



## **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FARINHA DE DRECHE**

**Maria Alexandra da Purificação Rodrigues Neto da Costa**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Alimentar**

Orientadora: Professora Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa

Co-Orientador: Professor Doutor Vítor Manuel Delgado Alves

**Júri:**

**Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa**

**Vogais: Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa**

**Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa**

**Doutora Maria Isabel Nunes Januário, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa**

**Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa**

Lisboa, 2013

## Agradecimentos

---

Com a realização deste trabalho consegui finalmente, atingir um objetivo que há muito se encontrava por concretizar, o que só foi possível com muita determinação, algum esforço e o apoio incondicional da família.

Para que esta dissertação de mestrado fosse uma realidade, contei com a ajuda de todas as pessoas que se cruzaram comigo, ao longo destes últimos meses que passei no ISA e às quais, quero manifestar o meu maior respeito e sincera admiração e consideração, agradecendo:

- À professora Doutora Isabel de Sousa, na qualidade de orientadora, pela orientação na realização da dissertação de Mestrado;
- Ao professor Doutor Vitor Alves, na qualidade de co-orientador, por todas as orientações técnicas e todo o apoio e disponibilidade demonstrados ao longo da realização do trabalho;
- À equipa de investigadores, Dra. Quina, Dr. Tiago, Eng<sup>a</sup>. Carolina, aos colegas de Mestrado, Diana, Bruno, Elsa e Susana e à equipa técnica do Laboratório, D. Júlia e D. Graziela;
- A todos quantos, direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar até aqui,

Muito Obrigada!

A dreche de cerveja é a massa resultante da filtração do mosto de cerveja e constitui, um dos sub-produtos da indústria cervejeira.

Com o objetivo de transformar este sub-produto em matéria-prima para a indústria da panificação, quantificaram-se alguns componentes bioativos nomeadamente, minerais, polissacáridos, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos seus compostos (AOA).

A AOA determinada diretamente na farinha de dreche, pelo método do radical DPPH, variou entre 0,034 para 0,011 TEAC (M Trolox/100 g Farinha) e, pelo método do FRAP, variou entre 0,066 e 0,031 TEAC (M Trolox/100 g de Farinha). Estes valores foram dependentes da concentração de farinha e de extrato na mistura reacional e, inferiores aos obtidos em repiso de tomate, orégãos e carqueja.

Relativamente à fração mineral, 100 g de farinha de dreche contém 260 mg de cálcio, 255 mg de fósforo, 186 mg de magnésio, 9 mg de sódio, 7 mg de ferro e 4 mg de zinco, sendo estes teores mais elevados que os das farinhas de trigo e de centeio.

No processo de extração aquosa, obteve-se um rendimento de cerca de 7% de extrato liofilizado, 80% de sólidos insolúveis, 2% de polissacáridos e um teor em fenólicos totais de 18,63 mg EAG/g de extrato, avaliado diretamente em soluções aquosas concentradas, por espectrofotometria a 280 nm.

Dos resultados obtidos, conclui-se que a farinha de dreche apresenta alguma atividade antioxidante e elevado teor em minerais, sendo de considerar a sua incorporação em produtos de panificação, como incremento de compostos bioativos.

Palavras-chave: Farinha de dreche, actividade antioxidante, caracterização química, método DPPH, método FRAP.

Resulting from the filtration of wort, BSG is, among others, a by-product of the brewing industry.

With the purpose of transforming this by-product in raw material to use in the baking industry, some of the bioactive components have been quantified, namely minerals, polysaccharides, phenolic components and antioxidant capacity of its components (AOA).

The AOA was measured directly on BSG flour by DPPH method and ranged from 0.034 to 0.011 TEAC (M Trolox/100 g flour). When using the FRAP method, values varied between 0,066 and 0,031 TEAC (M Trolox/100g flour). These values were dependent on the concentration of flour and extract in the mixture and are lower than the ones obtained in tomato repiso, oregano and gorse.

As for the mineral fraction, 100 gr of flour contains 260 mg of calcium, 255 mg of phosphorus, 186 mg of magnesium, 9 mg of sodium, 7 mg of iron and 4 mg of zinc, these levels are higher when compared to the ones for wheat and rye flours.

