

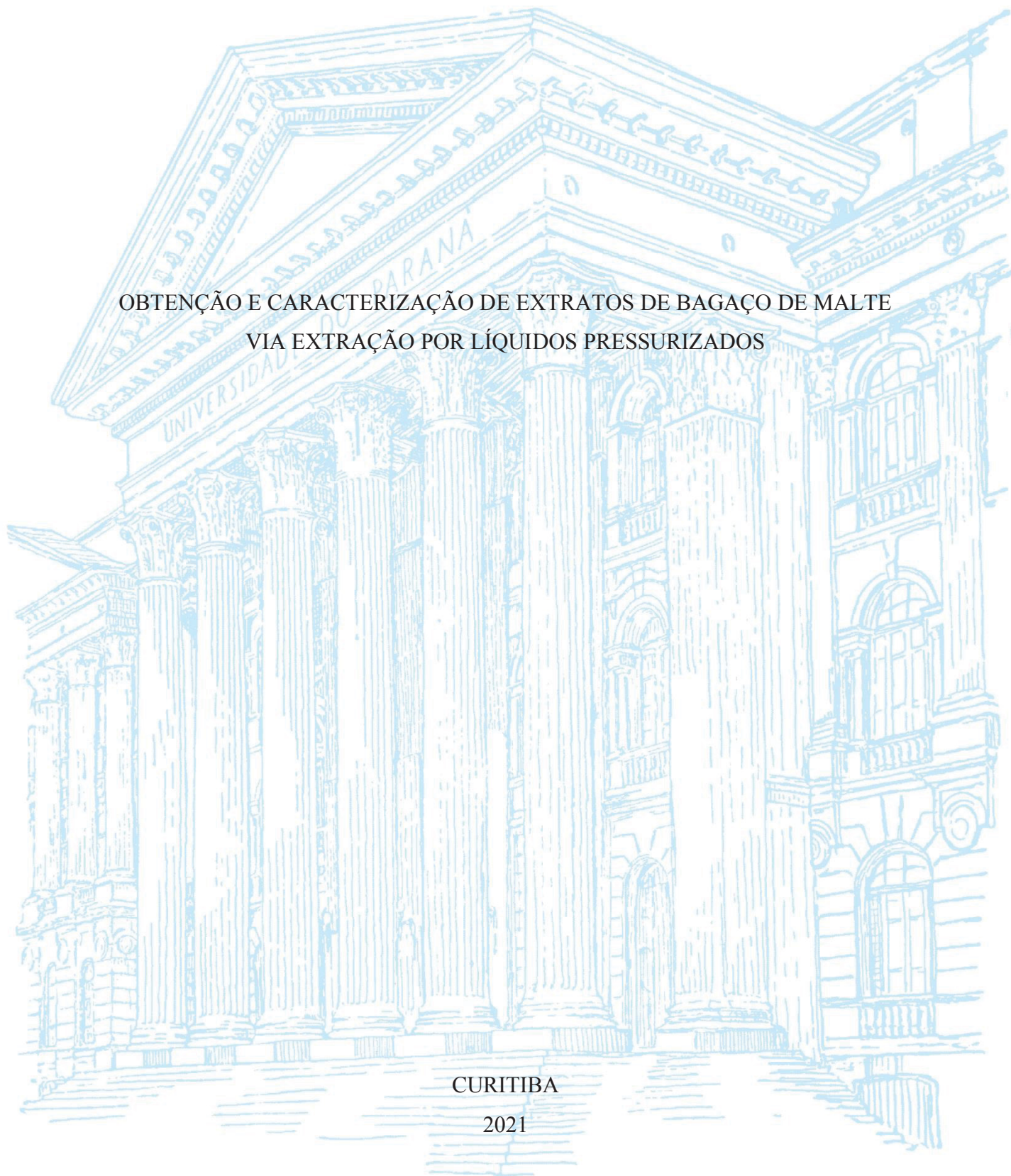
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIULIA HERBST

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE
VIA EXTRAÇÃO POR LÍQUIDOS PRESSURIZADOS

CURITIBA

2021



GIULIA HERBST

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE
VIA EXTRAÇÃO POR LÍQUIDOS PRESSURIZADOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza.
Coorientadora: Dra. Fabiane Hamerski.

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

H538o Herbst, Giulia
Obtenção e caracterização de extratos de bagaço de malte via extração por líquidos
pressurizados [recurso eletrônico] / Giulia Herbst. – Curitiba, 2021.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, 2021.

Orientador: Marcos Lúcio Corazza.
Coorientadora: Fabiane Hamerski.

1. Malte. 2. Extração (Química). 3. Solventes. 4. Cerveja. 5. Cevada. I. Universidade Federal do
Paraná. II. Corazza, Marcos Lúcio. III. Hamerski, Fabiane. IV. Título.

CDD: 617.66

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA

No dia vinte e dois de junho de dois mil e vinte e um às 14:00 horas, na sala Microsoft Teams, Plataforma online, em função da portaria 754/2020 da Reitoria - UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **GIULIA HERBST**, intitulada: **Obtenção e caracterização de extratos de bagaço de malte via extração por líquidos pressurizados.**, sob orientação do Prof. Dr. MARCOS LÚCIO CORAZZA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MARCOS LÚCIO CORAZZA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), CHRISTIAN GONÇALVES ALONSO (UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS), FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MARCOS LÚCIO CORAZZA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 22 de Junho de 2021.

Assinatura Eletrônica

23/06/2021 14:56:22.0

MARCOS LÚCIO CORAZZA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/06/2021 19:52:51.0

CHRISTIAN GONÇALVES ALONSO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS)

Assinatura Eletrônica

23/06/2021 12:11:25.0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GIULIA HERBST** intitulada: **Obtenção e caracterização de extratos de bagaço de malte via extração por líquidos pressurizados.**, sob orientação do Prof. Dr. MARCOS LÚCIO CORAZZA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Junho de 2021.

Assinatura Eletrônica

23/06/2021 14:56:22.0

MARCOS LÚCIO CORAZZA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/06/2021 19:52:51.0

CHRISTIAN GONÇALVES ALONSO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS)

Assinatura Eletrônica

23/06/2021 12:11:25.0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A minha família que sempre esteve comigo e me apoiou em todas as decisões, em especial aos meus pais Amarildo e Cleonice pelo incentivo a seguir esse caminho e às minhas irmãs Luana e Thais pelo companheirismo e afeto.

Aos meus amigos, Gabriela, Larissa, Lana, Daniela, Marjorie, Flaviane, Crisley, Leonardo, Guilherme, Hideo, Pablo, João Pedro, Thiago, Júlio por todo apoio, amizade e companheirismo.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza e Dra. Fabiane Hamerski por todos os ensinamentos, paciência, aprendizados e parceria.

Aos meus amigos e colegas do LACTA, Gabriela, Ana, Estephanie, Micheli, Damian, Kanda e Diego, pelos ensinamentos e companheirismo. Aos meus amigos do mestrado, Maria Alice, João, José e Lucas, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos e Dr. Thiago do Cepasq pelos ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e à secretária Cintya Kuznharski, pela competência e profissionalismo.

A CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro e bolsas de estudo.

A todos os demais envolvidos em minha trajetória, obrigada.

RESUMO

O bagaço de malte (BM) constitui a maior fração dos subprodutos gerados pela indústria cervejeira. Este resíduo é composto principalmente por fração lignocelulósica, proteínas e extraíveis como lipídeos, tornando-se uma matriz potencial para a obtenção de produtos de alto valor de mercado. Portanto, este estudo propõe a avaliação de diferentes parâmetros (temperaturas, razão de solvente e vazão) para a extração de frações solúveis de BM usando extração com líquido pressurizado (PLE), como uma abordagem alternativa ao uso das técnicas convencionais de extração sólido-líquido. Extrações em Soxhlet foram realizadas como um método padrão para avaliar o melhor solvente para comparar aos rendimentos das extrações e caracterização dos extratos com PLE. Os extratos de Soxhlet foram caracterizados por CG-MS para identificar as classes de compostos presentes em cada extrato e selecionar previamente o solvente a ser usado no PLE. Compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT), atividade antioxidante (AA), açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) foram analisados para a caracterização dos extratos obtidos. As extrações em Soxhlet indicam que os melhores solventes para as extrações do BM foram água e etanol. O maior rendimento de extração de PLE foi de $20,1 \pm 0,7\%$, em 0,5 EtOH/Água a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 ml/min de solvente pressurizado e 10 MPa. O conteúdo de CFT, FT e AA foi favorecido por extrações com água e mistura água/etanol e em função do aumento da temperatura. O maior valor de CFT foi de $2130 \pm 1\text{ mg GAE}/100\text{g}$ de extrato BSG, a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 4 ml/min água como solvente pressurizado. O maior teor de FT encontrado foi de $778 \pm 32\text{ mg CE}/100\text{ g}$ de extrato BM, obtido na condição de 0,5 EtOH/água a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 4 ml/min. AA foi quantificada pelas metodologias ABTS, DPPH e FRAP. A maior AA foi obtida usando água a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 4 ml/min, o qual apresentou um valor de 9944 ± 391 , 4769 ± 330 e $4096 \pm 111\text{ }\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ de extrato de BM, respectivamente. As análises de AR e ART apresentaram resultados semelhantes entre os extratos de Soxhlet e PLE, mostrando que as condições de PLE relatadas neste estudo não foram adequadas para a remoção de açúcares redutores da matriz. A matriz BM também passou pelo processo de desengorduramento pelos fluidos dióxido de carbono em condições supercríticas (scCO_2) e por propano comprimido antes da extração com PLE. O propano foi então selecionado como melhor solvente no fracionamento da fração lipídica do BM e foi empregado como pré-etapa em extrações sequenciais usando as melhores condições de PLE de 0,50 EtOH/Água, em que o propano foi eficiente na recuperação da fração lipídica do BM. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram a viabilidade técnica da utilização de extrações PLE na obtenção de extratos com valores expressivos de CFT, FT e alta atividade antioxidante, no entanto mantendo os carboidratos na matriz para posteriores aplicações na geração de plataformas química de biocombustíveis.

Palavras-chave: Bagaço de malte (BM), extrações por líquidos pressurizados, solventes verdes, caracterização dos extratos.

ABSTRACT

Brewer's spent grain (BSG) constitutes the major fraction of by-products generated by the brewing industry. This residue is mainly composed of lignocellulosic fraction, proteins, and extractable as lipids, making it a potential matrix for obtaining high added-value products. Therefore, this study proposes pressurized liquid extraction (PLE) as an alternative approach to the use of conventional solid-liquid techniques, evaluating different parameters as temperatures, solvent ratio, and flow rate. Soxhlet extractions were performed as a standard method to evaluate the best solvent to compare to the extractions yields and extract characterization with PLE. Soxhlet extracts were characterized by CG-MS to identify the classes of compounds present in each extract and to previously select the PLE solvent. Total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), antioxidant activity (AA), reducing sugars (RS), and total reducing sugars (TRS) were analyzed for the extract characterization. Soxhlet extractions indicate that the best solvents for the BSG extractions were water and ethanol. The highest PLE extraction yield was 20.1 ± 0.7 wt%, at 120 °C, 2 mL/min of pressurized solvent (ethanol to water volume ratio of 0.5) and at 10 MPa. The TPC, TFC, and AA content were favored by water and water/ethanol extractions and temperature increase. The highest TPC value of 2130 ± 1 mg GAE/100g of BSG extract, at 120 °C and 4 mL/min was obtained by water as solvent. Simultaneously, the highest TFC content was 778 ± 32 mg CE/100 g of BSG extract obtained at the condition of 0.50 EtOH/Water solvent ratio, 90 °C and 4 mL/min. The AA was quantified by ABTS, DPPH, and FRAP methodologies. The highest AA was obtained with water at 120 °C and 4 mL/min achieving 9944 ± 391 , 4769 ± 330 and 4096 ± 111 μ mol TE/100 g of BSG extract, respectively. The RS and TRS analyses presented similar results between Soxhlet and PLE extracts, showing that the PLE conditions reported in this study were not suitable for the release of reducing sugars from the BSG matrix. The BSG matrix also went through the defatted process using carbon dioxide fluids in supercritical conditions (scCO₂) and compressed propane before extraction with PLE. Propane was then selected as the best solvent in the fractionation of the lipid fraction of the BSG and was elaborated as a pre-step in sequential extractions using the best PLE conditions of 0.50 EtOH/Water, in which propane was efficient in recovering the lipid fraction of the BSG. The results obtained in this work indicated the technical feasibility of using PLE extractions to obtain extracts with expressive values of TPC, TFC and high antioxidant activity, however keeping the carbohydrates in the matrix for further applications in the generation of chemical platforms for biofuels.

Keywords: BSG, pressurized liquid extraction, green solvents, extract characterization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA ESTRATÉGIAS DE AÇÃO.....	4
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEMENTE DE CEVADA EM CORTE LONGITUDINAL.....	6
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO SISTEMÁTICA DO PROCESSO CERVEJEIRO.....	7
FIGURA 4 - EXTRATOR SOXHLET CONVENCIONAL.....	13
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO SISTEMÁTICA DAS FASES DE EXTRAÇÃO DA SWE: (1) ENTRADA RÁPIDA DE FLUIDO; (2) DESSORÇÃO DE SOLUTOS DOS LOCAIS ATIVOS DA MATRIZ; (3) DIFUSÃO DE SOLUTOS POR MEIO DE MATERIAIS ORGÂNICOS; (4) DIFUSÃO DE SOLUTOS POR MEIO DO FLUIDO ESTÁTICO EM MATERIAIS POROSOS; (5) DIFUSÃO DE SOLUTOS PELA CAMADA DE FLUIDO ESTAGNADO FORA DAS PARTÍCULAS; E (6) ELUIÇÃO DE SOLUTOS.....	17
FIGURA 6 - PERIODOS DE EXTRAÇÃO E SUA CURVA.....	21
FIGURA 7 - BAGAÇO DE MALTE APÓS SECAGEM E MOAGEM.....	24
FIGURA 8 - UNIDADE DE EXTRAÇÃO PRESSURIZADA.....	30
FIGURA 9 - UNIDADE DE EXTRAÇÃO DE FLUIDOS COMPRESSÍVEIS.....	33
FIGURA 10 - CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE SOXHLET POR DIFERENTE SOLVENTES. (A) COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS; (B) FLAVONOIDES TOTAIS; (C) ATIVIDADE ANTIOXIDANTE; (D) AÇUCARES REDUTORES.....	43
FIGURA 11 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS EMPREGADAS NAS EXTRAÇÕES POR LÍQUIDOS PRESSURIZADOS.....	48
FIGURA 12 - CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÕES DO BAGAÇO DE MALTE COM ÁGUA PRESSURIZADA A 100 BAR.....	50

FIGURA 13 - CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÕES DO BAGAÇO DE MALTE COM ETANOL PRESSURIZADO A 100 BAR.	51
FIGURA 14 - CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÕES DO BAGAÇO DE MALTE DAS MISTURAS ETANOL ÁGUA: (A) EXTRAÇÕES 0,5 ETOH/ÁGUA; (B) VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS FRAÇÕES DE ETOH/ÁGUA NA CONDIÇÃO 120 °C E 2 ML/MIN.	53
FIGURA 15 – CORRELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS (CFT) NOS EXTRATOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) PARA EXTRATOS OBTIDOS POR PLE COM DIFERENTES SOLVENTES; (A) VALORES AA PELO MÉTODO ABTS, E (B) MÉTODO DPPH.	59
FIGURA 16 - CURVAS DE EXTRAÇÃO SEQUENCIAIS A 250 BAR: (A) SEQUENCIAL scCO ₂ (1) – scCO ₂ + (2) 1:1 ETOH/BM A 40 °C; (B) SEQUENCIAL scCO ₂ + 1:1 ETOH/BM (3) - scCO ₂ + 1:1 ETOH/BM (4) A 80 °C.	64
FIGURA 17 - CURVAS DE EXTRAÇÃO scCO ₂ + ETOH DO BAGAÇO DE MALTE A 150 BAR.	64
FIGURA 18 - CURVAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DE PROPANO COMPRIMIDO E 0,5 ETOH/ÁGUA A 120°C, 2 ML/MIN A 100 BAR.	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE EM BASE SECA DE ACORDO COM A LITERATURA.	9
TABELA 2 - SUBPRODUTOS OBTIDOS DO BAGAÇO DE MALTE.	10
TABELA 3 - PROPRIEDADES DA ÁGUA EM DIFERENTES CONDIÇÕES E ESTADOS.	16
TABELA 4 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN (3k-p) COM PONTO CENTRAL PARA AS EXTRAÇÕES POR LÍQUIDOS PRESSURIZADOS A 100 BAR POR 60 MIN.	32
TABELA 5 - PERFIL DE DIÂMETRO DE PARTICULAS DO BAGAÇO DE MALTE.	39
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE.	40
TABELA 7 - RENDIMENTOS DA EXTRAÇÃO SOXHLET POR DIFERENTES SOLVENTES.	41
TABELA 8 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS VIA CG-MS NOS EXTRATOS SOXHLET POR DIFERENTES SOLVENTES.	45
TABELA 9 - RENDIMENTOS GLOBAIS DAS EXTRAÇÕES PLE A 100 BAR.	47
TABELA 10 - COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS QUANTIFICADOS NOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE.	54
TABELA 11 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE QUANTIFICADA PELOS MÉTODOS ABTS, DPPH E FRAP DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE.	58
TABELA 12 - AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS OBTIDOS NOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE.	60
TABELA 13 - RENDIMENTOS GLOBAIS DAS EXTRAÇÕES scCO ₂ E scCO ₂ +ETOH DO BAGAÇO DE MALTE.	62

TABELA 14 - RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DE PROPANO COMPRIMIDO E 0,5 ETOH/ÁGUA A 120 °C, 2 ML/MIN E 100 BAR E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE.67

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AA	- Atividade antioxidante
AR	- Açúcares redutores
ART	- Açúcares redutores totais
BM	- Bagaço de malte
CER	- Taxa de extração constante (<i>Constant Extraction Rate</i>)
CFT	- Compostos fenólicos totais
Conab	- Companhia Nacional de Abastecimento
DC	- Difusão controlada (<i>Diffusion-Controlled</i>)
EBC	- Convenção Europeia da Cerveja (<i>European Beer Convention</i>)
EtOH	- Etanol
FAN	- Amino Nitrogênios Livres
FAO	- Food and Agriculture Organization of the United Nations
FER	- Taxa de queda de extração (<i>Falling Extraction Rate</i>)
FT	- Fenólicos totais
GRAS	- Geralmente reconhecido como seguro (<i>Generally recognized as safe</i>)
GAE	- Equivalente de ácido gálico
LER	- Taxa de baixa extração (<i>Low Extraction Rate</i>)
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NREL	- Laboratório Nacional de Energia Renovável
OEC	- Curvas gerais de extração (<i>Overall Extraction Curves</i>)
PAE	- Etanol aquoso pressurizado (<i>Pressurized Aqueous Ethanol</i>)
PLE	- Extração por líquido pressurizado (<i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
scCO ₂	- Dióxido de carbono supercrítico
sCW	- Água subcrítica (<i>Subcritical Water</i>)
scCO ₂ +EtOH	- Dióxido de carbono com etanol como co-solvente
SFE	- Extração por fluidos supercríticos (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)

LISTA DE SIMBOLOS E VARIÁVEIS

ρ_a	- Densidade aparente
ρ_r	- Densidade real
ε	- Porosidade
ε_{ml}	- Absortividade molar da lignina
A	- Volume utilizado de NaOH 0,1 N na titulação controle
B	- Volume utilizado de NaOH 0,1 N na titulação da amostra
D_m	- Diâmetro médio
D_i	- Diâmetro de abertura da peneira
AA	- Atividade antioxidante ($\mu\text{molTrolox}/100\text{g}$ óleo)
EtOH/BM	- Razão mássica de etanol para o bagaço de malte
f	- Fator de correção da solução de NaOH 0,1 N
LIA	- % de Lignina Insolúvel em Ácido
LSA	- % Lignina solúvel em ácido
LT	- % Lignina total
P	- Pressão
P_c	- Pressão crítica
T	- Temperatura
T_c	- Temperatura crítica
U	- Teor de umidade e compostos voláteis
UV_{ABS}	- Absorbância em 240 nm
V_{leito}	- Volume do leito
X_i	- Fração de massa retida na peneira

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	2
1.1.1 Objetivos específicos.....	2
1.2 ESTRATÉGIAS DE AÇÃO.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 CERVEJA.....	5
2.1.1 Cevada.....	6
2.1.2 Processo cervejeiro.....	7
2.2 BAGAÇO DE MALTE (BM).....	8
2.2.1 Compostos minoritários presentes no bagaço de malte.....	11
2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	12
2.3.1 Extração Soxhlet (SE).....	13
2.3.2 Extração com líquidos pressurizados (PLE).....	14
2.3.3 Extração com fluídos compressíveis.....	18
2.3.4 Cinética e fases de extração.....	21
2.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 MATÉRIA-PRIMA.....	24
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	24
3.2.1 Teor de umidade e compostos voláteis.....	25
3.2.2 Diâmetro médio de partícula.....	25
3.2.3 Densidade e porosidade.....	26
3.2.4 Teor de cinzas.....	26
3.2.5 Lignina insolúvel e solúvel.....	27

3.2.6 Carboidratos estruturais.....	28
3.2.7 Extraíveis totais.....	28
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE.....	29
3.3.1 Extração Soxhlet.....	29
3.3.2 Extrações com líquidos pressurizados (PLE).....	30
3.3.3 Extração por fluidos compressíveis.....	32
3.3.4 Extrações sequencias.....	34
3.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS DO BAGAÇO DE MALTE.....	34
3.4.1 Análise dos extratos de Soxhlet via CG-MS.....	34
3.4.2 Compostos fenólicos totais (CFT).....	35
3.4.3 Flavonoides Totais (FT).....	35
3.4.4 Atividade antioxidante (AA).....	36
3.4.4.1 Método ABTS.....	36
3.4.4.2 Método DPPH.....	36
3.4.4.3 Método FRAP.....	37
3.4.5 Açúcares redutores.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	39
4.2 EXTRAÇÕES SOXHLET DO BAGAÇO DE MALTE.....	41
4.2.1 Caracterização dos extratos de Soxhlet.....	43
4.3 EXTRAÇÕES COM LÍQUIDOS PRESSURIZADOS.....	46
4.3.1 Curvas globais das extrações em PLE.....	49
4.3.2 Caracterização dos extratos de BM.....	54
4.4 EXTRAÇÕES COM scCO ₂ e Propano.....	61
4.4.1 CO ₂ supercrítico + cossolvente.....	62

4.4.2 Extrações sequenciais: Propano comprimido seguido de EtOH/água pressurizados.	66
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
5. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

O setor cervejeiro no Brasil está em crescente desenvolvimento e com bilhões de litros de cerveja produzidos anualmente. Este setor se tornou responsável pela geração de grandes quantidades de resíduos sólidos, dentre eles o bagaço de malte, resíduo sólido de lúpulo e levedura excedente. O bagaço de malte representa 85% dos subprodutos gerados pela indústria cervejeira e constitui o resíduo sólido proveniente da fase inicial do processo de fabricação de cervejas, resultante da moagem e cozimento dos grãos de cevada, na etapa de brassagem. O resíduo é composto por grãos de cevada, cascas e endosperma. Esta corrente de resíduo pode ser classificada como um material heterogêneo, composto majoritariamente por celulose, hemicelulose, lignina, proteínas e extraíveis, tais como lipídios He et al. (2019) e Luft et al. (2018) e Mussatto et al. (2006) e Pinheiro et al. (2019).

O bagaço de malte é normalmente destinado à alimentação animal devido ao seu alto valor nutricional e baixo custo ou é encaminhado para disposição em solo. No entanto, estudos buscam a valorização desse resíduo como matriz na produção de compostos como xilitol e ácido láctico e recuperação de biocompostos extraíveis como açúcares, proteínas, antioxidantes, fenólicos, flavonoides, vitaminas e minerais, os quais podem ser usados nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias Aliyu; Bala (2010) e Nigam (2017).

Técnicas de extração sólido-líquido convencionais, como maceração, infusão e extração Soxhlet são geralmente empregadas na obtenção de alguns desses compostos. Como alternativa às técnicas convencionais, extrações a base de líquidos pressurizados e fluidos compressíveis têm sido propostos para a obtenção de compostos bioativos provenientes de plantas e na recuperação de moléculas de valor de mercado a partir de diversas biomassas, oferecendo vantagens em relação ao tempo de extração, consumo de solvente, rendimentos de extração e reprodutibilidade Benito-Román et al. (2019) e Guido; Moreira (2017) e Manjare; Dhingra (2019).

Extrações por líquidos pressurizados (PLE) compreendem a utilização de solventes líquidos a elevadas temperaturas e pressões, permitindo a aplicação de solventes em temperaturas acima de seu ponto de ebulição, aumento a solubilidades e a transferência

de massa entre o solvente e o analito. Água subcrítica e etanol aquoso pressurizado são geralmente os solventes mais empregados nessa técnica, pois apresentam propriedades como a não geração de resíduos a partir da neutralização dos extratos, não são tóxicos e permitem um melhor processamento de biocompostos (Herrero et al. (2013 e Plaza; Turner (2015)).

