend (%)	Desv
50	1,5	50	25	54,6	3,4	19,8	1,2
40	1,5	50	25	49,4	1,0	15,9	3,8
45	1,25	30	15	35,9	1,4	15,9	1,5
35	0,75	30	15	34,9	0,6	13,1	1,1
40	1	70	20	41,0	4,1	11,4	0,7