Using spectrophotometry at 280 nm in concentrated aqueous solution, it was observed that the total phenolic content was of 18,63 mg EAG/g extract and by using the aqueous extraction process it was obtained a yield of 7% lyophilized extract, 80% insoluble solids and 2% polysaccharides.

From all the results obtained it can be concluded that BSG flour has some antioxidant activity and high contents of minerals leading to the conclusion that can be incorporated in bakery products as a source to increase bioactive components.

Key-words: Brewers spent grain (BSG), antioxidant activity, chemical characterization, DHPP method, FRAP method.

Among other by-products, the brewing industry produces yeasts that are reused in the manufacturing of pharmaceutical and cosmetic products and brewers spent grain (BSG) obtained from the filtration of wort.

In addition to the polymeric components such as lignin of phenolic nature, glucose units linked through  $\beta$ 1- $\rightarrow$ 4 glycosidic linkage and monosaccharides, including xylose, arabinose, manose and galactose which sometimes can be replaced by non-saccharides groups. BSG also contains high contents of proteins, vitamins and minerals, with special attention to B complex vitamins (biotin, choline, folic acid, niacin, pantothenic acid, riboflavin, thiamine and pyridoxine) and minerals such as calcium, magnesium, silicon, phosphorus, copper, cobalt, iron, manganese, potassium, selenium, sodium and sulphur.

Given its nutritional value, research has been conducted to find new ways to add value to this by-product and transform it into an attractive raw material that can be used in the food industry as food supplements and nutraceutical components through the extraction of its bioactive and prebiotic components. At the same time, other researches have been conducted to find more applications for this by-product and increase its value, such as xylitol and biopolymer production, bioethanol production, substrate for mushroom production, adsorbent in effluent treatment, and others.

The main objective of the present work was to characterize physically and chemically the BSG flour after dried and milled and also evaluate the antioxidant activity of its bioactive components.

Thus, we proceeded with the determination of the physical and chemical parameters of BSG such as color and density, pH, moisture content, ash and minerals, protein content and organic extract. It was also obtained an aqueous extract of BSG which was lyophilized to get a more suitable matrix to allow a better quantification of the polysaccharides and total phenolic contents. The results showed a density of 0,56 g/cm<sup>3</sup>, pH 5.3, a moisture content of 6.2% and 3% ash content. The results for protein and organic extract, dry basis, were 23% and 16,5%, respectively.

As for the mineral fraction, 100 gr of flour contains 260 mg of calcium, 255 mg of phosphorus, 186 mg of magnesium, 9 mg of sodium, 7 mg of iron and 4 mg of zinc, these levels are higher when compared to the ones for wheat and rye flours.

When using the process of aqueous extraction, it was obtained a yield of 7% of lyophilized extract, 80% of insoluble solids and 2% of polysaccharides. The total phenolic content obtained was 18,63 mg EAG/g extract, measured directly in concentrated aqueous solutions, by spectrophotometry at 280nm.

The antioxidant activity was measured through DPPH• methods and antioxidant power of iron reduction method – FRAP. This review was performed directly on BSG (Quencher method) and in its lyophilized aqueous extract. It was observed that by reacting the radical DPPH directly with BSG, it originates a TEAC value lower than that obtained in the lyophilized aqueous extract.

This may be related to: (i) diffusional limitations on the flour particles which decrease the extension of the reaction, (ii) the extration process can be selective by separating from the matrix the components with higher antioxidant power.

It was obtained by DPPH• methods, values between 0,034 and 0,011 TEAC (M Trolox/100g flour), for mass values range from 100 to 300mg of flour, respectively. By using the FRAP method, it was obtained values between 0,066 and 0,031 TEAC (M Trolox/100g flour), for mass values range from 25 to 50mg of flour respectively. In the end it was observed that the antioxidant activity decreased when increasing the concentration and is lower than the one observed for tomato repiso, oregano and gorse.

From all the results obtained it can be concluded that BSG flour has some antioxidant activity and high contents of minerals leading to the conclusion that can be incorporated in bakery products as a source to increase bioactive components.