A extração por fluidos compressíveis é outra técnica empregada na obtenção de biocompostos capaz de processar o material, planta ou biomassa, a baixas temperaturas evitando a decomposição térmica de compostos termolábeis e também o uso de solventes orgânicos. Entre os fluidos aplicados, estão o dióxido de carbono, geralmente empregado em condições supercríticas (scCO₂), devido a sua moderada pressão e temperatura críticas ($P_c = 74$ bar; $T_c = 32$ °C). O propano comprimido, por sua vez, tem sido empregado na extração de compostos lipossolúveis, uma vez que apresenta alto poder de solvatação de triglicerídeos (Bubalo et al. (2018 e Cuco et al. (2019 e Lee et al. (2019)).

Estudos recentes demonstram a viabilidade do emprego das técnicas de extrações por líquidos pressurizados e fluidos compressíveis na obtenção de compostos de valor agregado a partir do bagaço de malte, como proteínas, açúcares C-5, β -glucans e compostos fenólicos (Alonso-Riaño et al. (2021 e Benito-Román et al. (2015 e Spinelli et al. (2016 e Torres-Mayanga et al. (2019)). Porém, poucos ou nenhum desses trabalhos apresentam um estudo sistemático em relação a parâmetros de processos.

1.1 OBJETIVO

O objetivo geral do presente estudo é a extração de frações solúveis do bagaço de malte via extração com líquidos pressurizados.

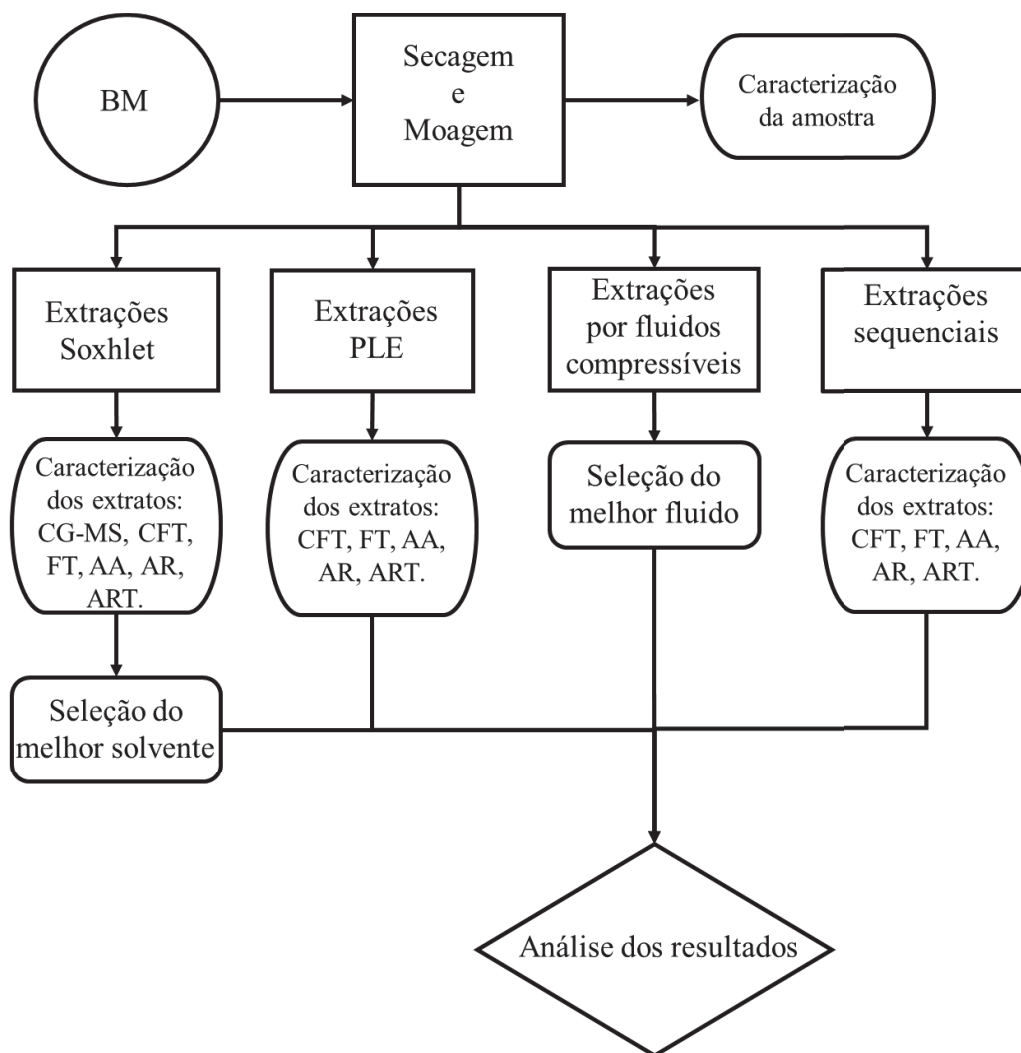
1.1.1 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química do bagaço de malte;
- Realizar extrações Soxhlet com diferentes solventes orgânicos e definir o solvente a ser utilizado nas extrações PLE e coadjuvante para as extrações com fluidos comprimidos;

- Analisar o perfil qualitativo dos diferentes extratos obtidos por Soxhlet;
- Realizar extrações PLE com o solvente definido nos ensaios por Soxhlet, determinar o rendimento de extraíveis e obter as curvas de cinética de extração;
- Avaliar a influência de cada variável de extração (temperatura, vazão e razão volumétrica de solvente) no rendimento das extrações PLE;
- Realizar extrações por fluidos comprimidos e selecionar o melhor solvente para promover remoção da fração lipídica presente no BM para extrações PLE posteriores;
- Avaliar o efeito de extrações sequenciais na obtenção de extratos brutos de BM;
- Obter o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e açúcares redutores dos extratos de BM obtidos em cada extração.

1.2 ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

Na Figura 1 são representadas em fluxograma conceitual as estratégias de ação empregadas nesse estudo.



Fonte: A autora.

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA ESTRATÉGIAS DE AÇÃO.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo estão representados os panoramas global e nacional da produção de cerveja e cevada, bem como a geração do resíduo, principalmente em relação ao bagaço de malte. São aprofundados os conceitos fundamentais para a realização deste trabalho e estudos sobre a valorização do bagaço de malte e dos métodos de extração avaliados no presente trabalho, com foco principal em métodos que levam em consideração os princípios da química verde.

2.1 CERVEJA

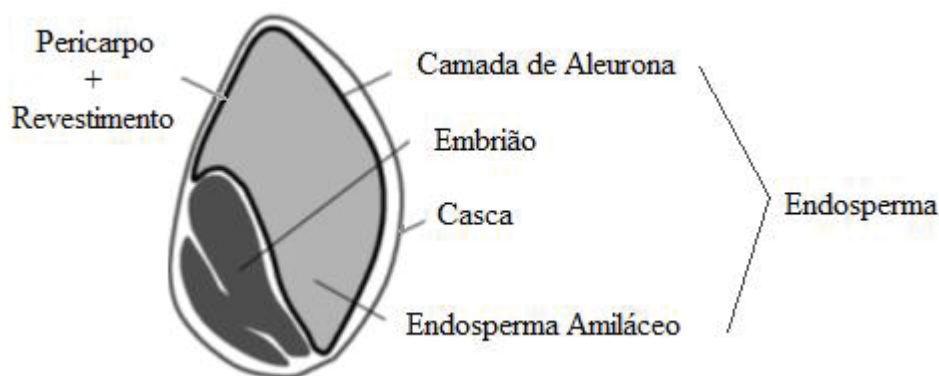
A cerveja é uma das bebidas mais antigas do mundo, descoberta na Mesopotâmia há mais de 5.000 anos. Surgiu da fabricação artesanal e alcançou o patamar industrial como a terceira bebida mais conhecida mundialmente depois da água e do chá, e se tornou a bebida alcoólica mais consumida em 2017, com mais de 195 bilhões de litros produzidos mundialmente. Com uma produção que chega a 13,3 bilhões de litros por ano, o Brasil se tornou o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, atrás somente da China (46 bilhões) e dos Estados Unidos (22,1 bilhões), ultrapassando países tradicionais na produção de cerveja como a Alemanha (9,4 bilhões). No Brasil, a produção representa cerca de 2% do Produto Interno Bruto (PIB), com faturamento de R\$ 100 bilhões por ano e geração de 2,7 milhões de empregos (ANDERSON et al., 2019; FAO, 2009; PILARSKI; GEROGIORGIS, 2020; SindiCerv, 2017).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019), até o ano de 2019, 1.209 cervejarias foram registradas em 26 Unidades da Federação e 320 novas cervejarias só no ano de 2019. As cervejarias concentram-se na região Sul-Sudeste com mais de 80% dos estabelecimentos. O estado que apresenta maior número de cervejarias é São Paulo, o qual ultrapassou o Rio Grande do Sul no último levantamento para o atual, seguidos de Minas Gerais, Santa Catarina e Paraná com mais de cem cervejarias.

A cerveja é tipicamente produzida por uma fonte de amido (cereais), levedura, lúpulo e água. Com o tempo, diferentes tipos de plantas amiláceas foram usados para fabricação de cerveja, incluindo milho (na América do Sul), soja (na Índia e Pérsia), milho e sorgo (na África) e arroz (no Extremo Oriente). Atualmente a cevada é o cereal mais utilizado no processo cervejeiro, sua preeminência como cereal fermentativo resulta de sua capacidade de ser substrato e ao mesmo tempo fonte de enzimas para a produção de açúcares durante a fermentação (ANDERSON et al., 2019; SHEWRY;ULLRICH, 2014).

2.1.1 Cevada

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) pertence à família Poaceae, também conhecida como gramíneas, e ao grupo Triticeae, um dos grupos de plantas mais importantes economicamente, composto por cereais de pequenos grãos, como trigo (*Triticum* spp.), centeio (*Secale cereale*) e o tritcale (*Triticosecale*). Seu grão é formado por três partes principais: germe (embrião), endosperma (composto pelo aleuroma e o endosperma amiláceo) e coberturas do grão como representado na Figura 2 (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006; SHEWRY;ULLRICH, 2014).



Fonte: Adaptado de Finnie e Svensson (2008).

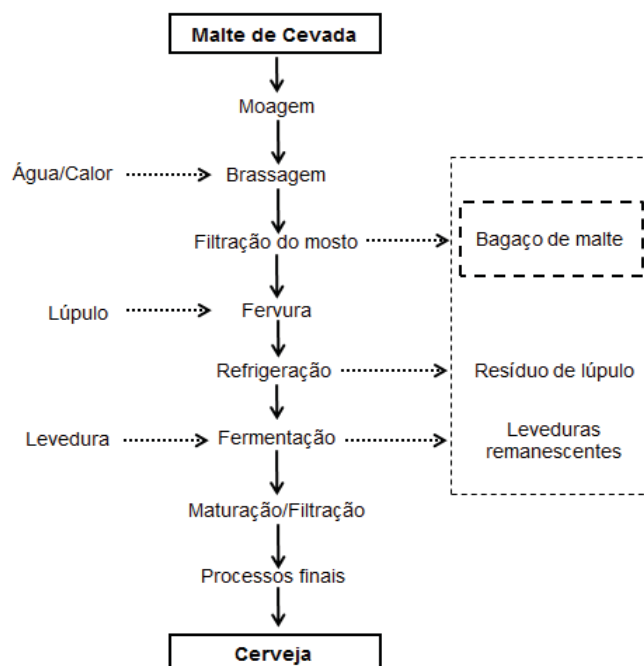
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEMENTE DE CEVADA EM CORTE LONGITUDINAL.

O revestimento de sementes atua como uma membrana semipermeável na interface pericarpo-revestimento de sementes, devido à consistência cerosa do

polícarpo. Já a casca protege o grão, composta principalmente de paredes celulares lignocelulósicas, proteínas, resinas e taninos. Durante a malteação, a casca protege os coleópteros durante o processo de germinação e filtração e confere textura firme aos grãos FAO (2009 e Mussatto et al. (2006).

2.1.2 Processo cervejeiro

Os grãos de cevada para ser processados como grãos cervejeiros precisam passar por uma etapa inicial, denominada maltagem, que consiste na modificação da estrutura e ação de enzimas do grão de cevada por meio da germinação controlada. O processo cervejeiro compreende as etapas de moagem de malte, brassagem, filtração de mosto, fervura, refrigeração, fermentação, maturação e processos finais, como representado da Figura 3 (SHEWRY; ULLRICH, 2014; FREEMAN, 2010; LINKO et al., 1998; PAVSLER; BUIATTI, 2009)



Fonte: Adaptado de Mussatto et al. (2006).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO SISTEMÁTICA DO PROCESSO CERVEJEIRO.

Na cervejaria, a produção de cerveja inicia-se com a moagem dos grãos de malte realizada por moinhos do tipo rolos ou martelo para aumentar a área superficial e fazer

com que o amido se torne mais acessível às enzimas. Nesta etapa é importante que as cascas do grão permaneçam intactas, pois ajudam na separação do mosto Freeman (2010 e Pavslar; Buiatti (2009).

Na próxima etapa, denominada brassagem, os grãos moídos recebem água e um processo de extração se inicia, além da ativação das enzimas que promovem uma série de reações que solubilizam parte do substrato no líquido. O amido é então gelatinizado favorecendo sua hidrólise em açúcares fermentescíveis e oligossacarídeos (SHEWRY; ULLRICH, 2014; LINKO et al., 1998).

O resultado da brassagem é um líquido rico em açúcares e nutrientes, denominado mosto, que é separado do resíduo insolúvel de malte de cevada na etapa de filtração. O objetivo da filtração é recuperar a maior quantidade possível do extrato, utilizando o próprio resíduo insolúvel de malte (da denominação em inglês “*brewer’s spent grains* - BM”) como filtro Freeman (2010).

O mosto segue para a etapa de fervura e recebe a adição de lúpulo, com a finalidade de desenvolver sabor e amargor. A fervura estabiliza o mosto com a precipitação das proteínas, inativação das enzimas e eliminação de microrganismos. O excesso de proteínas precipitadas e os resíduos sólidos de lúpulos são removidos em um tanque de separação conhecido como “*whirlpool*”. A é iniciada fermentação com a adição de levedura. A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura comumente utilizada na fermentação (ANDERSON et al., 2019; FREEMAN, 2010; GALLONE et al., 2018; SHEWRY;ULLRICH, 2014).

2.2 BAGAÇO DE MALTE (BM)

O bagaço de malte de cevada (BM) é o subproduto derivado da etapa de brassagem, que é separado na etapa de filtração. O BM corresponde a 85% dos subprodutos gerados durante a produção de cerveja, aproximadamente 20-30 Kg (20-45% em massa seca) de bagaço de malte é gerado para cada 100 L de cerveja produzida. Por ano, aproximadamente 87 milhões de toneladas de bagaço de malte de cevada são gerados na produção de 193 bilhões de litros de cerveja mundialmente Balogun et al. (2017 e Mallen; Najdanovic-Visak (2018 e Mussatto et al. (2006 e Nigam (2017).

Apesar do grande volume de bagaço produzido, seu uso continua limitado à alimentação animal (em sua forma natural ou em forma de ração), em compostagem ou como cobertura de solo em lavouras. No entanto, esse resíduo apresenta grande potencial como biomassa na produção e obtenção de uma grande variedade de compostos funcionais e bioativos, como vitaminas, antioxidantes e açúcares Gunes et al. (2019) e Luft et al. (2018) e Nigam (2017) e Spinelli et al. (2016).

O resíduo sólido é basicamente formado em sua maior parte pelas cascas dos grãos de malte de cevada, frações menores de pericarpo e endosperma, com grande teor de umidade, aproximadamente de 70-80%. As cascas dos grãos são ricas em celulose, hemicelulose, lignina, proteínas e extraíveis como lipídios, além de conter porções de cinzas e a maior parte de componentes polifenólicos do grão de cevada. Sua composição química geral é apresentada na Tabela 1, a partir de dados obtidos da literatura Luft et al. (2018) e Mussatto et al. (2006) e Pinheiro et al. (2019).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE EM BASE SECA DE ACORDO COM A LITERATURA.

Componente (% massa seca)	Torres-Mayanga et al. (2019)	Paz et al. (2018) - Tipo A	Paz et al. (2018) - Tipo B	Balogun et al. (2017)
Umidade	4,80 ± 0,10	9,09 ± 0,01	6,62 ± 0,15	-
Cinzas	3,90 ± 0,20	3,07 ± 0,03	3,38 ± 0,08	3,83 ± 0,05
Extrativos	13,60 ± 0,20	-	12,71 ± 0,75	11,82 ± 0,55
Proteína	19,20 ± 0,20	31,81 ± 0,46	47,20 ± 0,34	-
Celulose	17,90 ± 0,02	25,58 ± 6,27	24,44 ± 0,58	26,3 ± 0,06
Hemicelulose	35,70 ± 0,02	17,64 ± 1,58	21,51 ± 0,73	-
Xilose	-	12,47 ± 1,30	14,22 ± 0,62	13,5 ± 0,50
Arabinose	-	5,85 ± 0,82	7,29 ± 0,12	5,3 ± 0,10
Lignina Insolúvel	11,70 ± 0,10	12,72 ± 2,00	13,12 ± 0,54	10,11 ± 0,19
Lignina Solúvel	6,10 ± 0,40	-	-	3,69 ± 0,07

Fonte: Adaptado de Torres-Mayanga et al. (2019), Paz et al. (2018) e Balogun et al. (2017).

O bagaço de malte é em geral definido como material heterogêneo composto majoritariamente por material lignocelulósico. Sua composição pode alterar devido à variedade da cevada e safra, com o processo de maltagem e também com as condições do processo de brassagem Mussatto et al. (2006) e Pinheiro et al. (2019).

Entre os recursos de biomassa, o bagaço de malte é um exemplo de resíduo lignocelulósico agroindustrial que apresenta baixo ou nenhum custo, além de suas escassas aplicações. Diante desses fatos, vários autores buscam obter subprodutos e identificar métodos alternativos para a valorização desse resíduo, como demonstrados na Tabela 2.

TABELA 2 - SUBPRODUTOS OBTIDOS DO BAGAÇO DE MALTE.

Referências	Método/Processo	Extrato/Composto/Aplicação
Meneses et al. (2013)	Extração por solvente com n-hexano, acetato de etila, metanol, etanol, acetona e água.	Extrato do bagaço de cevada (compostos fenólicos, flavonoides, proteínas, radicais livres, atividade antioxidante e açúcares redutores) para a indústria de alimentos, cosméticos e fármacos.
Moreira et al. (2013)	Extração assistida por micro-ondas.	Extrato do bagaço de cevada (compostos fenólicos e atividade antioxidante) para incorporação em alimentos na prevenção de alguns tipos de câncer e doenças crônicas.
Fărcaş et al., 2015	Extração de compostos voláteis utilizando a técnica de extração em tubo (ITEX).	Extrato do bagaço de cevada (perfil de voláteis, ácidos graxos, atividade antioxidante, polifenóis e flavonoides) para uso na indústria alimentícia e farmacêutica.
Spinelli et al., 2016	Extração com CO ₂ supercrítico e etanol como cossolvente.	Extrato do bagaço de cevada (Compostos fenólicos, flavonoides e radicais livres) para a indústria de alimentos, cosméticos e fármacos.
Mallen; Najdanovic-Visak, 2018	Extração Soxhlet com n-hexano, secagem e transesterificação in situ.	Ácidos graxos (ácidos palmítico, linoleico e oleico) para a produção de biodiesel.
Qin, Johansen e Mussatto (2018)	Estratégias de pre-tratamentos para a extração de proteínas.	Extratos proteicos e componentes colaterais, como açúcares e lignina para indústria alimentícia e em biorrefinaria.
Torres-Mayanga et al., 2018	Hidrólise semi-contínua com água subcrítica (210 °C, 20 ml min ⁻¹ e S/F de 64).	Açúcares da hemicelulose (açúcares C5) para biocombustíveis, bioenergia e materiais renováveis.
Outeiriño et al. (2019)	Deslignificação com IL glicinato de colina do resíduo sólido remanescente da produção de enzimas e hidrólise enzimática.	Cocktails enzimáticos e açúcares fermentáveis com uso em biorrefinaria.
Alonso-Riaño et al. (2021)	Água subcrítica como um meio hidrolítico.	Recuperar e fracionar a fração de proteína e compostos fenólicos do bagaço de malte.

Fonte: A autora.

2.2.1 Compostos minoritários presentes no bagaço de malte

O bagaço de malte é composto majoritariamente pelos três principais grupos de componentes: amido, proteínas e polissacarídeos da parede celular. No entanto, o bagaço contém cerca de 5,0 a 13,0% de lipídios, e uma variedade de micronutrientes, incluindo minerais, vitaminas e fitoquímicos, como compostos fenólicos e terpenóides (SHEWRY; ULLRICH, 2014; SKENDI; HARASYM; GALANAKIS, 2018).

Fărcaş et al., (2015) identificaram a presença de 26 ácidos graxos no extrato lipídico do bagaço de malte, dentre eles os mais abundantes foram os ácidos linoleico (18:2n-6), palmítico (16:0) e ácidos oleicos (18:1n-9), e em sua forma livre os ácidos α -linolênico (18:3n3) e esteárico (18:0) e pequenas quantidades dos ácidos mirístico (14:0), vacênico (18:1n-7), aráidico (20:0), 11-eicosenóico (20:1n-9), ácidos beênico (22:0) e lignocérico (24:0).

Del Río, Prinsen e Gutiérrez, (2013), detectaram além dos ácidos graxos, mais duas classes de compostos lipídicos, os alquilresorcinol, uma série de 5-n-alquilresorcinol em pequenas quantidades (30 mg/ kg de bagaço livre de cinzas) e esteroides de diversas classes denominados esteroides hidrocarbonetos, esteroides cetonas e esteróis na forma livre e conjugada (com glicosídeo e ésteres), sendo a classe de esteróis livres a mais abundante (910 mg/ Kg de bagaço livre de cinzas) com 450 mg/Kg de sistosterol e 250 mg/Kg de campesterol. Cabe mencionar que os alquilresorcinois exercem efeitos citotóxicos nas células cancerígenas, sendo um grande aliado na prevenção contra o câncer, enquanto fitosteróis são ingredientes funcionais em alimentos, que podem reduzir o nível de colesterol no sangue.

Além dos ácidos graxos, o bagaço de malte representa uma fonte rica de compostos fenólicos, com aproximadamente 1,2% de ácidos fenólicos mono- e di-méricos. Derivados de ácidos fenólicos hidroxicinâmicos, como os ácidos ferúlico, p-cumárico e sinápico. O ácido ferúlico é um antioxidante natural, conservante de alimentos/agente microbiano, possui propriedade anti-inflamatória e fotoprotetora, além de ser precursor de sabor em alimentos, enquanto o ácido p-cumárico possui propriedades antioxidantes e quimioprotetoras e o ácido sinápico apresenta um potente efeito ansiolítico, anti-inflamatório e antioxidante Aliyu; Bala (2010 e Fărcaş et al. (2015 e McCarthy et al. (2013 e Stefanello et al. (2018).

Alguns desses compostos podem ser obtidos por técnicas de extração mais sustentáveis, como a extração com dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), com a adição de cossolventes capazes de aumentar o poder de solvatação dos compostos de interesse, os quais podem ser usados para obtenção de extratos ricos em vários grupos fenólicos, como cumarinas, ácidos cinâmicos, quinonas e flavonoides em condições de 40 a 50 °C e 200 a 350 bar e por fluidos pressurizados em condições 60 – 280 °C e 10 – 103 bar. Dentre outros solventes alternativos que podem ser utilizados para recuperação de compostos presentes no bagaço de malte destaca-se o propano comprimido, o qual pode ser empregado na obtenção de compostos lipossolúveis como triglicerídeos, tocoferóis, fitosteróis e carotenoides, devido a maior solubilidade desses compostos em solventes apolares Bezerra et al. (2019 e Bubalo et al. (2018 e Cuco et al. (2019 e Fetzer et al. (2018).

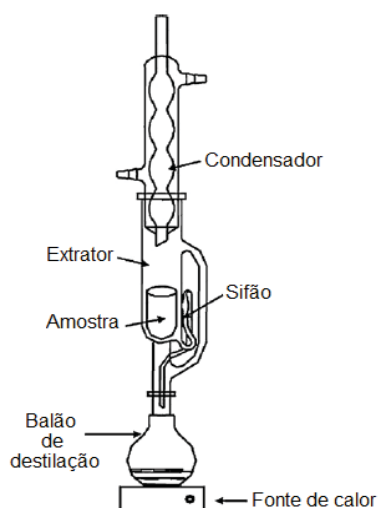
2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A obtenção de extratos do bagaço de malte é tipicamente realizada por meio de processos de extração sólido-líquido convencional, como maceração, infusão e extração Soxhlet. Essas técnicas demandam um longo tempo de extração, além de grandes quantidades de solventes orgânicos, como hidrocarbonetos, álcoois e cloroalcanos, devido a grande maioria dos biocompostos não serem solúveis em água. No entanto novas técnicas de extração mais seguras e eficientes baseadas em princípios de química verde, os quais permitem a utilização de solventes alternativos que garantam um extrato/produto seguro e de qualidade, tem sido estudada. Dentre essas técnicas destaca-se a extração por fluido supercrítico e por fluidos pressurizados Bubalo et al. (2018 e Chemat et al. (2019 e Fărcaş et al. (2015 e Mallen; Najdanovic-Visak (2018 e Meneses et al. (2013).

A seguir é apresentada uma breve descrição dos métodos de extração utilizados no presente trabalho.

2.3.1 Extração Soxhlet (SE)

A extração Soxhlet (SE – *Soxhlet Extraction*) é uma das técnicas mais antigas de extração sólido-líquido utilizada na separação e isolamento de compostos bioativos de interesse e de frações insolúveis de alto peso molecular provenientes de fontes naturais. A SE é utilizada como método padrão e referência na comparação de novas técnicas de extração e em sua forma convencional, consiste em um condensador acoplado ao extrator (a amostra é posicionada no extrator) e a um balão de destilação aquecido por uma fonte de calor, como representado na Figura 4 Bubalo et al. (2018 e López-Bascón-Bascon; Luque de Castro (2019 e Luque de Castro; Priego-Capote (2010).



Fonte: Adaptado de Luque de Castro e Priego-Capote (2009).

FIGURA 4 - EXTRATOR SOXHLET CONVENCIONAL.

O solvente de extração selecionado é adicionado no balão de destilação aquecido, em que por ebulição o solvente é arrastado pelo capilar lateral do extrator, o solvente é então condensado e preenche gradualmente o extrator e a amostra. Quando o líquido atinge o nível de transbordamento, o sifão desloca o líquido para o balão de destilação, transportando o solvente contendo os analitos extraíveis da amostra. O tempo mensurado de um transbordamento a outro é denominado ciclo. Essa operação é repetida até que a extração exaustiva ocorra, para esse método de 6 a 24 h de extração López-Bascón-Bascon; Luque de Castro (2019 e Sluiter, A. et al. (2008).

A extração ocorre no ponto de ebulição do solvente, que pode levar à decomposição térmica de alguns compostos termolábeis e perda de compostos voláteis,

devido à permanência do sistema em temperaturas elevadas por um longo período de tempo. Os solutos extraídos por este método são geralmente obtidos em alto volume e em sua forma diluída havendo a necessidade de uma etapa de concentração. Mas a maior desvantagem desse método é a necessidade de solventes orgânicos de elevado custo (em sua maioria), tóxicos e de alta pureza, como metanol, cloreto de metileno, acetona, acetonitrila, entre outros, em grandes quantidades que podem causar problemas ambientais Chemat et al. (2019 e Luque de Castro; Priego-Capote (2010 e Yousefi et al. (2019).

O rendimento de extraíveis na extração Soxhlet depende do solvente e de sua afinidade com a biomassa. Para o bagaço de malte, Paz et al. (2019) relataram um rendimento de extração de $14,0 \pm 0,1\%$ em 24 horas com etanol como solvente. Mallen e Najdanovic-Visak (2018) e Almeida et al. (2017) relataram de 6,41 a 7,50% de extraíveis com n-hexano e Del Río, Prinsen e Gutiérrez, (2013) obtiveram $8,3 \pm 0,1\%$ usando 8 horas de extração e acetona como solvente. Outros solventes como o diclorometano foram usados durante 24 horas de extração com um rendimento de extraíveis de $11,82 \pm 0,55\%$ Balogun et al. (2017).

2.3.2 Extração com líquidos pressurizados (PLE)

A extração com líquidos pressurizados (PLE - *Pressurized Liquid Extraction*) é amplamente utilizada na obtenção de biocompostos de fontes naturais, no fracionamento termoquímico de biomassa lignocelulósica e na remoção de contaminantes orgânicos em produtos farmacêuticos. A PLE é também conhecida como extração por solvente-quente pressurizado (PHSE - *Pressurized Hot-Solvent Extraction*) ou extração acelerada por solvente (ASE - *Accelerated Solvent Extraction*) Herrero et al. (2013 e Hoff; Pizzolato (2018 e Huerta; Saldaña (2018 e Nieto et al. (2010).

O método PLE é baseado na extração por solvente a elevadas temperaturas e pressões em que o solvente permanece no estado líquido durante todo o processo. A extração é realizada a temperaturas e pressões abaixo do ponto crítico do solvente. Devido à performance da extração a altas pressões, a PLE é considerada um processo rápido, que também requer menores volumes de solventes, quando comparado às técnicas tradicionais Herrero et al. (2013 e Sánchez-Camargo et al. (2017).

Quando submetidos a elevadas temperaturas e pressões de operação os solventes empregados na PLE exibem propriedades únicas devido à mudança da constante dielétrica, densidade, viscosidade e difusividade e devido ao rompimento de forças intermoleculares (como Van der Waals, ligações de hidrogênio e atrações dipolo), a transferência de massa é favorecida, a solubilidade e difusividade aumentam, fazendo com que as ligações analito-matriz se rompam e a tensão superficial do solvente e viscosidade diminuam, permitindo que o solvente penetre facilmente na matriz sólida, removendo os componentes de interesse e aumentando as cinéticas de extração Hoff; Pizzolato (2018 e Mena-García et al. (2019 e Sánchez-Camargo et al. (2017).

A seleção do solvente para a extração é um dos parâmetros mais importantes. O solvente deve ser capaz de solubilizar os analitos de interesse e minimizar a co-extração de outros componentes. Sua polaridade deve ser próxima a do analito de interesse. Solventes apolares como hexano e pentano combinados com solventes de média polaridade como diclorometano e acetato de etila são frequentemente utilizados na extração de compostos apolares e lipofílicos. Solventes mais polares como acetonitrila, metanol, etanol, acetato de etila e água são empregados na extração de compostos polares e hidrofílicos. Misturas de solventes de alta e baixa polaridade são uma estratégia para a extração de uma gama maior de analitos, assim como extrações PLE sequenciais, em que a primeira é conduzida com solvente apolar e a segunda com solvente polar. Atualmente tem-se a preferência pelo uso de solventes reconhecidos como seguros (GRAS - *Generally recognized as safe*), tais como água, etanol, lactato de etila ou até mesmo D-limoneno, pois não geram resíduos a partir da neutralização dos extratos e não são tóxicos Carabias-Martínez et al. (2005 e Sánchez-Camargo et al. (2017).

Quando a água é utilizada como solvente em PLE a extração é denominada extração com água subcrítica (SWE - *Subcritical Water Extraction*) ou extração com água superaquecida (SHWE - *Superheated Water Extraction*) ou até mesmo extração com água quente pressurizada (PHWE - *Pressurized Hot-Water Extraction*). A SWE utiliza água em temperaturas entre 100 °C e 374 °C e pressão alta o suficiente para que a água permaneça no estado líquido. Em temperaturas e pressões acima de 374 °C e 220 bar a água passa a estar em condições supercríticas. As principais propriedades da água

são alteradas quando submetidas a diferentes condições de operação, como representado na Tabela 3 Bubalo et al. (2018 e Herrero et al. (2013).

A SWE é afetada diretamente pela constante dielétrica (ϵ) da água. Em condições ambientes a água é um solvente altamente polar, e sua constante dielétrica é de cerca de 80. Nessa condição a água é adequada para a extração de compostos altamente polares. Com o aumento da temperatura, de 100 a 374 °C, e sob alta pressão a polaridade da água diminui e torna-se favorável para a extração de compostos polares e apolares, devida a queda da constante dielétrica. A 250 °C e 50 bar a constante dielétrica da água em condição subcrítica é de 27, valor semelhante à de solventes orgânicos como o etanol ($\epsilon = 24$) e metanol ($\epsilon = 33$), frequentemente usados em PLE para recuperação de compostos de polaridade moderada Bubalo et al. (2018 e Herrero et al. (2013 e Ong et al. (2006).

TABELA 3 - PROPRIEDADES DA ÁGUA EM DIFERENTES CONDIÇÕES E ESTADOS.

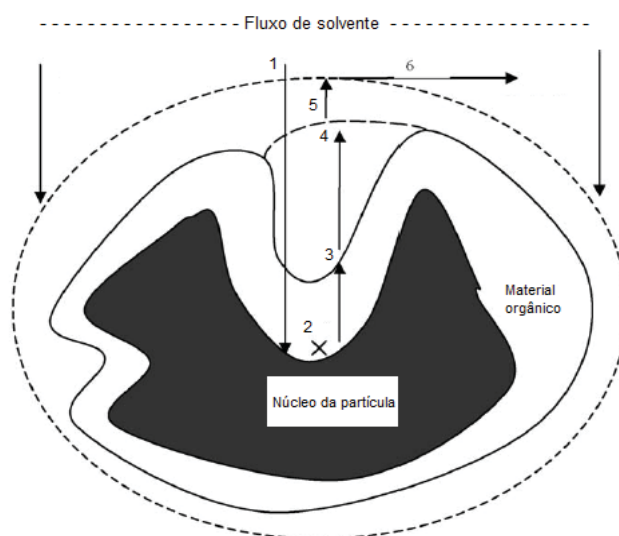
Propriedade	Água em condições normais	Água em condições subcríticas
T (°C)	25	350
P (bar)	1	250
ρ (Kgm ⁻³)	997,45	625,45
ϵ (-)	78,5	14,86
pKw (-)	14,0	11,5

Fonte: Adaptado de Brunner (1994).

Em temperaturas elevadas a tensão superficial da água diminui, permitindo a dissolução dos compostos mais rapidamente, pois a água é capaz de umedecer mais facilmente e penetrar na matriz sólida melhorando a taxa de difusão, devido à diminuição da viscosidade. Além das propriedades mencionadas, a constante de dissociação (Kw) da água também sofre alteração com o aumento da temperatura, de $1,0 \times 10^{-14}$ a 25 °C para $1,2 \times 10^{-12}$ a 350 °C, com valor máximo de $4,9 \times 10^{-12}$ a 250 °C, o que implica em seu poder de auto ionização Bubalo et al. (2018).

O processo da SWE pode ser definido em três fases, como representado na Figura 5. A primeira fase corresponde à difusão do soluto do núcleo da matriz até a superfície da matriz, na segunda ocorre transporte do soluto da superfície das partículas da matriz para o solvente e na terceira e última fase o soluto é eluído para fora da célula de extração Ong et al. (2006).

Estudos relatam que a SWE têm sido utilizadas na obtenção de antioxidantes (fenóis e flavonoides), óleos essenciais, ácidos graxos, óleos, carotenoides, açúcares, manitol, pectina, resorcinol e no isolamento de HAP's (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) do solo. Entretanto, a maioria dos estudos busca investigar a extração de compostos fenólicos de uma grande variedade de fontes, como em ervas, frutas, sementes, raízes, subprodutos e resíduos Bubalo et al. (2018).



Fonte: Adaptado de Ong, Cheong e Goh (2006).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO SISTEMÁTICA DAS FASES DE EXTRAÇÃO DA SWE: (1) ENTRADA RÁPIDA DE FLUIDO; (2) DESSORÇÃO DE SOLUTOS DOS LOCAIS ATIVOS DA MATRIZ; (3) DIFUSÃO DE SOLUTOS POR MEIO DE MATERIAIS ORGÂNICOS; (4) DIFUSÃO DE SOLUTOS POR MEIO DO FLUIDO ESTÁTICO EM MATERIAIS POROSOS; (5) DIFUSÃO DE SOLUTOS PELA CAMADA DE FLUIDO ESTAGNADO FORA DAS PARTÍCULAS; E (6) ELUIÇÃO DE SOLUTOS.

Outro solvente frequentemente utilizado em extrações com líquido pressurizado é o etanol em solução aquosa, denominada extração a quente de etanol aquoso pressurizado (PHAE - *Pressurized Hot Aqueous Ethanol*). Sarkar, Alvarez e Saldaña (2014), empregaram misturas de etanol e água (0 - 20 %) em temperaturas de 120 – 180 °C, tempos de confinamento de 2 – 20 min e vazões de 2 – 6 ml/min para a obtenção de carboidratos e compostos fenólicos a pressão constante de 15 MPa. E obtiveram 450,3 mg/g de carboidratos totais por g de casca de cevada e 80,3 mg/g de fenólicos totais por

g de casca de cevada em sua melhor condição de operação a 12% de etanol, 180 °C, com tempo de confinamento de 15 min e vazão de 5 ml/min.

A alta pressão empregada na PLE reduz a ocorrência de bolhas de ar dentro da matriz sólida, pois a presença dessas bolhas impede a chegada do solvente até o soluto desejado. Apesar da pressão ser um importante parâmetro de extração, não apresenta influência significativa na obtenção de compostos, desde que seja elevada o suficiente para manter o solvente em seu estado líquido Okiyama et al. (2019 e Sánchez-Camargo et al. (2017).

Uma vez que a temperatura e pressão de extração são selecionadas, o tempo de extração deve ser considerado. Em geral o tempo de extração é definido pelo tempo necessário para esgotar totalmente uma amostra, e pode ser dividido em tempo de extração estática e dinâmica. Na extração estática, certo volume de solvente, sob a condição de operação selecionada, é mantido em contato com a amostra por um determinado tempo, uma vez que o equilíbrio dos componentes presentes na amostra com os solubilizados no solvente é alcançado a eficiência de extração não muda. Tempos de 5 a 20 min são geralmente empregados na extração de bioativos. Na extração dinâmica, o solvente pressurizado flui constantemente pela amostra, evitando a formação do equilíbrio, favorecendo a extração completa da matriz. Neste caso a vazão do solvente influencia diretamente o tempo de extração necessário Sánchez-Camargo et al. (2017).

2.3.3 Extração com fluídos compressíveis

Técnicas de extração a base de fluidos compressíveis têm sido amplamente empregadas na obtenção de compostos bioativos provenientes de plantas e na recuperação de moléculas bioativas de biomassa no conceito de biorrefinaria e também na indústria alimentícia e farmacêutica em processos de purificação e extração livre de contaminação. A implementação dos princípios da química verde é uma das motivações para o uso dessa técnica na obtenção de bioativos como oleorresinas e compostos fenólicos, pois é capaz de processar o material, planta ou biomassa, a baixas temperaturas evitando a decomposição térmica de certos compostos e também o uso de

solventes orgânicos Benito-Román et al. (2019 e Gallego et al. (2019 e Lee et al. (2019 e Manjare; Dhingra (2019 e Spinelli et al. (2016).

A extração por fluidos compressíveis consiste basicamente na extração de substâncias solúveis de uma matriz sólida por uma solvente com alta compressibilidade em determinadas temperatura e pressão, que flui através do leito compactado no extrator solubilizando os componentes presentes na matriz e pelo aumento da temperatura e/ou a diminuição da pressão o extrato torna-se livre de solvente. Em matrizes vegetais o processo de extração ocorre em diferentes etapas, no instante em que o leito de extração é preenchido com o fluido compressível a matriz vegetal absorve o fluido, que expande sua estrutura celular e dilata os canais intercelulares de sua membrana diminuindo sua resistência à transferência de massa. Quando a dissolução dos componentes ocorre, o transporte de massa acontece da matriz interna para a superfície externa da partícula ou do leito, e então o solvente carrega o extrato para a fase “*bulk*” e pode ser removido Pereira; Meireles (2010 e Da Silva et al. (2016).

Os fluidos empregados nas extrações, podem ser utilizados em condições sub ou supercríticas. Fluidos supercríticos (SFs - *Supercritical Fluids*) possuem propriedades físico-químicas entre gases e líquidos (poder de solvatação, tensão superficial desprezível, elevada difusividade e baixa viscosidade). Quando empregados em condições de pressão e temperatura acima de seu ponto crítico adquirem a capacidade de comportar-se como líquido e gás, o que possibilita a modulação contínua do solvente, difusão do fluido para dentro da matriz e seletividade Bubalo et al. (2018 e Reverchon; De Marco (2006 e Yousefi et al. (2019).

O dióxido de carbono (CO₂) é comumente utilizado como fluido supercrítico em processos de extração, devido a sua moderada pressão crítica ($P_c = 74$ bar) e temperatura crítica ($T_c = 32$ °C). Sua baixa T_c é capaz de preservar e evitar a decomposição térmica de compostos presentes no extrato. O CO₂ é miscível em hidrocarbonetos de baixo peso molecular e em compostos orgânicos oxigenados facilitando a remoção desses extratos. Outras características do CO₂ como apresentar baixa toxicidade, não inflamável, não corrosivo, não poluente e com disponibilidade em alta pureza, além do baixo custo e de fácil remoção do extrato/produto fazem deste fluido um candidato em potencial para uso como solvente para extração de plantas naturais. Além disso a baixa entalpia de vaporização faz com que o CO₂ seja facilmente

vaporizado e separado do soluto. Em temperatura e pressão ambiente, o CO₂ não apresenta poder de solvatação, o que durante a despressurização da corrente de saída do extrator na SFE facilita sua eliminação do extrato Bubalo et al. (2018 e Mantell et al. (2013).

A principal desvantagem do scCO₂ é sua baixa polaridade, dificultando a extração de compostos de alta polaridade, o que para alguns tipos de matrizes torna a extração não eficiente. A adição de modificadores de polaridade (cossolventes) aumenta a solubilidade do soluto e por sua vez a eficiência da extração, pois apresentam ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e outras interações e com o analito de interesse. Em geral a quantidade de cossolvente adicionada na extração é de 1 a 15%. Em alguns casos acima de certa proporção a ação do cossolvente não faz mais efeito. Entre os cossolventes mais empregados está o metanol, utilizado em uma grande variedade de matrizes, mas devido a sua alta toxicidade vem sendo evitado, dando espaço para o etanol, comumente utilizado na extração de compostos bioativos. A escolha do cossolvente adequado está relacionada a sua afinidade com os compostos de interesse da extração Pereira; Meireles (2010 e Da Silva et al. (2016 e Spinelli et al. (2016).

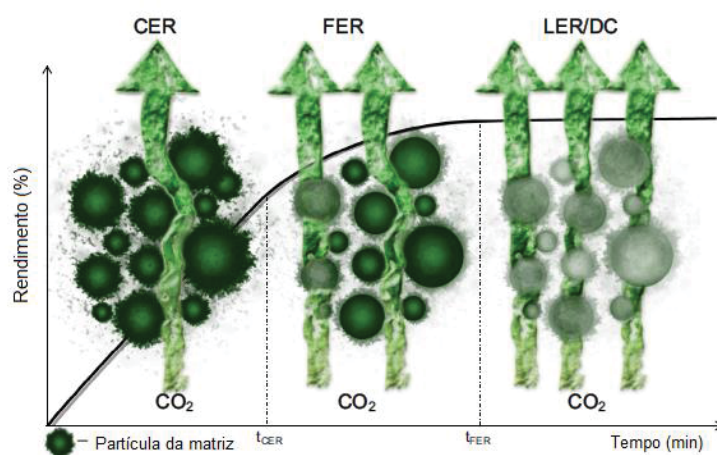
Spinelli et al. (2016) utilizaram o método de SFE com scCO₂ e etanol como cossolvente em diferentes temperaturas (40, 50 e 60 °C), pressões (15, 25 e 35 MPa) e razão solvente/co-solvente de scCO₂ + 20, 40 e 60% de etanol (v/v), na extração de biocompostos do bagaço de malte de cevada e obtiveram para a melhor condição (40 °C, 35 MPa e scCO₂ + 60% de etanol), após um período de 240 min, 0,35 ± 0,01 mg/g bagaço de malte de compostos fenólicos, 0,22 ± 0,01 mg/g bagaço de malte de flavonoides e 2,09 ± 0,04 %/g bagaço de malte de compostos com propriedades antioxidantes.

Por outro lado, para a extração de compostos lipossolúveis, o propano tem sido apresentado como uma alternativa adequada ao CO₂, uma vez apresenta alto poder de solvatação de compostos apolares de alta cadeia molecular, tais como triacilgliceróis; requer baixas pressões de operação, que resultam em maiores rendimentos de óleo, além de ser relativamente barato e não gerar resíduos tóxicos. O propano apresenta pressão e temperatura crítica de 369,67 K e 4,3 MPa, respectivamente. No entanto, é frequentemente empregado nas extrações em condições a baixo de seu ponto crítico Cuco et al. (2019 e Fetzer et al. (2021).

Fetzer et al. (2018) realizaram a extração de sementes de baru (*Dipteryx alata* vogel) utilizando a técnica de extração por propano comprimido e CO₂ supercrítico com a adição de etanol como cossolvente. O maior rendimento global obtido foi de 36,87% quando empregado propano comprimido a 10 MPa, 60 °C, com 10 min de tempo de confinamento e tamanho de partícula de 0,5 mm.

2.3.4 Cinética e fases de extração

Os dados cinéticos obtidos nas extrações por líquidos pressurizados e por fluidos compressíveis (sub e/ou supercríticos) são geralmente representados em um gráfico da massa extraída acumulada (rendimento da extração acumulado) versus o tempo de extração. As curvas gerais de extração (OEC – *Overall Extraction Curves*) são divididas em três fases, que correspondem aos períodos de extração, as quais podem ser observadas na Figura 6, que utiliza dióxido de carbono supercrítico como solvente Da Silva et al. (2016).



Fonte: Adaptado de da Silva et al. (2016).

FIGURA 6 - PERIODOS DE EXTRAÇÃO E SUA CURVA.

A primeira fase corresponde à taxa constante de extração (CER – *Constant Extraction Rate*), em que os componentes são transportados do interior para o exterior da célula vegetal por meio da convecção, mecanismo dominante de transferência de massa nessa etapa e a maior parte do soluto é recuperada. A segunda fase é denominada período de queda da taxa de extração (FER – *Falling Extraction Rate*), na qual a

camada de óleo superficial de soluto que envolve a célula começa a falhar e a transferência de massa ocorre pela combinação do mecanismo de convecção e difusão. A terceira e última fase corresponde ao período de baixa taxa de extração (LER – *Low Extraction Rate*) ou controlada pela difusão (DC – *Diffusion-Controlled*), na qual a camada de óleo praticamente desaparece e a difusão é o mecanismo de transferência de massa dentro das partículas sólidas Da Silva et al. (2016).

Nos fenômenos de solubilidade, as interações matriz-analito são mais fracas e o processo depende a partição do analito entre a matriz e o fluido de extração. Enquanto, em fenômenos de transferência de massa em que a extração é controlada por difusão geralmente apresentam fortes interações entre matriz-analito ou longos caminhos que o analito precisa percorrer pela matriz (MUSTAFA; TURNER, 2011).

2.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O bagaço de malte é o resíduo mais gerado na produção cervejeira, destinado à ração animal ou utilizado como cobertura de solo. Vários estudos buscam demonstrar a viabilidade de transformar esse resíduo em diferentes produtos de valor agregado para garantir sua reutilização sustentável.

Metodologias de extração consolidadas utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos e demandam um longo período de extração. Com a crescente demanda por alternativas menos poluentes, novas técnicas de extração mais seguras e eficientes, baseadas em conceitos de química verde têm sido estudadas. A extração do bagaço de malte foi relatada por poucos pesquisadores utilizando técnicas como a PLE e $scCO_2$, o que torna o estudo dessas técnicas necessário, com o aprimoramento de parâmetros e otimização dos processos. Em função das características do bagaço de malte, principalmente na variabilidade de compostos e classes químicas presentes no bagaço, a estratégia de recuperação máxima desses compostos passa necessariamente por uma extração com diferentes solventes, por exemplo, usando solventes apolares seguido de solventes polares. Ainda, as medidas de curvas de extração e a obtenção de extratos brutos para posterior fracionamento são assuntos pouco estudados do ponto de vista de engenharia de processos. Desta forma, com base no estudo realizado, o presente

trabalho propõe a avaliação das metodologias de extração do bagaço de malte pelas técnicas de extração por líquidos pressurizados (PLE) e remoção da fração lipídica por fluidos compressíveis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA

As amostras de bagaço de malte foram fornecidas pela microcervejaria OPA Bier (Joinville, Santa Catarina, Brasil), com teor de umidade e compostos voláteis iniciais de $80,5 \pm 0,1\%$, determinado gravimetricamente. O material foi seco em estufa com circulação de ar a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h até umidade e compostos voláteis constantes e triturado em um liquidificador comercial (Modelo Liq Art, Walita) como representado na Figura 9. As amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno a vácuo e armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Fonte: A autora.

FIGURA 7 - BAGAÇO DE MALTE APÓS SECAGEM E MOAGEM.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Após a secagem do material, a amostra foi submetida às análises de teor de umidade, determinação de diâmetro médio de partícula, densidade e porosidade. Bem como, caracterizado com base na metodologia aplicada pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL), do Departamento de Energia dos Estados Unidos da

América. Foram quantificados os teores de cinzas, lignina insolúvel e solúvel, carboidratos estruturais e extraíveis totais.

3.2.1 Teor de umidade e compostos voláteis

O teor de umidade e compostos voláteis (U%) foi determinado gravimetricamente por meio da secagem das amostras em estufa a 105 °C durante 3 horas. A análise foi realizada em triplicata com base na NREL/TP-510-42621 proposta por Sluiter et al. (2008b). A Equação 1 é utilizada para a determinação do percentual de umidade, em que $m_{inicial}$ é a massa de bagaço de cevada antes da secagem (g) e m_{final} é a massa de bagaço de cevada após a secagem (g).

$$U(\%) = \frac{m_{inicial} - m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

3.2.2 Diâmetro médio de partícula

O perfil granulométrico das partículas foi determinado segundo metodologia descrita por Gomide (1983) para material particulado heterogêneo. A análise foi realizada em triplicata utilizando peneiras (tipo série Tyler, W.S. Tyler, Wheeling, EUA) de mesh 8, 10, 14, 20, 28 e 35 durante 15 min em agitador mecânico vertical (Modelo 110/220 - Bertel Industrial Metalurgia LTDA), na peneira de mesh 8 localizada no topo do agitador foram adicionados 100 g de bagaço de cevada. Após a agitação, o material retido em cada peneira foi pesado e por meio da Equação 2 calculou-se a fração de massa retida, em que $m_{bagaço}$ é a massa total de bagaço de cevada (g) e $m_{bag./peneira}$ é a massa de bagaço retida em cada peneira (g).

$$X_i = \frac{m_{bag./peneira}}{m_{bagaço}} \quad (2)$$

Para o cálculo do diâmetro médio (D_m) de partícula utilizou-se a Equação 3, segundo metodologia descrita por Gomide (1983), em que X_i é a fração de massa retida na peneira e D_i o diâmetro de abertura da peneira (mm).

$$D_m = \sum X_i D_i \quad (3)$$

3.2.3 Densidade e porosidade

A densidade real foi medida por meio de um picnômetro de gás hélio conforme o manual de operação do picnômetro automático (Quantachrome Ultrapyc 1200e) na Central Analítica – Instituto de Química da UNICAMP. A medida da densidade foi realizada por meio da variação da pressão do gás hélio em uma câmara de determinado volume. Dessa forma calculou-se o volume real de um sólido.