## Lista de Figuras

---

Figura 1 –	Diagrama de parte do processo tecnológico do fabrico de cerveja (Adaptado de Mussatto, 2006)	4
Figura 2 –	Estrutura molecular de tocoferol (Ramalho & Jorge, 2006)	8
Figura 3 –	Estrutura molecular dos ácidos benzoicos e cinamicos (Ramalho & Jorge, 2006)	9
Figura 4 –	Diagrama do processo de panificação (Adaptado de Costa S.B., 2011)	12
Figura 5 -	Processo de secagem da dreche húmida	15
Figura 6 –	Caracterização das matrizes obtidas da dreche	15
Figura 7 –	Esquema para medição do volume ocupado pela farinha de dreche no interior da caixa	16
Figura 8 –	Esquema de Extrator Soxhlet	20
Figura 9 -	Fluxograma do processo de extração aquosa com indicação de balanço de massas	21
Figura 10 –	Reta de calibração do ácido gálico	24
Figura 11 -	Variação da cor do DPPH de acordo com a actividade antioxidante das amostras	26
Figura 12 –	Reta de calibração do DPPH	28
Figura 13 -	Variação da cor do FRAP de acordo com a actividade antioxidante das amostras (adaptado de Prior et al., 2005)	28
Figura 14 –	Reta de calibração do FRAP	30
Figura 15 –	Comparação do teor em minerais na farinha de dreche com outras farinhas panificáveis	32
Figura 16 -	Percentagem de cada elemento no total de cinza	33
Figura 17 –	Determinação do teor de compostos fenólicos pelo Método Ribéreau-Gayon, ( $\lambda$ 280nm U.V.), no extrato liofilizado da farinha de dreche	35
Figura 18 –	Comparação do teor em minerais na farinha de dreche e nos sólidos insolúveis	36
Figura 19 –	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH• em farinha filtrada – efeito da concentração de farinha	37

Figura 20 -	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método FRAP em farinha centrifugada – efeito da concentração com centrifugação	38
Figura 21 –	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método FRAP em farinha filtrada – efeito da concentração com filtração	39
Figura 22 –	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método FRAP em farinha filtrada e farinha centrifugada – efeito do processo	40
Figura 23 –	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método do DPPH• em Extrato Liofilizado – efeito do dobro do reagente	41
Figura 24 –	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método do DPPH• em Extrato Liofilizado – efeito da concentração	42
Figura 25 –	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método FRAP no extrato liofilizado	43

## Lista de Tabelas

---

Tabela 1	Quantidades estimadas dos principais subprodutos da indústria cervejeira e respectivas práticas de gestão e valor comercial (adaptado de Duarte L.C., 2007)	3
Tabela 2	Composição química da dreche mencionada por diversos autores (Aliyu & Bala, 2011)	5
Tabela 3	Preparação das amostras de acordo com a matriz e o método utilizado	25
Tabela 4	Caracterização da farinha de dreche	29
Tabela 5	Teor de polissacáridos no extrato aquoso	33
Tabela 6	Comparação de valores de TEAC obtidos em farinha de dreche, repiso de tomate e oregãos	36
Tabela 7	Comparação de valores de TEAC obtidos em extrato de farinha de dreche e extrato de carqueja	41
Tabela 8	Avaliação da atividade antioxidante nas diferentes matrizes pelo método Quencher	41

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Extensed Abstract	IV
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	2
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
2.1. A Indústria Cervejeira	3
2.2. Dreche cervejeira	4
2.3. Valorização da Dreche	5
2.4. Farinha de Dreche	6
2.5. Compostos bioativos na farinha de dreche	7
2.6. Atividade antioxidante	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Farinha de Dreche	15
3.2. Caracterização físico-química da farinha	16
3.2.1. Massa específica ( $\rho$ ) da farinha de dreche	16
3.2.2. Cor	17
3.2.3. pH	17
3.2.4. Humidade	17
3.2.5. Cinza e minerais	18
3.2.6. Proteína	19
3.2.7. Extração orgânica	19
3.3. Processo de Extração Aquosa	21
3.4. Caracterização química do extrato aquoso	21
3.5. Atividade antioxidante - AOA	23
3.5.1. Método DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	26
3.5.2. Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4.1.	Caracterização da farinha de dreche	31
4.2	Rendimento da Extração Orgânica	33
4.3.	Processo de extração aquosa	33
4.4.	Caracterização do extrato aquoso e da fração insolúvel	34
4.4.1.	Extrato aquoso	34
4.4.2.	Caracterização da fração insolúvel	35
4.5.	Avaliação da atividade antioxidante da farinha de dreche e do seu extrato liofilizado	36
4.5.1.	Farinha de Dreche	36
4.5.2.	Extrato liofilizado da farinha de dreche	41
5.	CONCLUSÕES	44
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
7.	ANEXOS	49

## 1. INTRODUÇÃO

---

A cerveja é, provavelmente a bebida alcoólica mais antiga criada pelo Homem (Costa, S., 2011).

Em Portugal, a produção de cerveja remonta à época dos Lusitanos contudo, com a ocupação romana esta bebida foi preterida pelo vinho, tendo ressurgido com o fim deste império. Foi no entanto, com a conquista de Portugal aos árabes que se implantou uma verdadeira produção de cerveja.

A indústria cervejeira gera entre outros subprodutos, leveduras que são reutilizadas na produção de cosméticos e produtos farmacêuticos, e a massa resultante da filtração do mosto a que se dá o nome de “*Dreche*”.

Este produto, devido às dificuldades de conservação e transporte, tem baixo valor económico e tem sido utilizado maioritariamente na produção de rações para alimentação animal.

Dado o seu valor nutricional, tem-se vindo a estudar novas formas de valorização deste produto transformando-o em matérias-primas mais atrativas, designadamente para incorporação na alimentação humana em formulações de suplementos alimentares e compostos nutracêuticos, através de processos de extração dos seus componentes bioativos e prébioticos. Estes processos são cada vez mais desenvolvidos e afinados de modo a obter maior rendimento e diversidade de compostos.

Contudo, ao aproveitar-se apenas alguns componentes da dreche, continua a haver descarte dos restantes constituintes que não são aproveitados, bem como dos resíduos entretanto produzidos nos respectivos processos de extração tais como, produtos químicos (reagentes), material contaminado ou outro, incrementando assim o impacto ambiental negativo.

De modo a contrariar esta tendência, propõe-se a utilização integral da dreche, valorizando substancialmente este produto uma vez que, reutiliza um subproduto na sua totalidade, anulando o impacto negativo referido.

Do ponto de vista económico, esta reutilização poderá ser viável uma vez asseguradas as condições higio-sanitárias que garantam a inocuidade do produto, mas que não se traduzam num aumento de custos para a indústria cervejeira.

O presente estudo encontra-se inserido num trabalho abrangente, cujo objetivo geral consiste no aproveitamento e valorização da dreche de modo a poder ser incorporada em produtos de panificação conferindo-lhes propriedades funcionais acrescidas para o organismo humano.

Para atingir este objetivo final e, dado este ser um trabalho complexo, foi criado um grupo de trabalho constituído por vários elementos, pelos quais foram distribuídas as diferentes fases de todo o processo: (i) a caracterização da dreche à saída da fábrica, (ii) os processos de estabilização do produto e transformação em farinha, (iii) a caracterização físico-química da farinha de dreche, (iv) incorporação da farinha em pão e o estudo das propriedades funcionais e sensoriais associadas do produto final, bem como (vi) a avaliação do mercado alvo dos produtos com incorporação de dreche.

## 1.1. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho consiste na caracterização física e química da farinha obtida por secagem e moenda da dreche de cerveja, bem como na avaliação da atividade antioxidante dos compostos bioativos presentes. Pretende-se avaliar o potencial deste produto para incorporação direta em produtos de panificação, acrescentando-lhes propriedades funcionais para o organismo humano e minimizando o impacto ambiental negativo decorrente da indústria cervejeira.

Durante a consulta bibliográfica efetuada verificou-se que a maioria dos trabalhos tem incidido na identificação dos vários compostos bioativos existentes na dreche designadamente, fenólicos, carotenoides, tocoferóis; na avaliação do rendimento de extração destes bioativos, através de técnicas laboratoriais que isolam estes compostos dos demais componentes da dreche, avaliando posteriormente a sua actividade fora da matriz e de forma isolada.

Assim, e dado que se pretende a utilização integral deste subproduto como matéria-prima no processo de panificação, a relevância deste trabalho assenta em grande parte na avaliação direta da atividade antioxidante dos compostos existentes na farinha de dreche sem nenhum processo de extração prévia, ou do seu extrato aquoso, e não de compostos isolados.