Para o cálculo da densidade aparente (ρ_a) das partículas utilizou-se a Equação 4, em que m_{leito} é a quantidade de massa de bagaço (g) de cevada que preenche o leito de extração e V_{leito} é o volume do leito (cm^3) de extração.

$$\rho_a = \frac{m_{leito}}{V_{leito}} \quad (4)$$

A porosidade do leito foi determinada por meio da Equação 5, utilizando a densidade real ρ_r (g/cm^3) e da densidade aparente ρ_a (g/cm^3).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (5)$$

3.2.4 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado por meio da incineração das amostras secas a 575 ± 25 °C por 4 horas, com base na NREL/TP-510-42622 Sluiter et al. (2005). A análise foi realizada em triplicata e o teor foi determinado pela Equação 6, na qual $m_{c,initial}$ é a massa de bagaço de cevada antes da incineração (g) e $m_{c,final}$ é a massa de bagaço de cevada após a incineração (g).

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{m_{c,initial} - m_{c,final}}{m_{c,initial}} \times 100 \quad (6)$$

3.2.5 Lignina insolúvel e solúvel

A quantidade de lignina presente no bagaço de malte foi determinada com base no método proposto por Sluiter et al. (2004) (NREL/TP-510-42618) que quantifica teores de lignina insolúvel em meio ácido (determinado por gravimetria) e lignina solúvel em meio ácido (determinado por espectroscopia no ultravioleta). O método consiste na hidrólise de aproximadamente 0,3 g de amostra em tubos de ensaio com 3 ml de ácido sulfúrico 72% (m/m) por 1 h a 30 °C, com agitação constante utilizando um bastão de vidro a cada 5 min. Em seguida, o material foi transferido para um frasco de vidro e diluído a 4% adicionando 84 ml de água destilada. Os frascos foram fechados, homogeneizados e condicionados em autoclave a 121 °C por 1 h, transcorrido o tempo, os frascos foram retirados da autoclave e filtrados em cadinho de Gooch a temperatura ambiente.

Após a filtração, os cadinhos foram novamente secos em estufa a 105 °C por 12 h, até massa constante. Em seguida, os cadinhos de Gooch foram pesados e a massa do resíduo retido no cadinho foi usada para calcular a porcentagem de lignina insolúvel na amostra em relação à massa seca do material analisado. O cálculo foi realizado pela Equação 7, em que $m_{residuo}$ é a massa seca residual retida no cadinho, m_{cinzas} é a massa de cinzas presente no resíduo insolúvel obtida pelo método descrito no Item 3.3.1 e $m_{amostra}$ é a massa inicial de amostra em base seca empregada.

$$LIA (\%) = \frac{m_{residuo} - m_{cinzas}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (7)$$

O filtrado foi avolumado em 250 ml e esta fração foi submetida à análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 240 nm para determinação da lignina solúvel em ácido (LSA), realizada de acordo com a Equação 8. UV_{ABS} é a absorbância em 240 nm, ϵ_{ml} é a absortividade molar da lignina de bagaço de malte neste comprimento de onda (25 L.g⁻¹.cm⁻¹), m_{seca} é a massa seca do material submetido ao ensaio e CP é o comprimento do percurso de leitura da absorbância em cm.

$$LSA (\%) = \frac{UV_{ABS} \times Volume_{filtrado} \times Diluição}{\epsilon_{ml} \times m_{seca} \times CP} \times 100 \quad (8)$$

A determinação da lignina total (LT) foi realizada por meio do somatório da lignina solúvel (LSA) e lignina insolúvel (LIA), como apresentado na Equação 9.

$$LT (\%) = LSA (\%) + LIA (\%) \quad (9)$$

3.2.6 Carboidratos estruturais

A quantidade de carboidratos foi determinada utilizando o hidrolisado obtido na determinação de lignina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com base na metodologia proposta por Sluiter et al., (2004) (NREL/TP-510-42618). O conteúdo de carboidratos foi analisado pelo CLAE (modelo Shimadzu LC20AD), fornecido com um amostrador automático (modelo SIL 10A), um desgaseificador de fase móvel (modelo DGU 14 A), um aquecedor de coluna (modelo CTO 10A) e detectores nos modelos RID10A para índice de refração e SPD-M10Avp para espectrofotometria ultravioleta. A coluna utilizada foi a Rezex RHM (Phenomenex 300 x 7,8 mm) a 65 °C, precedida por uma pré-coluna Phenomenex (8,0 x 3,2 mm) e eluída com fase móvel de 5 mmol.l⁻¹ de H₂SO₄ a uma vazão de 0,6 ml.min⁻¹. As quantificações foram feitas por padronização, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado nas concentrações de 0,08 a 0,8 g/L de celobiose, 0,2 a 2 g/L de glucose, 0,1 a 1 g/L de xilose, 0,08 a 0,8 g/L de arabinose e de 0,1 a 1 g/L de ácido acético. Para os cálculos, também foram considerando seus respectivos fatores de hidrólise, convertendo cada componente em seu derivado anidro: 0,95 para a celobiose, 0,90 para glucose, 0,88 para xilose e arabinose, e 0,72 para ácido acético, que são devidos à incorporação de uma molécula de água a cada etapa de hidrólise ácida de uma ligação glicosídica, conforme descrito por Sluiter et al., (2004).

3.2.7 Extraíveis totais

A determinação de extraíveis totais foi realizada de acordo com a NREL/TP-510-42619, descrita por Sluiter et al. (2008). O ensaio visa quantificar extraíveis em duas etapas (água e etanol) em amostras de biomassa que contêm uma quantidade significativa de material solúvel em água. Foram realizadas duas extrações Soxhlet convencionais de forma consecutiva. A primeira extração foi realizada com água

destilada como solvente durante 6 horas, e com a parte sólida residual da primeira extração realizou-se a segunda extração com o solvente etanol (95 % de pureza), durante mais 6 horas, totalizando 12 horas de extração. Os extraíveis totais em água e etanol foram quantificados pela Equação 10, em que $m_{\text{extraíveis}}$ (g) é a massa de extrato obtido na extração e m_{amostra} (g) é a massa da amostra de bagaço de cevada utilizada.

$$\text{Extraíveis totais (\%)} = \frac{m_{\text{extraíveis}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (10)$$

3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE

Para a obtenção dos extratos brutos de bagaço de malte, foram utilizadas as técnicas de extração Soxhlet como comparativo a extrações por líquidos pressurizados. Foram empregadas também extrações por fluidos comprimidos com o objetivo de remoção da fração lipossolúvel presente no BM.

3.3.1 Extração Soxhlet

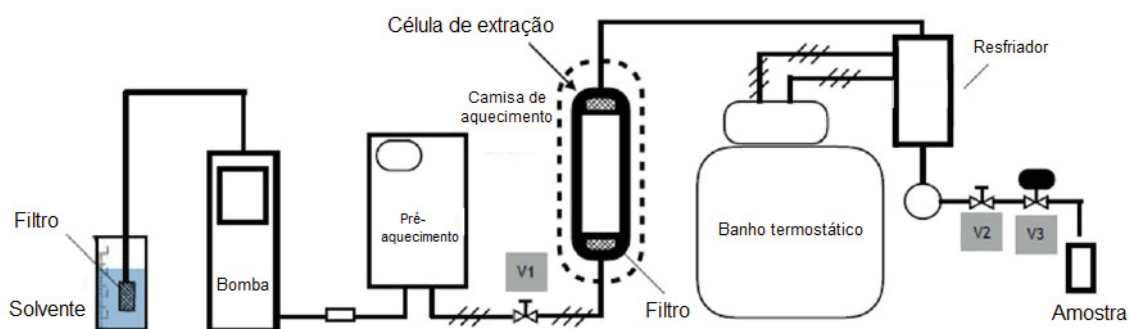
Extrações Soxhlet foram realizadas para determinar o teor total de extrato bruto como comparativo às extrações com líquidos pressurizados. Foram selecionados os solventes, água destilada, etanol (Neon, 99,8% de pureza), acetato de etila (Neon, 99,5% de pureza), n-hexano (Neon, 99,5% de pureza) e acetona (P.A.). Extrações sequenciais na ordem água – etanol e etanol – água também foram realizadas com a finalidade de avaliar o rendimento global de extrações pressurizadas de misturas etanol/água.

Para as extrações foram utilizados 3 g de bagaço de malte seco e 175 ml de solvente. Os extratos foram secos em um evaporador rotativo a vácuo (IKA, Modelo RV 10 digital) e então seco em estufa de circulação de ar (IKA, Nova Ética, modelo 400-2) até massa constante a 60 °C. Os extratos foram armazenados em frascos de âmbar e mantido sobre refrigeração a -4 °C. Os rendimentos de extração (R) foram calculados usando a Equação 11, em que m_{extrato} (g) é a massa de extrato obtido na extração e $m_{\text{bagaço}}$ (g) é a massa da amostra de bagaço de cevada utilizada.

$$R (\%) = \frac{m_{extrato}}{m_{bagaço}} \times 100 \quad (11)$$

3.3.2 Extrações com líquidos pressurizados (PLE)

Os experimentos de extração com líquidos pressurizados foram realizados em unidade de extração, de acordo com a Figura 8. A unidade compreende uma bomba de alta pressão, um sistema de pré-aquecimento, uma célula de extração encamisada, um sistema de refrigeração e um ponto de coleta de extrato.



Legenda: V1 e V2 - válvulas cilíndricas, V3- válvula reguladora *back pressure*.
Fonte: Adaptado de Dias et al. (2018).

FIGURA 8 - UNIDADE DE EXTRAÇÃO PRESSURIZADA.

O solvente em condição ambiente foi transferido em fluxo volumétrico constante por uma bomba de alta pressão (Eldex, modelo 2SM, EUA) responsável pela pressurização do sistema. O solvente foi então pré-aquecido por um sistema de serpentinas, composto de uma válvula cilíndrica, e bombeado até um vaso extrator semi-batelada encamisado de 20,44 cm³ de volume interno (17,2 cm de comprimento e 1,24 cm de diâmetro). As extremidades inferior e superior do extrator foram revestidas com filtros de aço inoxidável com tamanho de poro de 0,5 mm para evitar o arraste de partículas sólidas provenientes da amostra. A camisa de aquecimento da célula de extração é composta de uma resistência elétrica e termopares, responsáveis pelo controle da temperatura de extração desejada. O extrato que flui da célula de extração é resfriado a 40 °C por um sistema composto por um vaso encamisado e um banho termostático. Após o sistema de refrigeração, a tubulação consta de um manômetro e de

uma válvula de contrapressão (V3 - *back pressure*) responsável pelo controle da pressão do sistema e por uma válvula cilíndrica (V2) responsável controle de tempo de preenchimento do volume da célula de extração.

As extrações foram realizadas com água destilada, etanol (Neon, 99,8% de pureza) e frações volumétricas de etanol/água (EtOH/água) de 0, 0,5 e 1 como líquidos pressurizados nas temperaturas de 60, 90 e 120 °C a pressão constante de 100 bar para garantir que os solventes permaneçam no estado líquido. Extrações adicionais foram realizadas com frações volumétricas de 0,25 e 0,75 EtOH/água.

A célula de extração foi preenchida com aproximadamente 6 g de bagaço de malte e a linha total de extração com aproximadamente 500 ml de solvente. A extração iniciou-se em duas etapas, denominadas extração estática e dinâmica. Quando todo o volume da célula de extração foi preenchido com o solvente e a temperatura e pressão de extração estabilizaram iniciou-se o tempo de confinamento, definido em 15 min para todos os ensaios para garantir o equilíbrio térmico-mecânico do sistema. Com o término do tempo de confinamento, a etapa correspondente à extração dinâmica iniciou-se, com vazão constante de solvente de 2, 4 e 6 ml/min, e a solução de extraíveis (solvente e extrato) foi coletada em balões volumétricos de fundo redondo de 50 ml durante 1 h de extração dinâmica.

Parte de cada amostra dos extratos em solução (aproximadamente 5 ml) foram utilizados para determinar o rendimento das extrações ao longo do tempo. Alíquotas fixas para todos os pontos foram coletadas e submetidas ao processo de evaporação do solvente em estufa a 60 °C para as soluções etanólicas e 80 °C para as soluções aquosa durante 24 h e então a temperatura foi elevada a 105 °C para todos os extratos até peso constante. Os volumes remanescentes dos extratos foram reunidos e armazenados em frascos âmbar sob refrigeração a aproximadamente -4 °C para análises posteriores.

3.3.2.1 Planejamento Experimental

O planejamento experimental para as extrações com água, etanol e razão EtOH/água foi determinado a partir de três variáveis de processo, temperatura (°C), razão etanol/água e vazão volumétrica de solvente (ml/min) em dois níveis (X1: 60-120 °C, X2: 0-1, X3: 2-6 ml/min), com triplicata no ponto central. Na Tabela 4, está

representado o planejamento experimental Box-Behnken (3k-p) com três fatores e triplicata no ponto central, que corresponde a um total de 15 experimentos aleatórios, com os valores para as variáveis codificadas e reais dos experimentos.

TABELA 4 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN (3k-p) COM PONTO CENTRAL PARA AS EXTRAÇÕES POR LÍQUIDOS PRESSURIZADOS A 100 BAR POR 60 MIN.

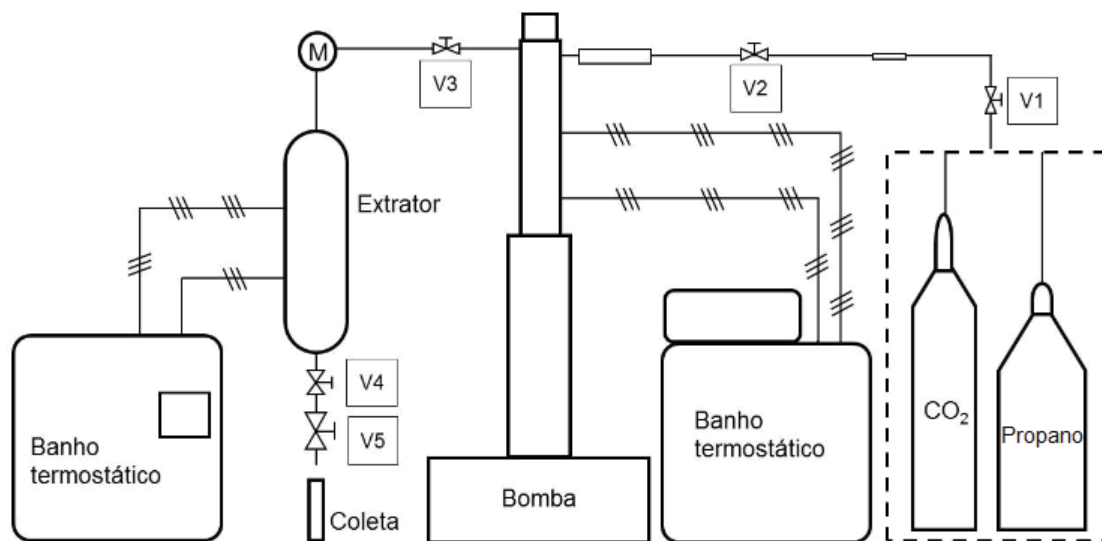
Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais		
	T	EtOH/Água	Vazão	T (°C)	EtOH/Água (%)	Vazão (ml/min)
1	-1	-1	0	60	0,0	4
2	+1	-1	0	120	0,0	4
3	-1	+1	0	60	1,0	4
4	+1	+1	0	120	1,0	4
5	-1	0	-1	60	0,5	2
6	+1	0	-1	120	0,5	2
7	-1	0	+1	60	0,5	6
8	+1	0	+1	120	0,5	6
9	0	-1	-1	90	0,0	2
10	0	+1	-1	90	1,0	2
11	0	-1	+1	90	0,0	6
12	0	+1	+1	90	1,0	6
13 (C)	0	0	0	90	0,5	4
14 (C)	0	0	0	90	0,5	4
15 (C)	0	0	0	90	0,5	4

Legenda: T – temperatura, C – ponto central.

Fonte: A autora.

3.3.3 Extração por fluidos compressíveis

Os experimentos de extração com fluidos compressíveis foram realizados em uma unidade de extração composta por um cilindro de solvente (propano ou CO₂), acoplado a uma bomba seringa de alta pressão (ISCO, modelo 500D, Lincoln, NE 68504, USA), como representado na Figura 9. Um banho termostático para manter a temperatura da bomba a 10 °C. O solvente flui por meio da bomba até o vaso extrator encamisado de 62,4 cm³ volume interno (22 cm de comprimento e 1,9 cm de diâmetro). A camisa do extrator é ligada a um banho termostático que garante a temperatura de extração desejada. Na extremidade inferior do vaso de extração estão conectadas duas válvulas como ponto de coleta de amostras, uma válvula agulha responsável pelo controle de fluxo e uma válvula agulha com regulagem micrométrica para o controle da pressão.



Legenda: V1 e V2 - válvulas do cilindro de propano; V3 - válvula esfera; V4 - válvula agulha e; V5 - válvula agulha com regulagem micrométrica.

Fonte: Adaptado de Araújo (2019).

FIGURA 9 - UNIDADE DE EXTRAÇÃO DE FLUIDOS COMPRESSÍVEIS.

As extrações foram realizadas com propano (White Martins SA, 99.5% pureza) nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C e pressão constante de 100 bar e CO₂ (White Martins S.A., 99.5% pureza na fase líquida) nas temperaturas de 40 e 80 °C e pressões de 150 e 250 bar, além da adição de etanol (Neon, 99,8% de pureza) como cossolvente. As extremidades inferior e superior do extrator foram revestidas com algodão para evitar o arraste de partículas sólidas da amostra para o interior das tubulações, e então aproximadamente 12 g de bagaço de malte foram adicionados no leito de extração.

O processo de extração é performado em duas etapas, a primeira corresponde à extração estática, período em que todo o vaso extrator é preenchido com solvente e a pressão de extração desejada é atingida, em conjunto com o tempo de confinamento, tempo em que a amostra é mantida em contato com o solvente, podendo absorvê-lo. O tempo de confinamento foi definido em 30 min para garantir o equilíbrio térmico-mecânico do sistema. Transcorrido o tempo de extração estática, iniciou-se a etapa correspondente à extração dinâmica, em que o solvente flui continuamente a vazão constante de 2 cm³/min até o fim da extração. Os extratos obtidos foram coletados em tubos de ensaio no ponto de coleta e armazenados em frascos âmbar sob refrigeração a aproximadamente -4 °C.

3.3.4 Extrações sequencias

Extrações sequenciais foram realizadas utilizando a técnica de extração com fluido compressível seguido de extração por líquido pressurizado. Extrações utilizando propano comprimido foram realizadas a pressão e vazão volumétrica constantes de 100 bar e $2,0 \pm 0,2 \text{ cm}^3/\text{min}$, respectivamente, e temperaturas de 40, 60 e 80 °C conforme descrito no item 3.3.3. Com o resíduo sólido das extrações, foram realizadas extrações com líquidos pressurizados na fração volumétrica de 0,5 EtOH/Água a 120 °C, 2 ml/min e 100 bar, conforme descrito no item 3.3.2.

3.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS DO BAGAÇO DE MALTE

Para a avaliação da influência dos diferentes solventes e condições experimentais dos extratos obtidos, neste trabalho foram avaliadas as composições dos extratos de Soxhlet por meio das análises de cromatografia gasosa com detector de massa (CG-MS). Os demais extratos foram caracterizados por análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e açúcares redutores.

3.4.1 Análise dos extratos de Soxhlet via CG-MS

Os extratos provenientes das extrações Soxhlet foram submetidos à cromatografia gás com detector de massa (CG-MS) com a finalidade de identificar compostos de diferentes classes obtidos com o uso de diferentes solventes. As amostras de extratos foram primeiramente derivatizadas, para esse processo 5 mg de amostra foram dissolvidas em 200 µl de piridina e misturadas com 200 µl de MSTFA a 30 °C durante 20 min. A solução derivatizada foi completada até 1 ml com diclorometano e injetada. A análise foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu QP2010 SE, com uma coluna VF-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), seguido pela detecção por espectrometria de massa operando com fonte ionizante por impacto de elétrons a 70 eV. O equipamento foi operado no modo split (10:1) com volume de 1 µl, o qual foi injetado com gás hélio a vazão total de 19,5 ml/min. O injetor e a interface do espectrômetro de massa foram ajustados a 200 °C e 260 °C, respectivamente, e a temperatura da coluna foi programada para iniciar a 60 °C, permanecer por 2 min, e aquecer a uma taxa de 4 °C/min, até 100

°C e permanecendo por 4 min. Ao atingir 180 °C, com nova taxa de 15 °C/min atingiu 250 °C e foi mantida isotermicamente por 10 min, resultando em 51 min de análise. Os espectros de massa foram coletados a cada 0,3 s na faixa de 70-1000 m/z. A identificação dos compostos foi realizada com os espectros de massa de cada banda em relação ao banco de dados da biblioteca do NIST (*National Institute of Standards and Technology*).

3.4.2 Compostos fenólicos totais (CFT)

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados com base no método Folin-Ciocalteu, descrito primeiramente por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). O método utiliza ácido gálico como referência e baseia-se na oxidabilidade dos fenóis no pH básico, enquanto o reagente Folin-Ciocalteu funciona como um agente oxidante. Aproximadamente 50 mg de extrato foram solubilizados em 2 ml de solução metanólica (80 %, v/v). Alíquotas de 0,1 ml desta solução foram diluídas com 0,4 ml de metanol e adicionados a 2,5 ml de solução de Folin-Ciocalteu 0,2 mol/l, diluído 10 vezes com água destilada. Após 3 min foram adicionados 2,0 ml de solução saturada de carbonato de sódio (75 g/l). A mistura foi mantida a temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 120 min. A leitura da absorbância foi realizada, em espectrofotômetro, a 760 nm. Os resultados são expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de extrato (mg AGE/ 100 g extrato).

3.4.3 Flavonoides Totais (FT)

Os flavonoides totais foram quantificados com base no método proposto por Zhishen, Mengcheng e Jianming, (1999). Alíquotas (0,1 a 0,3 ml) de amostras, preparadas conforme descrito anteriormente, na determinação de CFT, e metanol até 0,4 ml, 1,6ml de água destilada e 0,12ml de NaNO₂ (5% m/v) foram adicionados aos frascos âmbar e misturados. Após 5 min, 0,12 ml de AlCl₃ (10% m/v) foi adicionado; e após 5min, foram adicionados 0,8 ml de NaOH (1 mol/l) e 0,96 ml de água destilada. A absorbância foi medida a 510 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Global Analyzer). A catequina foi utilizada como referência e os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina por 100 g de amostra (mg CE/100 g).

3.4.4 Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. Inicialmente, os extratos de bagaço de malte foram preparados conforme descrito no item de determinação de compostos fenólicos totais (CFT).

3.4.4.1 Método ABTS

A atividade antioxidante foi determinada a partir do ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) com sequestro de radicais, com base no procedimento descrito por Re et al. (1999). Primeiramente, o radical cátion $ABTS^{*+}$ foi preparado a partir de uma solução aquosa de ABTS (7 mmol/l). Para tanto, 5 ml desta solução foi misturada a 0,88 ml de uma solução de persulfato de potássio (140 mmol/l) e mantido a temperatura ambiente e ausência de luz durante 16 h, para disponibilizar o $ABTS^{*+}$ na solução estoque. A solução estoque de $ABTS^{*+}$ foi diluída em etanol, até se obter uma solução trabalho com absorvância de 0.700 ± 0.020 a 734 nm.

Para a análise dos extratos, 0,1 ml das soluções metanólicas dos extratos de BM foram adicionados a 3,9 ml da solução trabalho de $ABTS^{*+}$ e homogeneizados. A solução resultante foi mantida na ausência de luz por 6 min. Após esse tempo a absorvância foi medida a 734 nm em um espectrofotômetro UV-vis (Global Analyzer). O ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, EUA), foi utilizado como padrão antioxidante para construção da curva de calibração. Os resultados de AA foram expressos em μmol de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TE) por 100 g de extrato ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$).

3.4.4.2 Método DPPH

A determinação da atividade antioxidante (AA) pelo método DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil) foi realizada baseando-se em Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995). 0,1 ml da solução metanólica dos extratos de bagaço de malte, descrita em CFT, foram adicionados a 3,9 ml da solução recém preparada de DPPH em metanol (0,06 mmol/l) e agitada até homogeneização. A mistura resultante foi mantida em um ambiente sem incidência de luz durante 60 min. Após este período, a perda de coloração

do radical DPPH foi mensurada através da absorbância, medida a 515 nm em um espectrofotômetro de UV-vis (Global Analyzer). O branco foi preparado contendo apenas metanol utilizado nas soluções. Foi utilizado também um controle contendo 0,1 ml de metanol e 3,9 ml da solução de DPPH. O ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, EUA), foi utilizado como padrão antioxidante para construção da curva calibração. Os resultados de AA foram expressos em μmol de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TE) por 100 g de extrato ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$).