Por conseguinte, neste trabalho experimental, pretende-se caracterizar a farinha de dreche e quantificar alguns componentes bioativos nomeadamente, polissacáridos, compostos fenólicos totais e minerais e ainda, avaliar a capacidade antioxidante dos seus compostos (AOA) através dos métodos do radical DPPH e do poder antioxidante de redução do ferro – FRAP, na farinha bem como no seu extrato seco liofilizado, obtido por extração aquosa a quente.

## 2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

### 2.1. A Indústria Cervejeira

A produção de cerveja no nosso país em 2011, nas 7 unidades industriais existentes em território nacional, foi cerca de 8.299 milhares de hectolitros, valor ligeiramente inferior ao registado no ano anterior, segundo dados divulgados pela APCV – Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja, tendo o consumo interno rondado os 5.300 milhares de hectolitros, dando um consumo *per capita* de cerca de 53 litros (valor estimado pela APCV).

Os subprodutos resultantes desta indústria estão apresentados na Tabela 1, tendo como destino principal a alimentação animal. Salienta-se contudo, que relativamente aos preços praticados, a dreche é o produto com menor valor comercial, provavelmente devido à sua elevada percentagem de humidade (entre 50 a 80%), que o torna difícil de transportar e mais fácil de se deteriorar (Duarte *et al.*, 2007).

**Tabela 1 – Quantidades estimadas dos principais subprodutos da industria cervejeira e respectivas práticas de gestão e valor comercial (adaptado de Duarte *et al.*, 2007)**

Subprodutos	Produção Nacional (t/ano)	Destino (%)	Valor Comercial
		Alimentação Animal	(€/t)*
Dreche	97.536,2	100	18
Levedura	3.645,1	95,8	n.d.
Levedura seca	425,0	100	200
Radículas de malte	1.697,0	100	130
Pó de malte	35,0	100	100

\*Base húmida, excepto para a levedura seca

Segundo os mesmos autores, a dreche cervejeira e outros produtos como por exemplo o bagaço de azeitona, o repiso de tomate, o engaço de uva, têm grande potencial de valorização tendo em conta as quantidades produzidas, o valor económico, as propriedades físico-químicas, a disponibilidade de tecnologia, entre outros. Contudo, a dispersão geográfica das indústrias e as quantidades individuais produzidas, constituem algumas das barreiras à valorização destes subprodutos.

## 2.2 Dreche cervejeira

A dreche de cerveja, ou bagaço húmido de malte como também se pode chamar, é a massa resultante da filtração do mosto de cerveja, identificado na Figura 1 e constitui um dos subprodutos da indústria cervejeira.

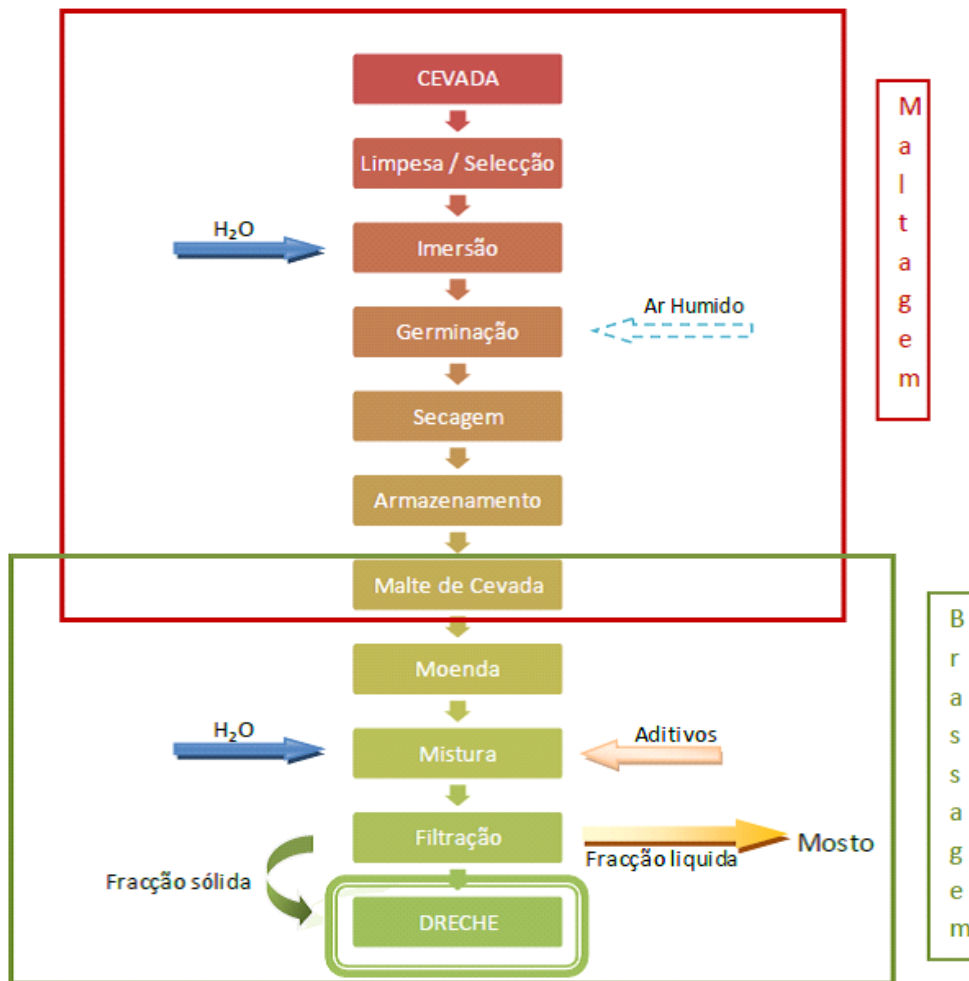


Figura 1 – Diagrama de parte do processo tecnológico do fabrico de cerveja (Adaptado de Mussatto, 2006)

Este subproduto é composto essencialmente por água, cascas e alguns fragmentos dos grãos de cevada (Parajó et al., 2009). Os seus constituintes são proteína, pentosanas, lenhina, amido e  $\beta$ -glucanos, celulose, lípidos e cinza (Santos et al., 2003).

As três componentes estruturais poliméricas são a lenhina de natureza fenólica, a celulose que é um polímero linear constituído por unidades de glucose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e as hemiceluloses que são heteropolissacáridos ramificados compostos por uma variedade de

monossacáridos, incluindo xilose, arabinose, manose e galactose, por vezes substituídos por grupos não-sacáridos (Parajó et al., 2009).

Para além destes componentes, a dreche contém também elevado teor proteico, vitamínico e mineral, destacando-se as vitaminas do complexo B (biotina, colina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, tiamina e piridoxina) e minerais como cálcio, magnésio, silício, fosforo, cobre, cobalto, ferro, manganês, potássio, selénio, sódio e enxofre (Gupta *et al.*, 2010, Aliyu & Bala, 2011). Na Tabela 2, estão indicados alguns valores referentes à composição química da farinha de dreche, referidos por vários autores.

**Tabela 2 – Composição química da dreche (Adaptado de Aliyu & Bala, 2011)**

Componentes (% matéria seca)	Kanauchi et al.(2001)	Russ et al.(2005)	Mussatto e Roberto (2006)	Mussatto et al.(2008a)	Adeniran et al.(2008)	Khidzir et al.(2010)
Celulose	25,4	23-25	16,8	16,8±0,8	-	-
Hemicelulose	-	30-35	28,4	28,4±2,0	-	-
Lenhinhã	11,9	7-8	27,8	27,8±0,3	-	-
Proteína	24	19-23	15,3	-	2,4±0,2	6,4±0,3
Cinza	2,4	4-4,5	4,6	4,6±0,2	7,9±0,1	2,3±0,8
Extratáveis	-	-	5,8	-	-	-
Outros	21,8**	-	-	22,4±1,2*	-	-
Humidade	-	-	-	-	6,4±0,2	-
Lípidos	10,6	-	-	-	-	2,5±0,1

\*\*arabinoxilanos \* combinação entre proteínas e extratáveis

Na dreche é ainda possível encontrar compostos fenólicos com elevada actividade antioxidante (Abreu, 2011), tais como ácidos fenólicos e flavonoides (Zilic *et al.*, 2011) com propriedades anti-inflamatórias, anti-mutagénicas e anti-cancerígenas bem como capacidade de modelar funções enzimáticas (Yu *et al.*, 2001).