3.4.4.3 Método FRAP

O ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) foi conduzido de acordo com Benzie e Strain (1999). Dentro de frascos âmbar, 100 μl de soluções de amostras preparadas e 3 ml do reagente FRAP, foram misturados. O reagente FRAP consistia em um mistura de solução tampão de acetato de sódio 300 mmol.l^{-1} (pH 3,6), 10 mmol.l^{-1} de solução de TPTZ em 40 mmol.l^{-1} de HCl e 20 mmol.l^{-1} de solução de $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ em proporção de volume de 10:1:1. Após a adição do reagente FRAP, os frascos foram colocados em banho-maria em $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. A absorbância da mistura foi medida em 593 nm, 5 min após o período de incubação. Para a etapa de quantificação, uma curva analítica Trolox foi construída, e os resultados foram expressos em μmol de atividade antioxidante equivalente ao Trolox por 100 g de extrato ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$).

3.4.5 Açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) presentes nos extratos obtidos foram determinados pelo método colorimétrico DNS Miller (1959). Os extratos foram solubilizados em água destilada, reagiram com o reagente DNS em banho térmico a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. Após a reação, a mistura foi resfriada até a temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 540 nm.

O ART foi determinado após hidrólise ácida com ácido clorídrico (37% p/p) a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min e neutralização com hidróxido de sódio (6 mol/l) Torres-Mayanga et al. (2019). A quantificação de AR e ART foi realizada por meio de curva de calibração

elaborada com glicose. Os resultados foram expressos em g de glicose equivalente por 100 g de amostra (g GE/100 g).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados de caracterização de matéria-prima bagaço de malte, extrações Soxhlet, extração por líquidos pressurizados e fluidos compressíveis. Assim os resultados de caracterização dos extratos obtidos pelos diferentes solventes e processos.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O bagaço de malte foi submetido ao processo de secagem para redução da umidade e compostos voláteis. O resultado foi uma redução de $80,5 \pm 0,1\%$ para $4,9 \pm 0,1\%$ neste parâmetro. Após ser triturado, o bagaço apresentou diâmetro médio de partícula igual a $1,2 \pm 0,4$ mm, de acordo com o perfil de diâmetro de partículas apresentado na Tabela 5, densidade real de $1,368 \text{ g/cm}^3 \pm 0,001$, densidade aparente de $0,232 \text{ g/cm}^3$ e porosidade de 0,830.

TABELA 5 - PERFIL DE DIÂMETRO DE PARTICULAS DO BAGAÇO DE MALTE.

Mesh	Fração de Massa Retida (%)	Diâmetro Médio (mm)
8	$6,7 \pm 0,8$	$0,159 \pm 0,019$
10	$24,6 \pm 1,4$	$0,406 \pm 0,023$
14	$27,4 \pm 0,2$	$0,320 \pm 0,003$
20	$30,0 \pm 0,9$	$0,250 \pm 0,008$
28	$7,8 \pm 0,5$	$0,047 \pm 0,003$
<35	$2,3 \pm 0,3$	$0,010 \pm 0,001$

Fonte: A autora.

Para aumentar a taxa de extração, a matriz sólida deve ser triturada aumentando a área de transferência de massa. Normalmente o tamanho de partícula de matrizes naturais utilizado para a extração é de 0,25 a 1,80 mm. No entanto, partículas muito pequenas devem ser evitadas, pois podem promover a compactação do leito levando ao aumento da resistência interna à transferência de massa, canalizando o fluido/líquido extrator de forma não uniforme. A porosidade do leito influencia na transferência de

massa. De modo geral o aumento da porosidade da matriz aumenta a eficiência de extrações rápidas, principalmente no caso de extrações com líquido pressurizado Pereira; Meireles (2010).

A composição química do bagaço de malte é apresentada na Tabela 6. O BM, formado basicamente pelas cascas dos grãos de malte, pericarpo e endosperma apresentou teor de cinzas quantificado em $3,3 \pm 0,1\%$, resultado em conformidade com a literatura que apresenta valores de 3,07 a 3,90%, podendo chegar até 5% Balogun et al. (2017 e Paz et al. (2018 e Torres-Mayanga et al. (2019).

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE.

Composição	Percentual (%)
Umidade	$4,9 \pm 0,1$
Cinzas	$3,3 \pm 0,1$
Proteínas	-
Glucose	$25,4 \pm 1,3$
Hemicelulose	$21,1 \pm 1,2$
Xilose	$14,3 \pm 0,8$
Arabinose	$6,9 \pm 0,4$
Lignina Insolúvel em ácido	$12,3 \pm 1,0$
Lignina Solúvel em ácido	$6,0 \pm 0,3$
Extraíveis em água	$9,4 \pm 0,5$
Extraíveis em etanol	$11,1 \pm 0,3$

Fonte: A autora.

As cascas dos grãos são ricas em celulose, hemicelulose, lignina, proteínas e extraíveis. O teor de glucanas (majoritariamente celulose) foi determinado em $25,4 \pm 1,3 \%$, semelhante ao encontrado por Paz et al., (2018), que quantificaram o teor de glucanas para diferentes variedades de bagaço de malte e obtiveram valores em torno de 25%. O teor de hemicelulose obtido foi de $21,1 \pm 1,2\%$, podendo variar de 20 a 40%; as frações de xilose e arabinose foram quantificadas em $14,3 \pm 0,8$ e $6,9 \pm 0,4\%$, respectivamente, assim como valores reportados na literatura, de 12 a 15% de xilose e 5 a 8% de arabinose Balogun et al. (2017 e Paz et al. (2018). Os teores de lignina insolúvel e solúvel em ácido obtidos neste trabalho foram de $12,3 \pm 1,0\%$ e $6,0 \pm 0,3\%$, respectivamente, os quais estão em conformidade com a faixa apresentada de 10,11 a

13,12% para lignina insolúvel e 3,69 a 6,10% para lignina solúvel, apresentadas na literatura Balogun et al. (2017 e Torres-Mayanga et al. (2019).

Os extraíveis totais medidos neste trabalho foram quantificados em extraíveis em água e etanol, de $9,4 \pm 0,5$ e $11,1 \pm 0,3\%$, respectivamente. Valores entre 5 e 20% foram reportados pela literatura utilizando diferentes solventes e tempos de extração: $5,7 \pm 0,3$ e $13,6 \pm 0,2\%$ foram reportados por Torres-Mayanga et al. (2019), utilizando os solventes água e etanol, respectivamente; $11,82 \pm 0,55$ foram obtidos por Balogun, Sotoudehniakarani e McDonald (2017), utilizando diclorometano durante 24h; $12,9 \pm 0,4$ a $22,5 \pm 1,1\%$ de extraíveis foram quantificados por Pinheiro et al. (2019) em diferentes variedades de bagaço de malte por etanol 80% durante 8 h.

4.2 EXTRAÇÕES SOXHLET DO BAGAÇO DE MALTE

Os rendimentos das extrações Soxhlet, obtidos após 6 h de extração com os solventes água, etanol, acetato de etila, acetona e *n*-hexano foram representados na Tabela 7. As extrações com água (1) e etanol (3) resultaram nos melhores rendimentos obtidos, de $9,6 \pm 0,6\%$ e $10,1 \pm 0,3\%$, respectivamente. Torres-Mayanga et al. (2019) relataram rendimentos de $5,70 \pm 0,3\%$ para água e de $13,6 \pm 0,20\%$ para o etanol. Paz et al. (2019) também relataram um rendimento superior ($14 \pm 0,10\%$) ao do presente estudo para o etanol, porém com tempos de extração de 24 h de extração.

TABELA 7 - RENDIMENTOS DA EXTRAÇÃO SOXHLET POR DIFERENTES SOLVENTES.

Extração	Solvente	Polaridade [#]	Ciclos	Rendimento (%) *
1 - 2	Sequencial água e etanol	10,2 - 5,2	4 - 10	$9,6 \pm 0,6$ - $10,5 \pm 0,1$
3 - 4	Sequencial etanol e água	5,2 - 10,2	10 - 4	$10,1 \pm 0,3$ - $7,7 \pm 0,3$
5	Acetato de etila	4,3	16	$7,6 \pm 0,1$
6	Acetona	5,4	28	$6,6 \pm 0,1$
7	n-Hexano	0,0	18	$6,3 \pm 0,3$

Fonte: A autora; [#] Byers (2003); * Base seca (média \pm desvio padrão) em triplicata.

Nas extrações sequenciais (1 – 2 e 3 – 4), quando o etanol foi empregado como primeiro solvente extrator (3) fez com que a extração por água (4) apresentasse um decréscimo de 1,9 p.p. (pontos percentuais) em rendimento, quando comparado a

extração sequencial em que a água foi empregada como primeiro solvente (1). Em matrizes vegetais ricas em polissacarídeos, como o BM, com a desidratação por etanol esses polissacarídeos tendem a condensar formando um revestimento rígido ao redor de cada microfibrila da parede celular vegetal, dificultando a reidratação por água e assim a extração de alguns componentes Déléris; Wallecan (2017).

As extrações realizadas com acetona apresentaram rendimento de $6,6 \pm 0,1\%$ em 6 horas de extração, de forma similar ao quantificado pela literatura, onde são reportados estudos de extração por 8 horas e para rendimentos de $8,3 \pm 0,1\%$ Del Río et al. (2013). O número de ciclos de extração realizados e o tempo empregado em cada extração podem influenciar no rendimento de extraíveis, assim como a composição química do bagaço de malte que se altera de acordo com a variedade da cevada, safra, com o processo de maltagem e também com as condições do processo de brasagem Mussatto et al. (2006 e Pinheiro et al. (2019).

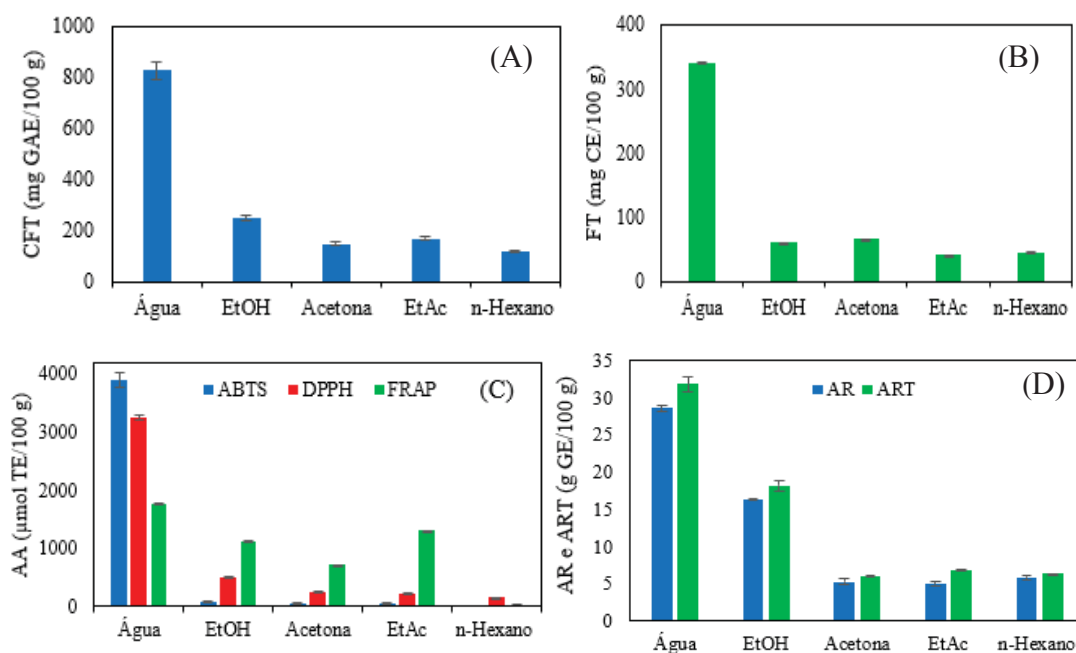
As extrações com *n*-hexano apresentaram rendimento de $6,3 \pm 0,3\%$. Tais valores estão próximos aos valores reportados pela literatura, de 6,41 - 7,50% Almeida et al. (2017 e Mallen; Najdanovic-Visak (2018). A extração com acetato de etila apresentou rendimento de $7,6 \pm 0,1\%$. Cabe ressaltar que não foram encontrados dados de extração Soxhlet com bagaço de malte utilizando este solvente na literatura. Porém, Santos et al. (2017) obtiveram um rendimento de 5% em extratos de candeia (*Eremanthus erythropappus*) e Guedes et al. (2020) valores de $6,36 \pm 0,27\%$ em extratos de janaúba (*Synadenium grantii* Hook f.) quando utilizaram acetato de etila como solvente em Soxhlet.

Rendimentos mais baixos, como $6,6 \pm 0,1\%$ e $6,3 \pm 0,3\%$ foram obtidos quando solventes de baixa polaridade e apolares foram empregados. No entanto, o melhor rendimento foi obtido com etanol e água em extração sequencial, já que a eficiência da água pura como solvente em extração é reduzida porque compostos, como proteínas e compostos fenólicos são frequentemente mais solúveis em solventes orgânicos menos polares do que a água Socaci et al. (2018). A partir dos resultados de rendimentos de extração Soxhlet obtidos, a água e o etanol foram selecionados como solventes para as extrações com líquidos pressurizados. Além do uso de diferentes concentrações de misturas EtOH/água, uma vez que a adição de água a solventes orgânicos como acetona,

metanol e etanol cria um meio mais polar que facilita a extração de compostos fenólicos, aumentando assim o rendimento de extração Meneses et al. (2013).

4.2.1 Caracterização dos extratos de Soxhlet

Para melhor compreender o desempenho das extrações Soxhlet e a escolha do melhor solvente extrator a ser empregado nas extrações PLE, os extratos obtidos foram caracterizados quimicamente e os resultados são apresentados na Figura 10. De modo geral, os resultados apresentam uma tendência de aumento do rendimento em extrato bruto com o aumento da polaridade dos solventes empregados, sendo a água responsável pela maior recuperação de compostos do bagaço de malte.



Fonte: A autora.

FIGURA 10 - CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE SOXHLET POR DIFERENTE SOLVENTES. (A) COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS; (B) FLAVONOIDES TOTAIS; (C) ATIVIDADE ANTIOXIDANTE; (D) AÇUCARES REDUTORES.

Na Figura 10(A) estão representados os resultados de compostos fenólicos totais (CFT) em que o maior resultado foi quantificado no extrato de água, com valor de $826,5 \pm 35,76$ mg GAE/100 g de extrato de BM, seguido pelo extrato de etanol com

recuperação de CFT de $249,3 \pm 10$ mg GAE/100 g de extrato de BM. Os extratos de acetona, acetato de etila e *n*-hexano apresentaram resultados semelhantes, com valores de $149,9 \pm 5,9$, $168,3 \pm 6,8$ e $121,1 \pm 4,9$ mg GAE/100 g de extrato de BM, respectivamente. Assim como para CFT, na Figura 10(B), a água foi responsável pela melhor recuperação de flavonoides totais (FT), quantificados em $340,9 \pm 0,7$ mg CE/100 g de extrato de BM. Acetona e etanol apresentaram quantidades similares de flavonoides totais ($67,1 \pm 0,1$ e $60,8 \pm 0,1$ mg CE/100 g de extrato de BM), enquanto os solventes *n*-hexano e acetato de etila foram responsáveis pelas menores quantidade obtidas ($45,1 \pm 0,1$ e $41,8 \pm 0,1$ mg CE/100 g de extrato de BM, respectivamente).

Na Figura 10(C) estão representadas as atividades antioxidantes (AA) dos extratos obtidas pelas metodologias ABTS, DPPH e FRAP. A atividade antioxidante aumenta com o aumento da concentração de CFT e FT nas amostras dos extratos, uma vez que a presença desses compostos é responsável pela AA. A água apresentou os maiores valores de AA, com valores de $3894,2 \pm 124,5$ μ mol TE/100 g de extrato de BM para a metodologia ABTS, $3249,3 \pm 46,1$ e $1761,86 \pm 13,66$ μ mol TE/100 g de extrato de BM para as metodologias DPPH e FRAP, respectivamente. Além da água, o etanol também apresentou resultados significativos de AA, de $80,8 \pm 5,0$, $488,9 \pm 18,5$ e $1128,8 \pm 9,9$ μ mol TE/100 g de extrato de BM para as metodologias ABST, DPPH e FRAP, respectivamente.

A presença de açúcares em cada extrato foi quantificada em açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) e estes são representados na Figura 10(D). A água foi responsável pela maior extração de açúcares, quantificando em $28,6 \pm 0,4$ GE/100 g de extrato de BM de AR e $31,9 \pm 1,0$ g de extrato de BM de ART. Enquanto o solvente etanol foi responsável pela remoção de $16,4 \pm 0,1$ e $18,2 \pm 0,7$ g GE/100 g de extrato de BM de AR e ART, respectivamente.

O aumento da polaridade dos solventes também aumenta as medidas de CFT, FT, AA e AR. Além disso, conforme destacado anteriormente, o aumento da polaridade do solvente favorece a extração de diferentes classes de compostos. A recuperação destes compostos está associada aos rendimentos globais de extração de Soxhlet, uma vez que os maiores rendimentos foram obtidos por solventes água e etanol. Além da quantificação de bioativos, a amostras dos extratos Soxhlet foram analisadas em CG-

MS para identificar as classes de compostos presentes nos extratos brutos de BM. Na Tabela 8 são apresentados os compostos químicos identificados em cada amostra.

TABELA 8 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS VIA CG-MS NOS EXTRATOS SOXHLET POR DIFERENTES SOLVENTES.

Extrato	Água	Etanol	Acetato de etila	Acetona	n-Hexano
Compostos identificados	---	Ácido láctico	---	---	---
	Ácido propanoico	Ácido propanoico	Ácido propanoico	Ácido propanoico	---
	---	---	---	Ácido caproico	Ácido caproico
	---	---	Ácido mirístico	Ácido mirístico	Ácido mirístico
	---	Ácido palmítico	Ácido palmítico	Ácido palmítico	Ácido palmítico
	---	Ácido linoleico	Ácido linoleico	Ácido linoleico	Ácido linoleico
	---	Ácido esteárico	Ácido esteárico	Ácido esteárico	Ácido esteárico
	---	Ácido oleico	Ácido oleico	Ácido oleico	Ácido oleico
	---	Ácido α -linolênico	Ácido α -linolênico	Ácido α -linolênico	Ácido α -linolênico
	---	---	Ácido 11-eicosenoico	---	Ácido 11-eicosenoico
	---	---	---	---	Ácido beénico
	---	1-monoplamitina	1-monoplamitina	1-monoplamitina	1-monoplamitina
	---	---	1-monooleina	1-monooleina	1-monooleina
	D-eritrose	D-eritrose	D-eritrose	D-eritrose	---
	Frutose	---	Rhamnose	---	---
	Xilose	Xilose	---	---	---
	D-tagatofuranose	---	---	---	---
	Glucopirranose	---	---	---	---
	Maltose	Maltose	---	---	---
	D-turanose	---	---	---	---
	Celobiose	Celobiose	---	---	---
	D-manitol	---	---	---	---
	D-arabinol	---	---	---	---

Fonte: A autora.

Os solventes apolares e de baixa polaridade, como *n*-hexano, acetona e acetato de etila foram responsáveis pelas extrações de compostos lipossolúveis, como os ácidos graxos palmítico, linoleico, esteárico e oleico identificados. Com a aumento da polaridade, com o uso de etanol como solvente, foram identificadas diferentes classes de compostos, além dos ácidos graxos, certos carboidratos foram extraídos. Solventes

apolares interagem principalmente com os lipídios neutros, como acilgliceróis e ácidos graxos livres por meio das forças de van der Waals, enquanto os solventes polares são capazes de interagir com os lipídios presentes na membrana na célula vegetal por meio da formação de ligações de hidrogênio com lipídios polares (fosfolipídios e glicolipídios). Dessa forma, tanto os lipídios neutros como os lipídios associados à membrana são dissolvidos em etanol Santos et al. (2021). Quando a água foi empregada como solvente extrator os compostos identificados, em sua maioria, foram carboidratos.

4.3 EXTRAÇÕES COM LÍQUIDOS PRESSURIZADOS

Os resultados de rendimento global das extrações por água, etanol e frações volumétricas de 0,25, 0,5 e 0,75 EtOH/água pressurizados em suas respectivas condições operacionais de temperatura e vazão volumétrica são apresentados na Tabela 9. A pressão de extração foi fixada em 100 bar para todos os ensaios, assim como o tempo de extração estática em 15 min, com o intuito de assegurar o equilíbrio térmico-mecânico do leito de extração. O tempo de extração dinâmica foi determinado em 60 min. Os ensaios de 1 a 15 (Tabela 9) correspondem as condições experimentais determinadas por meio do planejamento experimental e os ensaios de 16 a 21 correspondem a experimentos adicionais para melhor compreender os efeitos das variáveis avaliadas.

Para as extrações com água, o maior rendimento foi obtido na condição de 120 °C e 4 ml/min (ensaio 2), com valor médio de $17,8 \pm 0,3\%$. No entanto, para o solvente etanol pressurizado, o maior rendimento foi de 11,6%, obtido a 120 °C e 2 ml/min (ensaio 21), bem como para a mistura etanol/água a uma razão de volume de 0,5 EtOH/Água com o maior rendimento de $19,3 \pm 0,8\%$ (ensaio 6). Todos esses resultados são superiores aos rendimentos obtidos pelas extrações Soxhlet com os mesmos solventes (água e etanol). A condição 0,5 EtOH/Água, 120 °C e 2 ml/min, atingiu cerca de 97% do rendimento obtido com a extração sequencial de Soxhlet usando água seguida de etanol (ensaios 1–2, Tabela 7, com rendimento total de $20,1 \pm 0,6\%$). Já o melhor resultado para extração de água pressurizada ($17,8 \pm 0,3\%$), foi cerca de 54% superior ao rendimento obtido com água pela técnica Soxhlet ($9,6 \pm 0,6\%$).

TABELA 9 - RENDIMENTOS GLOBAIS DAS EXTRAÇÕES PLE A 100 BAR.

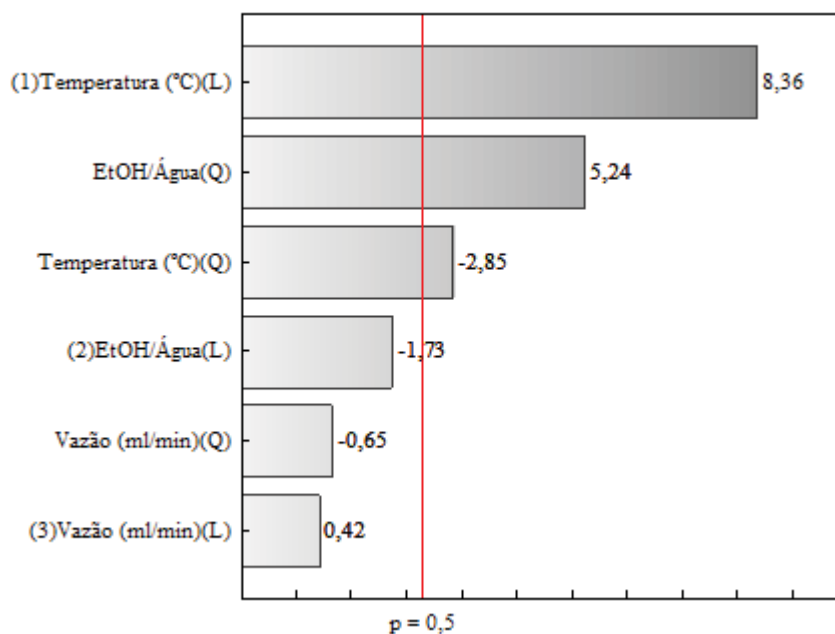
Ensaio/Solvente	Fração de solvente (EtOH/Água)	Temperatura (°C)	Vazão (ml/min)	Rendimento* (%)
Água				
1	0,0	60	4	6,6
2	0,0	120	4	17,8 ± 0,3
9	0,0	90	2	9,4
11	0,0	90	6	9,9
20	0,0	120	2	16,9
Etanol				
3	1,0	60	4	7,3
4	1,0	120	4	11,5 ± 0,3
10	1,0	90	2	8,6
12	1,0	90	6	9,3
21	1,0	120	2	11,6
Etanol/Água				
5	0,5	60	2	10,2
6	0,5	120	2	19,4 ± 0,8
7	0,5	60	6	11,4
8	0,5	120	6	19,4
13 (C)	0,5	90	4	13,0
14 (C)	0,5	90	4	12,7
15 (C)	0,5	90	4	12,4
16	0,5	80	2	11,1
17	0,5	100	2	13,6
18	0,25	120	2	18,6 ± 0,1
19	0,75	120	2	17,8 ± 0,7

Legenda: (C) – Ponto central; *Rendimento de extração expresso em base seca % (média ± desvio padrão) para os ensaios realizados em triplicata. Fonte: A autora.

Para avaliar a influência das variáveis de extração, temperatura, razão de solvente e vazão sobre os rendimentos de extração dos extratos brutos do BM durante os 60 min de extração (Tabela 9), o planejamento fatorial 3^2 foi aplicado. Foram avaliados 15 ensaios para três fatores com triplicata no ponto central (0,5 EtOH/Água, 90 °C e 4 ml/min). Na Figura 11 é apresentado o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados, mostrando o efeito significativo ($p \geq 0,5$) de cada variável estudada neste processo.

A temperatura foi o efeito mais relevante, com o aumento da temperatura, houve um aumento significativo no rendimento das extrações (conforme Tabela 9), em que o maior rendimento foi obtido na razão de 0,5 EtOH/Água na maior temperatura de operação (120 °C). Portanto, o maior rendimento foi obtido com 0,5 EtOH/Água, demonstrando que a combinação de água e etanol foi eficiente na recuperação de compostos solúveis de BM. Os valores de vazão usados neste trabalho (2 a 6 ml/min) não tiveram efeito significativo, então a vazão mais baixa foi usada para realizar extrações adicionais com menos solvente. Assim, a condição de extração ideal para

atingir o rendimento máximo indicado pela análise estatística foi a temperatura de 120 °C, razão de solvente de 0,5 EtOH/Água e vazão de 2 ml/min.



Fonte: A autora.

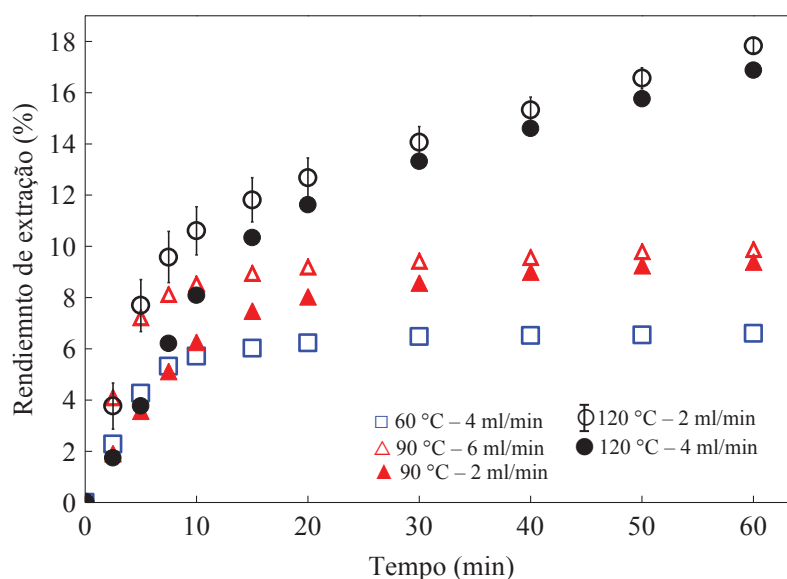
FIGURA 11 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS EMPREGADAS NAS EXTRAÇÕES POR LÍQUIDOS PRESSURIZADOS.

Para todas as condições avaliadas com diferentes solventes, o rendimento da extração aumentou com o aumento da temperatura (difusividade) devido à quebra das ligações de hidrogênio e enfraquecimento das interações moleculares dipolo-dipolo entre os compostos extraíveis (analitos) e a estrutura do sólido (matriz vegetal), reduzindo assim a energia de ativação necessária para sua dessorção, uma vez que os extraíveis presentes no bagaço de malte encontram-se disponíveis na matriz em decorrência do processo de brassagem da produção cervejeira. A viscosidade e a tensão superficial dos solventes diminuem com o aumento da temperatura, potencializando o transporte do solvente para a matriz e acelerando a dissolução dos compostos solúveis (extratos) Mustafa; Turner (2011 e Wijngaard et al. (2012). Portanto, a taxa de transferência de massa e dessorção aumentam resultando em maiores rendimentos gerais de extração na temperatura de 120 °C.

4.3.1 Curvas globais das extrações em PLE

As curvas globais das extrações por líquidos pressurizados são apresentadas nas Figuras 12, 13 e 14. A Figura 12 corresponde às extrações por água pressurizada (0,0 EtOH/Água), em que o efeito da variável temperatura pode ser avaliado fixando a vazão de solvente, por exemplo, nas curvas de extração a 90 e 120 °C de vazão 2 ml/min e também nas curvas a 60 e 120 °C de vazão 4 ml/min. Nestes casos se observa que o aumento da temperatura favorece a taxa de extração inicial, assim como aumenta significativamente o rendimento. Além disso, a temperatura contribuiu para o aumento da solubilidade aparente em água pressurizada, visto que a taxa de extração inicial aumentou sistematicamente. Da mesma maneira, a uma temperatura fixa de extração, por exemplo a 90 °C, o efeito da vazão foi avaliado (entre 2 e 6 ml/min), e assim como a temperatura, a vazão também favorece a taxa de extração inicial, indicando que o aumento da vazão favorece a extração de solutos que são facilmente acessíveis na matriz, ou seja, compostos disponibilizados por meio da quebra das paredes celulares da matéria-prima durante os processos de trituração e moagem.

Para todas as condições da Figura 12, os primeiros 8 min de extração correspondem a fase de taxa de extração constante (CER), em que a solubilidade dos solutos no solvente é a etapa limitante. Para as extrações a 60 °C e 90 °C, após 10 min de extração, a quantidade de extrato recuperado diminui rapidamente, indicando que fenômenos de difusão são responsáveis pelo controle da recuperação dos solutos da matéria-prima até o final da extração (60 min), nesta condição o processo apresentou um tempo muito curto de queda da taxa de extração (FER) e atingiu a etapa de difusão controlada (DC) após aproximadamente 12 min.



Fonte: A autora.

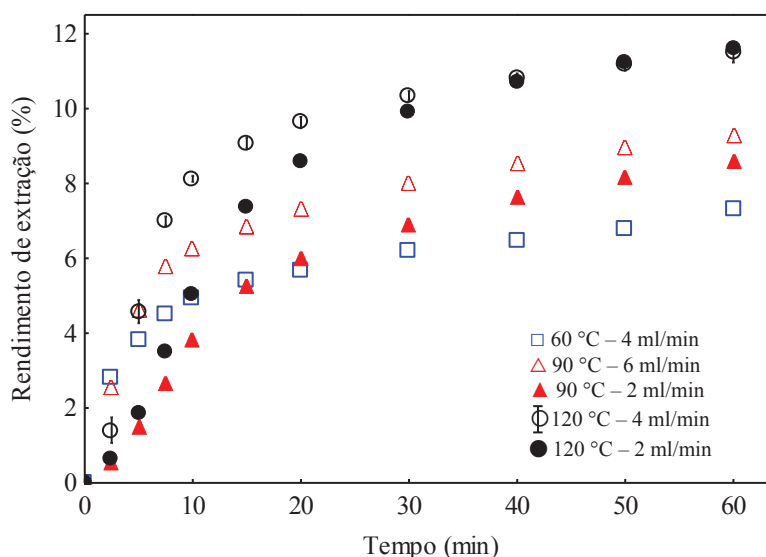
FIGURA 12 - CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÕES DO BAGAÇO DE MALTE COM ÁGUA PRESSURIZADA A 100 BAR.

Para as extrações a 120 °C, a fase CER também ocorreu nos primeiros 8 min de extração, no entanto, diferente das outras condições o processo de extração seguiu por um longo período controlado pela solubilidade de diferentes compostos em água, mostrando que tanto a etapa FER quanto a DC não foram finalizadas até os 60 min finais de extração dinâmica deste processo. Esse comportamento está relacionado à característica do BM, em que provavelmente os analitos estão em parte adsorvidos na superfície por forças de van der Waals e alguns quimicamente ligados à matriz.

Outros fatores que afetam o rendimento de extração e explicam os resultados observados é a diminuição da constante dielétrica da água, a polaridade e o parâmetro de solubilidade com o aumento da temperatura. Como indicado na literatura, a água em temperaturas acima de 100 °C e abaixo da temperatura crítica (374 °C), sob alta pressão, favorece a extração de compostos polares e apolares Bubalo et al. (2018 e Herrero et al. (2015 e Ong et al. (2006). O aumento da temperatura também diminui a tensão superficial da água, permitindo que os compostos se dissolvam mais rapidamente, pois a água pode umedecer mais facilmente e penetrar na matriz sólida, aumentando a taxa de difusão devido à diminuição da viscosidade Bubalo et al. (2018). Portanto, essas mudanças nas propriedades da água foram responsáveis por aumentar o rendimento de extração de 6,6% (60 °C e 4 ml/min) para $17,8 \pm 0,3\%$ (120 °C e 4 ml/min),

confirmando que os solutos estão fortemente ligados à matriz e requerem alta energia de ativação para superar a etapa de dessorção.

Para as extrações com etanol pressurizado, Figura 13, a temperatura também apresentou efeito positivo em termos do rendimento global de extração e o comportamento cinético foi semelhante ao discutido para a água, onde o aumento da temperatura e a vazão de solvente aumentaram as taxas de extração e rendimentos iniciais. Porém, com o etanol pressurizado, a extração máxima foi inferior aos valores encontrados para a água pressurizada, onde o maior valor para o etanol foi de 11,5% obtido a 120 °C e 4 ml/min; cerca de 5 p.p. abaixo do valor obtido pela água. Esses resultados sugerem que o etanol apresenta menores forças de coesão e interação com os solutos presentes no BM.

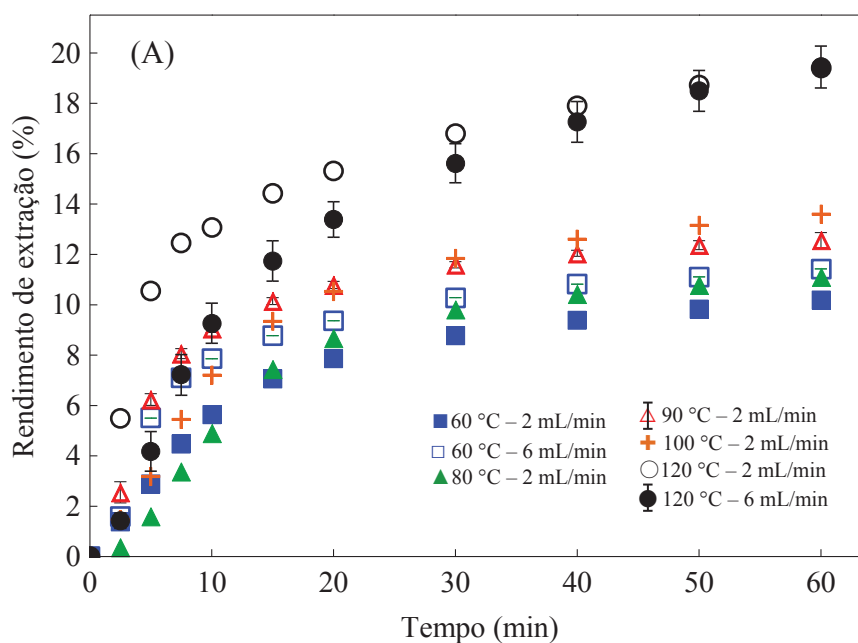


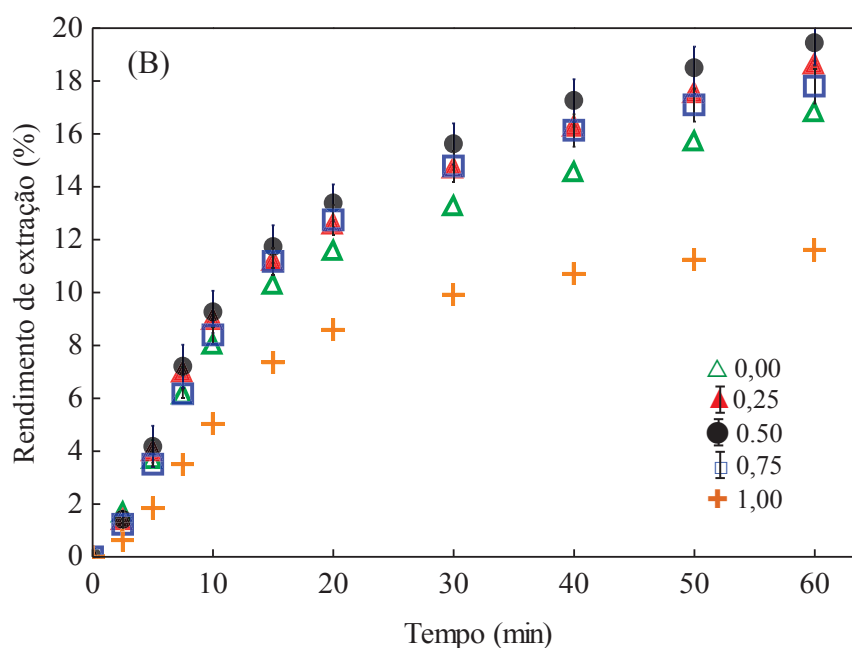
Fonte: A autora.

FIGURA 13 - CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÕES DO BAGAÇO DE MALTE COM ETANOL PRESSURIZADO A 100 BAR.

A Figura 14(A) representa as curvas gerais de extração para usando razão de solvente 0,5 EtOH/Água. A taxa de extração inicial e o rendimento de extração aumentaram quando a temperatura aumentou de 60 °C para 120 °C, assim como para o aumento da vazão de solvente de 2 para 6 ml/min, com melhora expressiva de 100 para 120 °C. Isso indica que também para uma mistura de solventes, tanto a solubilidade quanto o rendimento máximo foram alcançados com o aumento da energia fornecida e

disponível ao sistema. Pode-se notar que a 120 °C, a fração de água foi responsável pelo mesmo efeito observado na água pressurizada (Figura 12), devido à diminuição da constante dielétrica e outras propriedades moleculares incorporadas como contribuição da água à mistura etanol/água. Usando uma mistura fixa de etanol e água, o efeito da temperatura combinado com a proporção de solvente resulta no maior rendimento de extração por líquido pressurizado ($19,4 \pm 0,8\%$), obtido na condição de 0,5 EtOH/Água, 120 ° C e 2 ml/min. Esta resposta pode ser explicada considerando que misturas de solventes de baixa e alta polaridade fornecem um meio físico-químico adequado para a extração de uma gama mais ampla de analitos Carabias-Martínez et al. (2005).





Fonte: A autora.

FIGURA 14 - CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÕES DO BAGAÇO DE MALTE DAS MISTURAS ETANOL ÁGUA: (A) EXTRAÇÕES 0,5 ETOH/ÁGUA; (B) VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS FRAÇÕES DE ETOH/ÁGUA NA CONDIÇÃO 120 °C E 2 ML/MIN.

A influência da concentração de solvente é enfatizada na Figura 14(B), onde o efeito da proporção de solvente foi avaliado na melhor condição de extração (120 °C e 2 ml/min), a qual apresentou o maior rendimento dentro das condições empregadas no planejamento experimental, apresentado na Tabela 9 (ensaios 1 a 15). As extrações foram realizadas com diferentes frações volumétricas de solvente de 0,00 (100% água), 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 (etanol 100%). Com a adição de água em etanol, a taxa de extração inicial (em relação à solubilidade aparente) aumentou, levando a um aumento significativo da eficiência de rendimento global, para ambas as frações de etanol em água. Como pode ser observado na Tabela 9, os resultados das frações 0,25, 0,50 e 0,75 EtOH/Água não apresentaram diferenças estatísticas em relação ou rendimento global de extração, dessa forma considerando a otimização em termos de gastos energéticos com a operação de evaporação de solvente/concentração das amostras, a fração 0,75 EtOH/Água apresentou grande vantagem como solvente na extração de extratos brutos de BM pela técnica de líquidos pressurizados, devido a maior fração de etanol presente na mistura.

4.3.2 Caracterização dos extratos de BM

Os extratos brutos de BM obtidos pelas extrações PLE foram caracterizados e os valores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT), atividade antioxidante (AA), açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) foram quantificados.

4.3.2.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

Os compostos fenólicos totais quantificados nos extratos de BM obtidos nas extrações com líquido pressurizado são apresentados na Tabela 10. O maior valor de CFT foi de 2130 ± 1 mg GAE/100g de extrato de BM, obtido pela extração com água a 120°C e 4 ml/min. Para a extração com etanol, o maior valor de CFT foi 1227 ± 71 mg GAE/100 g de extrato BM também a 120°C e 2 ml/min.

TABELA 10 - COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS QUANTIFICADOS NOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE.

Razão de solvente (EtOH/Água)	Condição experimental	CFT (mg GAE/100 g)	FT (mg CE/100 g)
0,00 (Água)	60 °C - 4 ml/min	1579 ± 13	332 ± 15
	90 °C - 2 ml/min	1254 ± 24	249 ± 6
	90 °C - 6 ml/min	1577 ± 25	304 ± 2
	120 °C - 4 ml/min	2130 ± 1	387 ± 7
	1,00 (Etanol)	60 °C - 4 ml/min	167 ± 3
	90 °C - 2 ml/min	336 ± 4	36 ± 1
	90 °C - 6 ml/min	289 ± 2	43 ± 2
	120 °C - 2 ml/min	1228 ± 71	156 ± 1
	120 °C - 4 ml/min	945 ± 7	138 ± 1
	0,5	60 °C - 2 ml/min	1860 ± 25
60 °C - 6 ml/min		1828 ± 35	607 ± 24
80 °C - 2 ml/min		1783 ± 65	484 ± 10
90 °C - 4 ml/min		1840 ± 16	778 ± 32
100 °C - 2 ml/min		1320 ± 163	740 ± 8
120 °C - 2 ml/min		1471 ± 25	311 ± 2
120 °C - 6 ml/min		1358 ± 35	439 ± 3
0,25		120 °C - 2 ml/min	1569 ± 25
0,75	120 °C - 2 ml/min	1384 ± 113	242 ± 2

Fonte: A autora.

A temperatura foi um fator significativo em ambas as extrações utilizando água e etanol (condições representadas como frações de 0,00 e 1,00 EtOH/Água, na Tabela 9), em que o aumento da temperatura de 60 para 120 °C também aumentou a obtenção de CFT. Os resultados observados neste trabalho estão de acordo com o indicado na literatura, em que há o consenso de que com aumento da temperatura melhorar é a recuperação de compostos fenólicos de materiais vegetais, em função do aumento da difusividade e da solubilidade de compostos fenólicos no solvente de extração Mitic et al. (2021).

Nos experimentos com extrações usando 0,5 EtOH/Água, o maior valor de CFT foi 1860 ± 25 mg GAE/100 g de extrato BM, obtido a 60 °C e 2 ml/min. O efeito da temperatura foi oposto às extrações com água e etanol, em que a recuperação de CFT aumentou com a diminuição da temperatura. Esse decréscimo nos valores de CFT devem estar associados ao aumento da quantidade total de compostos extraídos em temperaturas mais altas, o que causa um efeito de diluição nos compostos responsáveis pelas medidas de CFT.

Para diferentes concentrações de etanol, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 EtOH/Água na mesma condição operacional de 120 °C e 2 ml/min, o maior conteúdo de fenólicos totais foi 1569 ± 25 mg GAE/100 g de extrato BM a 0,25 EtOH/Água. O aumento da fração de etanol nas extrações com líquidos pressurizadas diminui a quantidade de compostos fenólicos totais devido ao aumento da extração de açúcares hemicelulósicos por mudanças na constante dielétrica, alterando a permissividade relativa desses compostos ao solvente. Além disso, a eficiência de extração dos compostos fenólicos é reduzida usando etanol puro como solvente, uma vez que esses compostos, devido a uma série de grupos hidroxila (como flavonoides, especialmente aqueles com açúcares na molécula), são hidrofílicos e geralmente mais solúvel em soluções de água-etanol do que em álcool puro Benito-Román et al. (2015 e Huerta; Saldaña (2018 e Mitic et al. (2021).

Mitic et al. (2021) estudaram diferentes frações de etanol-água na recuperação de compostos fenólicos e flavonoides na extração de flores *Tilia cordata* M. e obtiveram máximos rendimentos de extração com o uso de etanol 30 e 50%, enquanto os rendimentos mais baixos foram obtidos com frações 70 e 100 % (etanol puro). Huerta e Saldaña (2018) realizaram a hidrólise das palhas de cevada e canola usando água subcrítica (sCW) e etanol aquoso pressurizado (PAE) nas concentrações de 140–

220 °C, 50–200 bar e 20–100% (v/v) de etanol. As condições ótimas de processo para recuperação de compostos fenólicos encontradas por esses autores ($45,4 \pm 1,8$ mg GAE/g palha de cevada e $52,9 \pm 2,0$ mg GAE / g palha de canola) foram 180 °C, 50 bar e 20% de etanol. Os autores também observaram que, com o aumento da temperatura, o valor do CFT também aumenta. E quanto maior a concentração de etanol, menos CFT foi removido.

A partir da comparação dos resultados de CFT obtidos por PLE com os apresentados para extração de Soxhlet com etanol e água (Figura 10A), observa-se que todos os resultados de PLE para água (Tabela 10) foram superiores ao Soxhlet, removendo cerca de 1500 GAE/100 g de BM extrato em temperaturas amenas (60 e 90 °C) e 2130 ± 1 mg GAE/100 g de extrato BM a 120 °C, enquanto que cerca de 800 mg GAE/100 g de extrato BM foi obtido pela técnica Soxhlet. Enquanto para as extrações utilizando etanol como solvente, os resultados de CFT foram significativamente maiores do que o resultado de Soxhlet (Figura 10 A) apenas para as condições empregadas a 120 °C. Os resultados de CFT obtidos pelas frações de solventes 0,25, 0,5 e 0,75 EtOH/Água apresentarem-se os mais importantes devido aos altos valores de CFT, em que a melhor relação entre rendimento de extração e valor de CFT foi obtida a 0,25 EtOH/Água, 120 °C e 2 ml/min.

4.3.2.2 Flavonoides totais (FT)

Os resultados de flavonoides totais obtidos nas extrações PLE são apresentados na Tabela 10. Para as extrações utilizando os solventes água e etanol (0,00 e 1,00 EtOH/Água), a maior temperatura empregada nas extrações (120 °C) foi responsável pela maior remoção de compostos fenólicos. No entanto, quando a mistura de etanol/água foi empregada na proporção de 0,50 EtOH/Água a 90 °C e 4 ml/min, a quantidade de FT aumentou em cerca de 50 % em relação ao resultado obtido com água como solvente a 120 °C.

Flavonoides são compostos fenólicos altamente termolábeis, geralmente requerem temperaturas de extração mais baixas, de 85 a 126 °C, e curtos períodos de extração Bubalo et al. (2018 e Plaza; Turner (2015). Além disso, o aumento significativo de FT utilizando a razão de solvente 0,5 EtOH/Água também foi

observado por Zhang, Li e Wu (2008), que empregou a técnica PLE para a extração de *Houttuynia cordata* Thunb usando etanol em água em diferentes concentrações (0, 30, 50, 70%) e esses autores relataram que etanol a 50% resultou em maior rendimento de fenólicos e maior conteúdo de flavonoides.

Em comparação aos valores obtidos pelas extrações Soxhlet com água e etanol (Figura 10B), a técnica de extração PLE apresentou recuperação significativa quando EtOH/Água foi empregado como solvente extrator, em que os valores de FT aumentaram significativamente, cerca de sete vezes em comparação os extratos obtidos em Soxhlet.

4.3.2.3 Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante foi medida pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP para todas as condições de extração PLE e os resultados são apresentados na Tabela 11. Água pressurizada a 120 °C e 4 ml/min foi responsável pela maior AA para ambas as metodologias aplicadas, além de apresentar valores muito superiores ao valor encontrado nos extratos obtidos em Soxhlet (Figura 10C). Assim, como para os extratos de água pressurizada a 120 °C e 4 ml/min, os maiores valores de AA para o solvente etanol foram obtidos nessa mesma condição, e cabe salientar que estes últimos são valores também superiores aos medidos nos extratos etanol em Soxhlet.

Os valores de AA obtidos nos extratos PLE com etanol foram menores que os obtidos pela água, pois a atividade antioxidante aumenta com o aumento da polaridade do solvente. O mesmo ocorreu para as extrações Soxhlet, em que os valores de AA obtidos nos extratos com água (3894 ± 125 $\mu\text{mol TE}/100$ g de extrato BM) foram aproximadamente 50 vezes maiores que os valores encontrados para os extratos obtidos com etanol (81 ± 5 $\mu\text{mol TE}/100$ g de extrato BM) para a metodologia ABTS.

As extrações por 0,5 EtOH/Água forneceram extratos com valores intermediários de AA para extrações com água e etanol (0,00 e 1,00 EtOH/Água). A maior AA foi 6911 ± 54 $\mu\text{mol TE} / 100$ g de extrato BM por ABTS na condição 120 °C e 6 ml/min. Enquanto para as metodologias DPPH e FRAP o melhor valor AA foi obtido a 60 °C em diferentes vazões, a 6 ml/min para DPPH com 3464 ± 116 e a 2 ml/min para FRAP com 3907 ± 1 $\mu\text{mol TE}/100$ g do extrato BM.

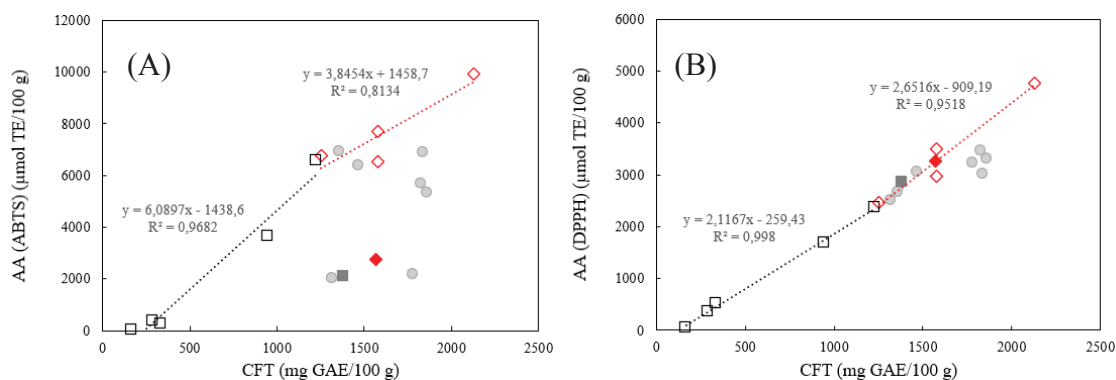
TABELA 11 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE QUANTIFICADA PELOS MÉTODOS ABTS, DPPH E FRAP DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE.

Razão de solvente (EtOH/Água)	Condição experimental	AA ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$)		
		ABTS	DPPH	FRAP
0,00 (Água)	60 °C - 4 ml/min	6544 \pm 651	3495 \pm 277	2321 \pm 69
	90 °C - 2 ml/min	6779 \pm 134	2469 \pm 79	1766 \pm 124
	90 °C - 6 ml/min	7717 \pm 336	2972 \pm 15	2074 \pm 7
	120 °C - 4 ml/min	9944 \pm 391	4769 \pm 330	4096 \pm 111
1,00 (Etanol)	60 °C - 4 ml/min	16 \pm 4	55 \pm 25	25 \pm 4
	90 °C - 2 ml/min	243 \pm 26	506 \pm 63	1353 \pm 39
	90 °C - 6 ml/min	373 \pm 83	360 \pm 8	1040 \pm 47
	120 °C - 2 ml/min	6578 \pm 402	2367 \pm 5	2805 \pm 27
	120 °C - 4 ml/min	3653 \pm 166	1691 \pm 206	2296 \pm 82
0,5	60 °C - 2 ml/min	5334 \pm 615	3311 \pm 99	3907 \pm 13
	60 °C - 6 ml/min	5671 \pm 458	3464 \pm 116	3411 \pm 163
	80 °C - 2 ml/min	2163 \pm 18	3224 \pm 88	3453 \pm 2
	90 °C - 4 ml/min	6903 \pm 265	3012 \pm 190	3750 \pm 42
	100 °C - 2 ml/min	2016 \pm 83	2496 \pm 192	3055 \pm 4
	120 °C - 2 ml/min	6384 \pm 444	3054 \pm 140	3332 \pm 123
	120 °C - 6 ml/min	6911 \pm 54	2652 \pm 59	3231 \pm 62
0,25	120 °C - 2 ml/min	2764 \pm 110	3273 \pm 121	2343 \pm 54
0,75	120 °C - 2 ml/min	2073 \pm 388	2861 \pm 374	2702 \pm 207

Fonte: A autora.

Em geral, para as extrações com água e etanol pressurizadas (0,00 e 1,00 EtOH/Água), o aumento da temperatura também ocasionou um aumento na atividade antioxidante. Porém, para as extrações de 0,5 EtOH/Água, o maior AA foi obtido em uma temperatura mais baixa, a 90 °C. O mesmo comportamento foi observado para as análises de compostos fenólicos totais (CFT) e compostos flavonoides totais (FT), uma vez que a atividade antioxidante presente nos extratos BM é atribuída à presença desses compostos.

A Figura 15 mostra a correlação da quantidade total de compostos fenólicos nos extratos de BM com os resultados da atividade antioxidante para solventes puros (água e etanol) e misturas de EtOH/Água. Uma correlação linear é observada apenas para solventes puros (água e etanol) para as medições de AA, ABTS e DPPH. Para a mistura de EtOH/Água, nenhuma correlação é observada para as medidas de ABTS com CFT, provavelmente porque este método é muito sensível a outras classes de compostos extraídos pela mistura dos solventes.



Legenda: Água: losangos vermelhos abertos; etanol: quadrado preto aberto; 0,5 EtOH/Água: círculos completos cinzas; 0,75 EtOH/Água: quadrado cinza completo; 0,25 EtOH/Água: losango totalmente vermelho. Fonte: A autora.

FIGURA 15 – CORRELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS (CFT) NOS EXTRATOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) PARA EXTRATOS OBTIDOS POR PLE COM DIFERENTES SOLVENTES; (A) VALORES AA PELO MÉTODO ABTS, E (B) MÉTODO DPPH.

Conforme mencionado, a mistura EtOH/Água proporcionou maiores rendimentos de extração para as três relações investigadas (0,25, 0,50 e 0,75). Por outro lado, o método DPPH proporcionou uma correlação muito mais direta entre os valores de AA e CFT, conforme já relatado na literatura para extrato de óleo de farelo de arroz parboilizado com CO₂ supercrítico e etanol como co-solvente Trevisani Juchen et al. (2019). Diferentes grupos de compostos podem afetar as atividades antioxidantes dos extratos brutos, a correlação apresentada na Figura 15(B) é interessante, pois indica que os compostos fenólicos são o fator chave para as propriedades antioxidantes dos extratos brutos de BM obtidos por PLE com água e etanol; uma vez que o CFT (principalmente pelo DPPH) se correlaciona diretamente com a atividade antioxidante.

4.3.2.4 Açúcares redutores (AR)

A quantidade de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) determinados nos extratos de bagaço de malte obtidos por PLE são apresentadas na Tabela 12. Água pressurizada a 60 °C e 4 ml/min foi responsável pela maior recuperação de AR, seguido da condição 90 °C e 6 ml/min com resultado similar, a qual também apresentou maior teor de ART. O mesmo ocorre para as extrações com 0,5

EtOH/Água, em que a temperatura de operação mais baixa (60 °C), apresentou os maiores valores de AR e ART. No entanto, para as extrações com etanol, os maiores valores de AR e ART foram obtidos pela condição de 120 °C e 2 ml/min, ou seja, pela maior temperatura de operação empregada no estudo.

TABELA 12 - AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS OBTIDOS NOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE.

Razão de solvente (EtOH/Água)	Condição experimental	AR (g GE/100 g)	ART (g GE/100 g)
0,00 (Água)	60 °C - 4 ml/min	28,6 ± 0,5	32,5 ± 0,2
	90 °C - 2 ml/min	25,7 ± 0,5	32,7 ± 0,4
	90 °C - 6 ml/min	26,2 ± 1,2	35,3 ± 1,4
	120 °C - 4 ml/min	18,9 ± 0,4	29,3 ± 0,3
1,00 (Etanol)	60 °C - 4 ml/min	3,6 ± 0,3	3,9 ± 0,1
	90 °C - 2 ml/min	7,1 ± 0,02	7,2 ± 0,1
	90 °C - 6 ml/min	6,5 ± 0,3	7,7 ± 0,4
	120 °C - 2 ml/min	16,4 ± 0,2	18,2 ± 0,9
	120 °C - 4 ml/min	7,8 ± 0,3	8,6 ± 0,01
0,5	60 °C - 2 ml/min	18,4 ± 0,6	22,01 ± 0,6
	60 °C - 6 ml/min	18,9 ± 1,0	22,0 ± 0,5
	80 °C - 2 ml/min	16,4 ± 0,1	17,1 ± 0,05
	90 °C - 4 ml/min	15,9 ± 0,5	19,7 ± 0,9
	100 °C - 2 ml/min	15,9 ± 0,1	17,6 ± 1,0
	120 °C - 2 ml/min	11,3 ± 0,2	13,7 ± 0,4
	120 °C - 6 ml/min	13,02 ± 0,3	15,3 ± 0,1
	120 °C - 2 ml/min	15,2 ± 0,2	18,9 ± 0,5
0,25	120 °C - 2 ml/min	15,2 ± 0,2	18,9 ± 0,5
0,75	120 °C - 2 ml/min	10,5 ± 0,4	11,1 ± 0,1

Fonte: A autora.

Um decréscimo na recuperação dos açúcares redutores foi observado com o aumento da temperatura tanto para as extrações com água como nas extrações com 0,5 EtOH/Água. Enquanto para as extrações com etanol os teores de AR e ART aumentaram com o aumento da temperatura de extração. Ainda, a partir da avaliação dos teores de AR e ART nas diferentes frações EtOH/Água a 120 °C, observa-se que com a adição gradativa de etanol na fração (de 0,0 – 1,0) as quantidades de AR e ART também diminuem gradativamente, indicando que com a redução da polaridade do solvente torna-se mais difícil a liberação dos açúcares disponíveis na matriz.

O teor de glicose e hemicelulose (quantidade das frações xilose e arabinose) na matéria-prima da BM (Tabela 6), $22,5 \pm 1,4\%$ e $21,1 \pm 1,2\%$, respectivamente, sugerem um alto potencial de remoção de açúcar. Os resultados de AR e ART obtidos para os extratos com os solventes água, etanol e 0,5 EtOH/Água nas temperaturas de 60 °C a 120 °C foram baixos. Esses resultados foram similares aos obtidos pela extração em Soxhlet, para água, em que o conteúdo de AR e ART foi de $28,6 \pm 0,4$ e $31,9 \pm 1,1$ g GE/100 g de extrato BM, respectivamente. Para o etanol foram de $16,4 \pm 0,1$ e $18,2 \pm 0,7$ g GE/100 g de extrato BM. Esse comportamento indica que as extrações estudadas neste trabalho não recuperam açúcares presentes na estrutura da matriz, apenas retiram os açúcares disponíveis (livres) no BM. Ainda, vale ressaltar que temperaturas superiores a 120 °C, principalmente entre 140 - 210 °C, são indicadas para hidrólise da matriz BM para liberação dos açúcares presentes em materiais lignocelulósicos Meneses et al. (2013 e Torres-Mayanga et al. (2019).

Torres-Mayanga et al., (2019) relataram diferenças significativas entre os conteúdos de AR e ART quando realizadas hidrólises subcríticas em água de BM em temperaturas de 140 a 210 °C. A quantidade de ART foi cerca de 15 vezes maior que o conteúdo de AR a 140 °C, indicando a predominância de açúcares oligoméricos nos produtos de hidrólise. Porém, os resultados de AR e ART obtidos neste trabalho não apresentam diferenças significativas, indicando que ambas as análises detectam apenas a presença de açúcares simples de baixo peso molecular.

4.4 EXTRAÇÕES COM scCO₂ e Propano

Extrações com fluidos compressíveis (CO₂ e propano) foram realizadas a fim de promover a extração de diferentes classes de compostos presentes no bagaço de malte. Dióxido de carbono em condições supercríticas (scCO₂), com e sem a adição de cossolvente e propano comprimido foram selecionados como fluidos extratores. A partir dos resultados preliminares obtidos no presente trabalho, extrações sequenciais com propano comprimido e 0,5 EtOH/água pressurizado (na condição de 120 °C, 2 ml/min a 100 bar) foram conduzidas e seus extratos brutos foram caracterizados.

4.4.1 CO₂ supercrítico + cossolvente

Os rendimentos das extrações com scCO₂ e scCO₂+EtOH, nas diferentes condições operacionais de temperatura, pressão e razão mássica (EtOH/BM) de etanol e bagaço de malte são representadas na Tabela 13. O tempo de extração estática foi determinado em 30 min para ambas as extrações. O tempo de extração dinâmica para a extração utilizando apenas scCO₂ foi determinado em 90 min, para as extrações contendo cossolvente etanol, o tempo avaliado foi de 40 min.

TABELA 13 - RENDIMENTOS GLOBAIS DAS EXTRAÇÕES scCO₂ E scCO₂+EtOH DO BAGAÇO DE MALTE.

Ensaio	Solvente + (EtOH/BM)	T* (°C)	P* (bar)	$\rho_{sol.}^a$ (g/ml)	$\rho_{sol.bomba}^a$ (g/ml)	R (%)
1 – 2	scCO ₂ - scCO ₂ + (1:1)	40	250	0,880	1,002	2,6 – 1,6
3 – 4	scCO ₂ + (1:1) - scCO ₂ + (1:1)	80	250	0,686	1,002	3,3 – 2,3
5	scCO ₂ + (1:1)	40	150	0,780	0,954	3,0
6	scCO ₂ + (1:1)	80	150	0,427	0,954	3,1
7	scCO ₂ + (2:1)	40	150	0,780	0,954	4,0
8	scCO ₂ + (2:1)	80	150	0,427	0,954	4,3

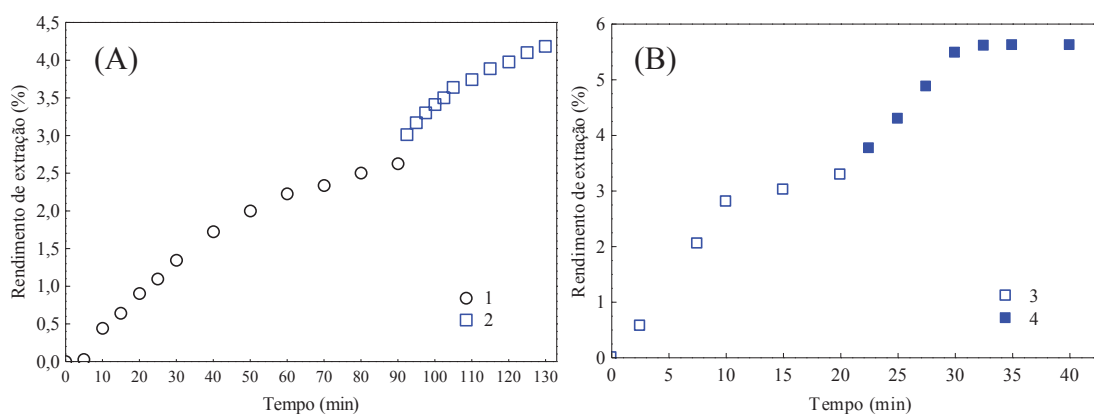
Legenda: T – temperatura, P – pressão, R – rendimento, ^a Densidade dos solventes obtida pela base de dados NIST; Fonte: A autora.

Os rendimentos obtidos pelas extrações sequenciais indicaram que o maior rendimento global foi de 5,6%, obtido na extração sequencial 3-4 (somatório dos rendimentos 3,3 e 2,3%) por scCO₂ + (1:1) EtOH/BM a 80 °C e 250 bar, com tempo total de 40 min de extração dinâmica. O segundo maior rendimento de 4,2%, foi obtido pela extração sequencial scCO₂, seguido de scCO₂ + (1:1) EtOH/BM a 40 °C e 250 bar, com tempo total de 150 min de extração dinâmica. No entanto, quando o cossolvente é adicionado a uma razão mássica de 2:1 EtOH/BM, em uma única etapa de extração é possível obter o rendimento similar a uma extração em duas etapas sequenciais com razão mássica de 1:1. Isso é evidenciado quando o rendimento global da extração sequencial 1 – 2, de 4,2% é comparado ao rendimento da extração 7 (scCO₂ + (2:1) EtOH/BM) de 4,0%, na mesma temperatura de extração (40 °C). Considerando gastos energéticos envolvidos nas extrações sequenciais, o uso da razão mássica de 2:1

EtOH/BM parece ser uma alternativa viável. Dessa forma, o maior rendimento foi de 4,3%, obtido pela extração 8, na condição $\text{scCO}_2 + (2:1)$ EtOH/BM a 80 °C e 150 bar.

Kitryte, Šaduikis e Venskutonis (2015) realizaram a extração de bagaço de malte com scCO_2 na condição de 40 °C, 350 bar durante 70 min (10 min de extração estática + 60 min extração dinâmica) e obtiveram $5,49 \pm 0,07$ g/g de bagaço de malte de rendimento, quantidade superior a encontrada na extração 1 deste trabalho, que apresentou rendimento de 2,6 g/g de bagaço de malte (2,6%). A diferença nos rendimentos de extração pode ser afetada pela diferença da pressão (de 100 bar), visto que a temperatura utilizada foi a mesma. Segundo Pereira e Meireles (2010), em extrações com temperatura constante o aumento de pressão é capaz de aumentar o poder de solvatação do CO_2 , consequentemente aumentando o rendimento de extração.

As curvas cinéticas das extrações são representadas nas Figuras 16 e 17. A primeira representação, Figura 16(A), se refere à extração sequencial scCO_2 seguido de $\text{scCO}_2 + \text{EtOH/BM}$ (1 - 2), em que a primeira etapa da extração apresentou rendimento de 2,6%, quando apenas o solvente dióxido de carbono foi empregado. A extração permaneceu em taxa constante de extração (fase CER) até os primeiros 60 min e então nos últimos 30 minutos avançou para o período de queda da taxa de extração (FER), demonstrando a necessidade de adição de modificadores (cossolventes) que promovam o aumento da solubilidade do soluto e por sua vez a eficiência da extração. Na segunda etapa da extração (ensaio 2), com o emprego de etanol na razão mássica de 1:1 EtOH/BM, 1,6% de extrato bruto foi obtido. No entanto, ambas as extrações permaneceram em fase FER demonstrando que ainda certa quantidade de extrato pode ser obtida.

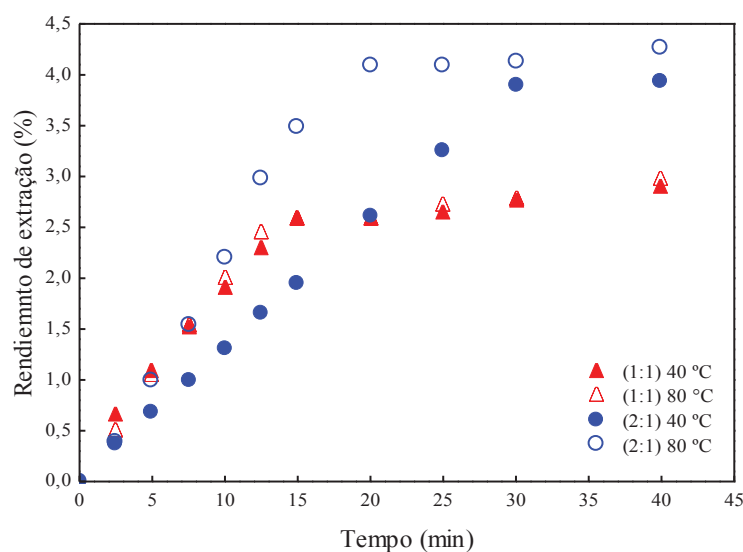


Fonte: A autora.

FIGURA 16 - CURVAS DE EXTRAÇÃO SEQUENCIAIS A 250 BAR: (A) SEQUENCIAL scCO_2 (1) – scCO_2 + (2) 1:1 ETOH/BM A 40 °C; (B) SEQUENCIAL scCO_2 + 1:1 ETOH/BM (3) - scCO_2 + 1:1 ETOH/BM (4) A 80 °C.

A Figura 16(B) corresponde à extração sequencial com a adição do cossolvente etanol com razão mássica de 1:1 EtOH/BM, já na primeira etapa da extração. Os primeiros 10 min de cada extração correspondem ao período de taxa constante de extração, em que a extração foi rápida devido ao efeito positivo da adição de etanol. O rendimento global da extração foi de 5,6%, sendo 3,3% obtidos na primeira etapa e 2,3% na segunda. A adição de cossolvente apresenta grande impacto no custo total do processo devido à diminuição do tempo total de extração e no consumo de solvente.

Como forma de diminuir a quantidade de scCO_2 utilizada em cada extração sequencial e avaliar a influência da quantidade de cossolvente, razões mássicas de 1:1 e 2:1 EtOH/BM foram empregadas. As extrações foram realizadas nas temperaturas de 40 e 80 °C a 150 bar e suas cinéticas de extração foram apresentadas na Figura 17.



Fonte: A autora.

FIGURA 17 - CURVAS DE EXTRAÇÃO scCO_2 + ETOH DO BAGAÇO DE MALTE A 150 BAR.

O aumento da razão mássica EtOH/BM de 1:1 para 2:1 apresentou um aumento significativo no rendimento das extrações, no qual a condição 6 de 2:1 EtOH/BM a 80 °C apresentou o melhor rendimento (4,3%). O aumento da temperatura (de 40 para 80 °C)

°C) nos ensaios 5 (2:1 a 40 °C) para 6 (2:1 a 80 °C) resultou em um aumento da taxa de recuperação do extrato bruto de BM, devido extração de compostos pesados como ceras nos primeiros 20 min de extração, em que certa de 95% do rendimento total foi obtido. O efeito da temperatura na taxa de extração, a pressão constante, pode ser explicado por dois mecanismos: o aumento na temperatura do processo aumenta a solubilidade do scCO₂ devido ao aumento da pressão de vapor dos solutos ou reduz solubilidade devido à diminuição na densidade do solvente. O aumento da temperatura causa uma maior distância intermolecular diminuindo sua densidade e, conseqüentemente, a redução do poder de solubilização do scCO₂. Em geral, o rendimento da extração sob várias temperaturas depende de um equilíbrio complexo entre a densidade do scCO₂ e a volatilidade dos extratos Bezerra et al. (2019 e Bubalo et al. (2018 e Pereira; Meireles (2010 e Yousefi et al. (2019).

A partir da avaliação do rendimento das extrações com base no tempo de extração dinâmica observa-se que para os ensaios 3 e 4, correspondentes à razão mássica 1:1 EtOH/BM, a fase ótima de extração termina nos primeiros 15 min, em que 85% dos solutos totais foram removidos. O mesmo acontece para as extrações 5 e 6, na razão mássica 2:1 EtOH/BM, porém, no período de 20 a 25 min, com remoção de 95%. Nesse período de extração tem-se ainda a presença do cossolvente etanol e à medida que a mistura etanol/extrato é removida do vaso extrator tem-se a queda no rendimento de extração. Logo, para manter altas taxas de extração uma razão maior de EtOH/BM deverá ser empregada. No tempo restante, em que apenas o scCO₂ é responsável pela extração, a taxa de transferência de massa é controlada principalmente por fenômenos de difusão no interior da partícula sólida e a taxa de extração é baixa.

De maneira geral, os resultados obtidos pelas extrações com dióxido de carbono supercrítico apresentaram baixa recuperação de extratos de BM, havendo a necessidade do emprego de cossolventes. Dessa forma, optou-se pela realização de extrações com propano comprimido, solvente apolar capaz de remover uma fração mais específica de compostos, realizando o “desengorduramento” do BM para extrações posteriores visando a remoção de compostos polares.

4.4.2 Extrações sequenciais: Propano comprimido seguido de EtOH/água pressurizados.

A utilização de propano comprimido se torna uma alternativa adequada ao scCO₂ na obtenção de extratos ricos em compostos lipossolúveis, como triglicerídeos, tocoferóis, fitosteróis e carotenoides, devido a maior solubilidade desses compostos em propano Cuco et al. (2019).

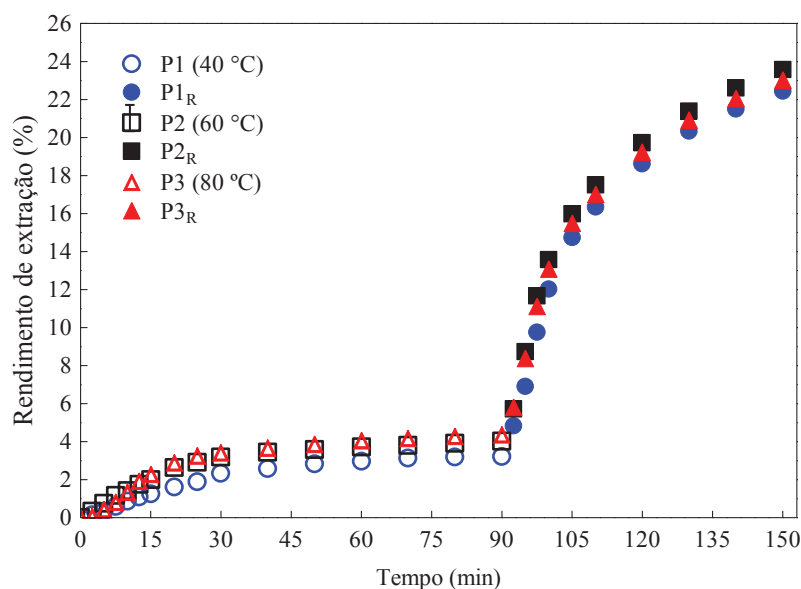
Extrações utilizando propano comprimido foram realizadas a pressão e vazão volumétrica constantes de 100 bar e $2,0 \pm 0,2$ cm³/min, respectivamente. Temperaturas de 40, 60 e 80 °C foram empregadas para a remoção da fração lipídica presente no bagaço de malte. Com o resíduo sólido das extrações, foram realizadas extrações sequenciais utilizando a melhor condição das extrações com líquidos pressurizados, de razão volumétrica 0,5 EtOH/Água a 120 °C, 2 ml/min e 100 bar. Na Tabela 14 estão representados os rendimentos das extrações sequenciais e a caracterização dos extratos de bagaço de malte.

TABELA 14 - RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DE PROPANO COMPRIMIDO E 0,5 ETOH/ÁGUA A 120 °C, 2 ML/MIN E 100 BAR E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE.

Ensaio/Solvente	T (°C)	$\rho_{sol, a}$ (g/ml)	R (%)	CFT (mg GAE/100 g)	Flavonoides (mg CE/100 g)	AA ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$)			AR (g GE/100 g)	ART
						ABTS	DPPH	FRAP		
Propano										
P1	40	0,493	3,2	44 \pm 3	22 \pm 2	2,3 \pm 0,1	52 \pm 2	12 \pm 1	0,51 \pm 0,02	0,79 \pm 0,01
P2	60	0,467	4,0 \pm 0,1	50 \pm 2	40 \pm 1	4,2 \pm 0,3	55 \pm 4	15 \pm 1	0,52 \pm 0,04	0,71 \pm 0,04
P3	80	0,430	4,4	51 \pm 5	39 \pm 3	4,2 \pm 0,3	57 \pm 2	17 \pm 1	0,50 \pm 0,01	0,91 \pm 0,07
0,5 EtOH/Água										
P1 _R	120	-	19,2	753 \pm 186	175 \pm 8	1169 \pm 499	1482 \pm 805	1507 \pm 363	13,9 \pm 0,1	15,9 \pm 0,2
P2 _R	120	-	19,6	796 \pm 6	150 \pm 1	4006 \pm 250	1672 \pm 53	1849 \pm 82	11,1 \pm 0,3	14,1 \pm 0,5
P3 _R	120	-	18,7	1327 \pm 91	203 \pm 9	1951 \pm 504	2353 \pm 846	2399 \pm 166	12,9 \pm 0,1	15,1 \pm 0,1

A extração com propano comprimido apresentou valores que variaram entre 3,2 a 4,4% de extrato bruto de BM. O maior rendimento global foi obtido pela condição (P2_R) atingindo $23,6 \pm 0,1\%$ ($4,0 \pm 0,1\%$ de extração com propano + $19,6\%$ pela extração PLE). Além disso, as extrações a 40 e 80 °C apresentaram rendimentos semelhantes, com valores de 21,9 e 23,1%, respectivamente. Todas as extrações dos resíduos sólidos em PLE usando 0,5 EtOH/Água (P1_R, P2_R e P3_R) apresentaram rendimento semelhante a extração 0,5 EtOH/Água a 120 °C e 2 ml/min (Tabela 9), com valores de $19,3 \pm 0,8\%$. Estes resultados indicam que a extração de propano comprimido não afeta a recuperação de solutos na etapa de extração de PLE e sim removendo apenas outras classes de compostos (neste caso a fração lipídica do BM).

Na Figura 18 são apresentadas as cinéticas das extrações sequenciais, em que as extrações com propano comprimido foram realizadas durante 90 min e o comportamento da extração da fração lipídica apresenta as três fases de extração (CER, FER e DC), o que caracteriza períodos alta taxa de extração e baixa taxa de extração.



Fonte: A autora.

FIGURA 18 - CURVAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DE PROPANO COMPRIMIDO E 0,5 ETOH/ÁGUA A 120°C, 2 ML/MIN A 100 BAR.

A partir da Figura 18 observa-se que nos primeiros 25 min de extração a transferência de massa convectiva controla o processo de extração, permitindo uma maior taxa de extração, devido ao contato direto entre o solvente e a fração lipossolúvel.

Transcorrido os 25 min, a extração torna-se lenta devido à resistência à difusão, uma vez que a fração lipídica remanescente é de difícil acesso e a transferência de massa intrapartícula controla o processo de extração Cuco et al. (2019 e Fetzer et al. (2021). As extrações em PLE com 0,5 EtOH/Água (90 min a 150 min) apresentaram o mesmo comportamento cinético das extrações apresentadas na Figura 14.

Devido a capacidade em solubilizar compostos lipossolúveis, o propano é amplamente empregado na extração de óleos de matrizes vegetais. Cuco et al. (2019) realizaram extrações com propano em condições supercríticas (318 K e 8 MPa) de sementes e cascas de abobora e reportaram rendimentos de 3,44 e 21,79%, respectivamente. Guedes et al. (2018) obtiveram rendimentos de $2,76 \pm 0,09$ a $4,2 \pm 0,1\%$ em extrações de citronela (*Cymbopogon winteranius* Jowitt ex Bor), utilizando propano comprimido em condições de 2 - 10 MPa e 10 – 60 °C. No entanto, não foram encontrados estudos que utilizam extrações envolvendo propano na obtenção de extratos de bagaço de malte.

4.4.2.1 Caracterização dos extratos de BM obtidos pelas extrações sequenciais.

Os extratos obtidos pelas extrações sequenciais por propano comprimido (P1, P2, P3) seguido de PLE com 0,5 EtOH/Água pressurizada a 120 °C, 2 ml/min a 100 bar (P1_R, P2_R, P3_R) foram caracterizados quimicamente e os resultados são apresentados na Tabela 14. Os resultados de compostos fenólicos totais (CFT) foram quantificados em torno de 50 mg GAE/100 g de extrato de BM para ambas as temperaturas de extração (40, 60 e 80 °C). O melhor resultado de flavonoides totais foi quantificado em cerca de 40 mg CE/100 g de extrato de BM para as temperaturas de 60 e 80 °C. Os maiores valores de atividade antioxidante (AA) quantificadas pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP foram de 4,2, 56 e 16 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ de extrato de BM, respectivamente, também para as temperaturas de 60 e 80 °C. Os teores de açúcares redutores foram relativamente baixos, devido a polaridade do solvente propano, uma vez que como relatado anteriormente, solventes polares, como a água, são mais indicados para a liberação de açúcares. De modo geral, com o aumento da temperatura a atividade biológica dos extratos de propano também aumenta.

Os resultados obtidos pelas extrações com propano comprimido são comparados à extração Soxhlet com *n*-hexano (Figura 10), visto que ambos são solventes apolares. A quantidade de CFT obtida foi aproximadamente 40% inferior ao valor obtido pelo Soxhlet *n*-hexano (121 ± 5 mg GAE/100g), além de valores inferiores também apresentados de AA. No entanto, a recuperação flavonoides totais entre os solventes foi similar, de $45,13 \pm 0,05$ mg CE/100 g de extrato de BM para o *n*-hexano e de $39,62 \pm 0,01$ mg CE/100 g de extrato de BM para propano a 60 °C.

A recuperação de biocompostos das extrações sequenciais em PLE 0,5 EtOH/Água apresentaram resultados similares aos valores obtidos pela mesma condição operacional discutidas no item 4.3.2 (Tabelas 10, 11 e 12). Dentre as extrações sequenciais avaliadas, a condição P3 – P3_R (propano comprimido a 80 °C – 0,5 EtOH/Água) mostrou-se a mais promissora na recuperação de fração lipossolúvel e de atividade biológica de extratos de bagaço de malte.

A Tabela 14 indica a possibilidade de se obter diferentes classes de compostos utilizando diferentes solventes de extração, como também apresentado na Tabela 8 (caracterização dos extratos Soxhlet via GC-MS), uma vez que solventes apolares como *n*-hexano e propano compressível são capazes de solubilizar compostos lipossolúveis. Por outro lado, as extrações pressurizadas 0,5 EtOH/Água demonstraram eficiência para a obtenção extratos brutos com alta atividade biológica. Assim, extrações sequenciais utilizando diferentes classes de solventes são indicadas para recuperação e obtenção de diferentes classes de compostos com diferentes propriedades.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros de processo: temperatura, razão de solvente e vazão foram avaliados na obtenção de extratos brutos de bagaço de malte por extrações com líquidos pressurizados (PLE), utilizando os solventes água e etanol e misturas destes. Extração em Soxhlet com diferentes solventes foi usada como um processo padrão para avaliação e comparação com os resultados obtidos por PLE. As extrações Soxhlet mostraram que água e etanol foram responsáveis pelos maiores rendimentos de extração e alta recuperação de compostos fenólicos. Os resultados das extrações PLE demonstraram que as variáveis significativas foram a temperatura e concentração do solvente. A recuperação dos extratos foi favorecida pelo aumento da temperatura e pela mistura 0,5 EtOH/Água. O aumento na vazão de solvente favoreceu as extrações da taxa inicial para todos os solventes testados nas extrações PLE. O maior rendimento de extração alcançou aproximadamente 20%, a 120 °C, razão de solvente de 0,5 de EtOH/Água, 2 ml/min e 100 bar mostrando que a mistura de etanol e água a 120 °C é tecnicamente viável para recuperar uma quantidade significativa de compostos solúveis de BM.

Os extratos de BM apresentaram valores expressivos de compostos fenólicos totais, compostos flavonoides e atividade antioxidante. A água foi responsável pelo maior valor de CFT de 2130 ± 1 mg GAE/100g de extrato BM, a 120 °C e 4 ml/min. Em comparação, o maior conteúdo de FT foi 778 ± 32 mg CE/100 g de extrato BM obtido na razão de solvente 0,50 EtOH/Água, 90 °C e 4 ml/min. Água na condição de 120 °C e 4 ml/min também foi responsável pelo maior valor de AA, de 9944 ± 391 μ mol TE/100 g de extrato BM obtido pela metodologia ABTS. Esses resultados foram favorecidos pelas extrações com água e EtOH/Água e pelo aumento da temperatura.

Dentre os fluidos compressíveis empregados na obtenção da fração lipídica do BM, o propano foi selecionado como solvente extrator como pré-etapa de desengorduramento em extração sequencial com PLE, empregado com a melhor condição de extração (0,5 EtOH/Água, 120 °C e 2 ml/min). Portanto, água pressurizada e misturas de EtOH/Água demonstraram ser tecnologias adequadas e promissoras para a recuperação de diferentes biocompostos de BM, e sua viabilidade técnica foi demonstrada pelos resultados alcançados neste estudo.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, a técnica de extração por líquidos pressurizados foi avaliada como alternativa aos métodos padrões de extração de biocompostos por solventes orgânicos na obtenção de extratos brutos de bagaço de malte. A viabilidade técnica do estudo foi demonstrada pelos valores de rendimentos obtidos pelo emprego dos solventes água e fração 0,50 EtOH/Água. A água pressurizada a 120 °C e 4 ml/min ($17,8 \pm 0,3\%$), apresentou rendimento superior em cerca de 54% ao rendimento obtido com água pela técnica Soxhlet ($9,6 \pm 0,6\%$), além da condição 0,5 EtOH/Água, 120 °C e 2 ml/min, atingir cerca de 97% do rendimento obtido com a extração sequencial de Soxhlet usando água seguida de etanol (ensaios 1–2, Tabela 7, com rendimento total de $20,1 \pm 0,6\%$). Bem como na caracterização dos extratos com valores de CFT, FT e AA expressivamente superiores aos obtidos em Soxhlet, favorecido principalmente pelo uso de temperaturas mais elevadas (120 °C) que a temperatura de ponto de ebulição dos solventes empregados, uma das vantagens do uso da técnica PLE. Contudo, as condições estudadas demonstram que apenas açúcares livres (disponíveis na matriz) foram removidos, e condições mais severas de hidrólise devem ser empregadas ou técnicas de pré-tratamento aplicadas para obtenção de açúcares estruturais.

Além das condições pré-estabelecidas no planejamento experimental, a fração de 0,75 EtOH/Água ($17,8 \pm 0,7\%$) realizada como experimento adicional, apresentou grande potencial como solvente na obtenção de extratos brutos de BM, uma vez que não apresentou diferenças estatísticas no rendimento global de extração, em relação a fração 0,50 EtOH/Água e possuir a vantagem de apresentar menor gasto energético no processo de evaporação de solvente e concentração do extrato, devido a presença do etanol em maior quantidade e ainda preservando valores expressivos de CFT, FT e AA, devido a presença da água na mistura.

A utilização da pré-etape de desengorduramento com propano compressível favoreceu a extração de uma variedade maior de compostos extraíveis, permitindo a obtenção de compostos lipossolúveis, e por meio da extração sequencial 0,5 EtOH/Água, 120 °C e 2 ml/min a obtenção de compostos polares. Assim, pode-se observar que a técnica PLE pode ser usada para recuperar compostos solúveis para produzir extratos com altos valores de CFT, FT e alta atividade antioxidante, mantendo

os carboidratos na matriz que podem ser usados posteriormente na geração de plataformas química de biocombustíveis, ou mesmo para serem utilizados na alimentação animal.

REFERÊNCIAS

- ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 324–331, 2010.
- ALMEIDA, A. DA R.; GERALDO, M. R. F.; RIBEIRO, L. F.; et al. Compostos bioativos do bagaço de malte: Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante in vitro. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 39, n. 3, p. 269–277, 2017.
- ALONSO-RIÑO, P.; SANZ, M. T.; BENITO-ROMÁN, O.; BELTRÁN, S.; TRIGUEROS, E. Subcritical water as hydrolytic medium to recover and fractionate the protein fraction and phenolic compounds from craft brewer ' s spent grain. **Food Chemistry**, p. 129264, 2021. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129264>>.
- ANDERSON, H. E.; SANTOS, I. C.; HILDENBRAND, Z. L.; SCHUG, K. A. A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. **Analytica Chimica Acta**, v. 1085, p. 1–20, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061>>.
- BALOGUN, A. O.; SOTOUDEHNIKARANI, F.; MCDONALD, A. G. Thermo-kinetic, spectroscopic study of brewer's spent grains and characterisation of their pyrolysis products. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 127, n. September, p. 8–16, 2017. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2017.09.009>> .
- BENITO-ROMÁN, Ó.; ALVAREZ, V. H.; ALONSO, E.; COCERO, M. J.; SALDAÑA, M. D. A. Pressurized aqueous ethanol extraction of β -glucans and phenolic compounds from waxy barley. **Food Research International**, v. 75, p. 252–259, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.006>> .
- BENITO-ROMÁN, O.; VARONA, S.; SANZ, M. T.; BELTRÁN, S. Valorization of rice bran: Modified supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 80, p. 273–282, 2019.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1995, p. 15–27, 1999.
- BEZERRA, F. W. F.; DE OLIVEIRA, M. S.; BEZERRA, P. N.; et al. **Extraction of bioactive compounds**. Elsevier Inc., 2019.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRUNNER, G. Supercritical Gases as Solvents: Phase Equilibria. , p. 59–146, 1994.
- BUBALO, M. C.; VIDOVIĆ, S.; RADOJČIĆ REDOVNIKVIĆ, I.; JOKIĆ, S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 52–73, 2018.

BYERS, J. A. Solvent Polarity and Miscibility Data. , 2003.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1–2, p. 1–17, 2005.

CHEMAT, F.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A. S.; et al. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 248–263, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037>>. .

CUCO, R. P.; MASSA, T. B.; POSTAUE, N.; CARDOZO-FILHO, L.; DA SILVA, C. Oil extraction from structured bed of pumpkin seeds and peel using compressed propane as solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 152, p. 104568, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104568>>. .

DÉLÉRIS, I.; WALLECAN, J. Relationship between processing history and functionality recovery after rehydration of dried cellulose-based suspensions: A critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 246, n. June, p. 1–12, 2017. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.013>>. .

FAO. Agribusiness Handbook. **FAO Agribusiness**, p. 65, 2009. Disponível em: <http://www.eastagri.org/docs/group/436/6_Poultry_web.pdf>. .

FĂRCAȘ, A. C.; SOCACI, S. A.; DULF, F. V.; et al. Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. **Journal of Cereal Science**, v. 64, p. 34–42, 2015.

FETZER, D. L.; CRUZ, P. N.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L. Extraction of baru (*Dipteryx alata vogel*) seed oil using compressed solvents technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, n. January, p. 23–33, 2018. Elsevier.

FETZER, D. L.; HAMERSKI, F.; ERRICO, M.; CORAZZA, M. L. Extraction of cumaru seed oil using compressed propane as solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 169, p. 105123, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105123>>. .

FREEMAN, G. J. Separation technologies in brewing. **Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries**, p. 430–449, 2010. Woodhead Publishing Limited.

GALLEGO, R.; BUENO, M.; HERRERO, M. Sub- and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae – An update. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 198–213, 2019.

GALLONE, B.; MERTENS, S.; GORDON, J. L.; et al. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 148–155, 2018. The Authors. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005>>. .

GOMIDE, R. Operações Unitárias, volume 1. , p. 298, 1983.

GUEDES, A. R.; DE SOUZA, A. R. C.; TUROLA BARBI, R. C.; et al. Extraction of *Synadenium grantii* Hook f. using conventional solvents and supercritical CO₂ + ethanol. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 160, p. 8–10, 2020.

GUEDES, A. R.; DE SOUZA, A. R. C.; ZANOELO, E. F.; CORAZZA, M. L. Extraction of citronella grass solutes with supercritical CO₂, compressed propane and ethanol as cosolvent: Kinetics modeling and total phenolic assessment. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, n. January, p. 16–22, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.003>>. .

GUIDO, L. F.; MOREIRA, M. M. Techniques for Extraction of Brewer's Spent Grain Polyphenols: a Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 7, p. 1192–1209, 2017. Food and Bioprocess Technology.

GUNES, B.; STOKES, J.; DAVIS, P.; CONNOLLY, C.; LAWLER, J. Pre-treatments to enhance biogas yield and quality from anaerobic digestion of whiskey distillery and brewery wastes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 113, n. July, p. 109281, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109281>>. .

HE, Y.; HUANG, Z.; ZHONG, C.; GUO, Z.; CHEN, B. Pressurized liquid extraction with ethanol as a green and efficient technology to lipid extraction of Isochrysis biomass. **Bioresource Technology**, v. 293, n. 1, p. 122049, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122049>>. .

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBAÑEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 67–83, 2013.

HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. DEL P.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 26–38, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.018>>. .

HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M. Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 109, p. 83–96, 2018. Elsevier B.V.

HUERTA, R. R.; SALDAÑA, M. D. A. Pressurized fluid treatment of barley and canola straws to obtain carbohydrates and phenolics. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 141, n. October 2017, p. 12–20, 2018. Elsevier.

KITRYTE, V.; ŠADUIKIS, A.; VENSKUTONIS, P. R. Assessment of antioxidant capacity of brewer's spent grain and its supercritical carbon dioxide extract as sources of valuable dietary ingredients. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 18–24, 2015.

LEE, W. J.; SULEIMAN, N.; HADZIR, N. H. N.; CHONG, G. H. **Supercritical fluids for the extraction of oleoresins and plant phenolics**. Elsevier Inc., 2019.

LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILÄ, M. Recent advances in the

malting and brewing industry. **Journal of Biotechnology**, v. 65, n. 2–3, p. 85–98, 1998.

LÓPEZ-BASCÓN-BASCON, M. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Soxhlet extraction. **Liquid-Phase Extraction**, p. 327–354, 2019.

LUFT, L.; CONFORTIN, T. C.; TODERO, I.; et al. Transformation of residual starch from brewer's spent grain into fermentable sugars using supercritical technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, n. April, p. 85–90, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.06.006>>. .

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>>. .

MALLEN, E.; NAJDANOVIC-VISAK, V. Brewers' spent grains: Drying kinetics and biodiesel production. **Bioresource Technology Reports**, v. 1, p. 16–23, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.01.005>>. .

MANJARE, S. D.; DHINGRA, K. Supercritical fluids in separation and purification: A review. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 2, n. 3, p. 463–484, 2019. KeAi Communications Co., Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.04.005>>. .

MANTELL, C.; CASAS, L.; RODRÍGUEZ, M.; OSSA, E. M. DE LA. Supercritical Fluid Extraction. **Separation and Purification Technologies in Biorefineries**, v. 1, p. 227–233, 2013.

MCCARTHY, A. L.; O'CALLAGHAN, Y. C.; NEUGART, S.; et al. The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers' spent grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSG as antioxidants into fruit beverages. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2567–2574, 2013. Elsevier Ltd.

MENA-GARCÍA, A.; RUIZ-MATUTE, A. I.; SORIA, A. C.; SANZ, M. L. Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, 2019. Elsevier Ltd.

MENESES, N. G. T.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. **Separation and Purification Technology**, v. 108, p. 152–158, 2013. Elsevier B.V.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31:426–8, 1959.

MITIC, M.; JANKOVIC, S.; MITIC, S.; et al. Optimization and kinetic modelling of total phenols and flavonoids extraction from *tilia cordata* m. flowers. **South African Journal of Chemistry**, v. 75, n. 1, p. 64–72, 2021.

MOREIRA, M. M.; MORAIS, S.; CARVALHO, D. O.; et al. Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 382–388, 2013.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 1, p. 1–14, 2006.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011. Elsevier B.V.

NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 752–764, 2010.

NIGAM, P. S. An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery. **Waste Management**, v. 62, p. 255–261, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.018>>. .

OKIYAMA, D. C. G.; SOARES, I. D.; TODA, T. A.; OLIVEIRA, A. L.; RODRIGUES, C. E. C. Effect of the temperature on the kinetics of cocoa bean shell fat extraction using pressurized ethanol and evaluation of the lipid fraction and defatted meal. **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. September 2018, p. 96–103, 2019. Elsevier.

ONG, E. S.; CHEONG, J. S. H.; GOH, D. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 92–102, 2006.

OUTEIRIÑO, D.; COSTA-TRIGO, I.; PINHEIRO DE SOUZA OLIVEIRA, R.; PÉREZ GUERRA, N.; DOMÍNGUEZ, J. M. A novel approach to the biorefinery of brewery spent grain. **Process Biochemistry**, v. 85, n. May, p. 135–142, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.007>>. .

PAVSLER, A.; BUIATTI, S. Non-lager Beer. **Beer in Health and Disease Prevention**. p.17–30, 2009. Udine, Italy: Department of Food Science, University of Udine.

PAZ, A.; OUTEIRIÑO, D.; PÉREZ GUERRA, N.; DOMÍNGUEZ, J. M. Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 275, n. November 2018, p. 402–409, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.082>>. .

PAZ, A.; DA SILVA SABO, S.; VALLEJO, M.; et al. Using brewer's spent grain to formulate culture media for the production of bacteriocins using Patagonian strains. **Lwt**, v. 96, n. January, p. 166–174, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.027>>. .

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.

PILARSKI, D. W.; GEROGIORGIS, D. I. Progress and modelling of cold contact fermentation for alcohol-free beer production: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 273, 2020. Elsevier B.V.

PINHEIRO, T.; COELHO, E.; ROMANÍ, A.; DOMINGUES, L. Intensifying ethanol production from brewer's spent grain waste: Use of whole slurry at high solid loadings. **New Biotechnology**, v. 53, n. April 2018, p. 1–8, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.06.005>>..

PLAZA, M.; TURNER, C. Pressurized hot water extraction of bioactives. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 39–54, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.022>>..

QIN, F.; JOHANSEN, A. Z.; MUSSATTO, S. I. Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. **Industrial Crops and Products**, v. 125, n. September, p. 443–453, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.017>>..

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; et al. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY ROBERTA. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.

DEL RÍO, J. C.; PRINSEN, P.; GUTIÉRREZ, A. Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 2, p. 248–254, 2013. Elsevier Ltd.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. DEL P.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; HERRERO, M. Bioactives Obtained From Plants, Seaweeds, Microalgae and Food By-Products Using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 76, p. 27–51, 2017.

SANTOS, K. A.; DE AGUIAR, C. M.; DA SILVA, E. A.; DA SILVA, C. Evaluation of favela seed oil extraction with alternative solvents and pressurized-liquid ethanol. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 169, n. November, 2021. Elsevier B.V.

SANTOS, K. A.; FROHLICH, P. C.; HOSCHEID, J.; et al. Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO₂ with ethanol and ethyl acetate cosolvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, n. January, p. 323–330, 2017. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.029>>..

SARKAR, S.; ALVAREZ, V. H.; SALDAÑA, M. D. A. Relevance of ions in pressurized fluid extraction of carbohydrates and phenolics from barley hull. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 27–37, 2014.

DA SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016. Elsevier B.V.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **METHODS IN ENZYMOLOGY**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SKENDI, A.; HARASYM, J.; GALANAKIS, C. M. **Recovery of high added-value compounds from brewing and distillate processing by-products**. Elsevier, 2018.

SLUITER, A.; B, H.; RUIZ, R.; et al. Determination of Ash in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, v. 36, n. 4, p. 302–305, 2005.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; et al. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, , n. March, p. 3–5, 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. O.; et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**, , n. August, p. 1–14, 2004.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005 - 42619.pdf. **Technical Report NREL/TP-510-42619**, , n. January, p. 1–9, 2008. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42619.pdf>>. .

SOCACI, S. A.; FĂRCAȘ, A. C.; DIACONEASA, Z. M.; et al. Influence of the extraction solvent on phenolic content, antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activities of brewers' spent grain. **Journal of Cereal Science**, v. 80, p. 180–187, 2018. Elsevier Ltd.

SPINELLI, S.; CONTE, A.; LECCE, L.; PADALINO, L.; DEL NOBILE, M. A. Supercritical carbon dioxide extraction of brewer's spent grain. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 69–74, 2016. Elsevier B.V.

STEFANELLO, F. S.; DOS SANTOS, C. O.; BOCHI, V. C.; et al. Analysis of polyphenols in brewer's spent grain and its comparison with corn silage and cereal brans commonly used for animal nutrition. **Food Chemistry**, v. 239, p. 385–401, 2018.

TORRES-MAYANGA, P. C.; AZAMBUJA, S. P. H.; TYUFEKCHIEV, M.; et al. Subcritical water hydrolysis of brewer's spent grains: Selective production of hemicellulosic sugars (C-5 sugars). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, n. September 2018, p. 19–30, 2019.

TREVISANI JUCHEN, P.; NOLASCO ARAUJO, M.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L.; PEDERSEN VOLL, F. A. Extraction of parboiled rice bran oil with supercritical CO₂ and ethanol as co-solvent: Kinetics and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. February, p. 111506, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111506>>. .

WIJNGAARD, H.; HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 505–513, 2012. Elsevier.

YOUSEFI, M.; RAHIMI-NASRABADI, M.; POURMORTAZAVI, S. M.; et al. Supercritical fluid extraction of essential oils. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 182–193, 2019.

ZHANG, Y.; LI, S. FEN; WU, X. WEN. Pressurized liquid extraction of flavonoids

from *Houttuynia cordata* Thunb. **Separation and Purification Technology**, v. 58, n. 3, p. 305–310, 2008.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, 1999.