Os ácidos fenólicos e os flavonoides são os compostos fenólicos mais comuns em cereais integrais e podem encontrar-se na forma livre, esterificados com açúcares ou outros compostos de baixo peso molecular ou ainda em formas ligadas insolúveis (Zilic *et al.*, 2011).

## 2.3 Valorização da Dreche

Praticamente todos os subprodutos da agro-indústria e indústria alimentar, constituem um problema ambiental quando não tratados convenientemente.

Na tentativa de minimizar os impactos negativos que, estes produtos provocam na natureza, têm sido estudadas várias formas de valorização dos resíduos agroindustriais e subprodutos da indústria alimentar.

O aproveitamento mais corrente dado à dreche é a alimentação animal, tanto para ruminantes como para monogástricos, peixes e crustáceos.

A dreche é uma boa fonte de proteína mas devido ao elevado teor em fibra, pode criar problemas de digestibilidade (Levic, *et al.*, 2010).

Por outro lado, tem-se tentado acrescentar valor a este subproduto, através da sua transformação em farinha para incorporação em produtos de panificação e cereais de pequeno-almoço, destinados à alimentação humana.

Uma das principais empresas de produção de bebidas em Portugal, a Unicer Bebidas, S.A., tem em curso o projeto “*DRECHEVALOR*” que envolve a análise e desenvolvimento de processos alternativos para a valorização da dreche nomeadamente, a separação de proteínas e fibras de modo a poderem ser utilizadas como aditivos nutracêuticos na indústria alimentar.

Entretanto, muitas outras aplicações para valorização de dreche têm sido estudadas – é o caso da produção de xilitol, de biopolímeros, de bioetanol, como substrato para a produção de cogumelos, como adsorvente no tratamento de efluentes, entre outras (Mussatto *et al.*, 2005, Gregori *et al.*, 2008, Gupta *et al.*, 2010, Aliyu *et al.*, 2011).

A utilização de extratos de dreche, em embalagens ativas, para grande variedade de produtos alimentares também é uma opção, uma vez que quando doseado na superfície do filme, mantém uma elevada capacidade antioxidante (Abreu *et al.*, 2012), prolongando o tempo de vida útil desses alimentos.

## 2.4 Farinha de Dreche

Como já referido, a dreche contém vários componentes bioativos de grande interesse para a saúde o que faz com que se desenvolvam trabalhos de investigação no sentido de direcionar este subproduto de baixo valor, para outras indústrias nomeadamente, para a indústria de panificação e de confeitaria.

Neste sentido, a massa húmida de dreche deverá ser processadas de modo a valorizá-la economicamente, facilitando a sua manipulação e conservação.

Em primeiro lugar, a dreche deve ser recolhida e acondicionada em condições que impeçam qualquer tipo de contaminação (química, física ou biológica). Posteriormente, será necessário proceder à sua estabilização através de processo de secagem, reduzindo a percentagem de água e conseqüentemente reduzindo drasticamente a flora microbiana. Por último, a massa seca de dreche sofrerá um processo de moenda, mais ou menos fina, de acordo com os critérios pretendidos, obtendo-se uma farinha com características próximas das farinhas tradicionalmente utilizadas permitindo criar lotes com diferentes percentagens de incorporação.

Segundo Gupta *et al.*, (2010), a farinha de dreche é de fácil mistura, tem metade do valor calórico da maioria das farinhas, tem elevada capacidade de absorção de água, elevado teor de proteína, elevado teor de fibra, na forma de arabinosilanos, baixa absorção de gordura, uma cor castanho dourado, um sabor suave e um aroma levemente torrado.

Contudo, estes dois parâmetros (cor e sabor) podem causar algumas limitações quanto à sua utilização. Por exemplo, deverá ser utilizada apenas em produtos denominados “não-brancos” com percentagens de incorporação entre 5 e 10% (Gupta *et al.*, 2010).

Apesar das percentagens de incorporação referidas, Ajanakua *et al.*, (2010) referem que o limite máximo de incorporação de farinha de dreche não deve exceder os 3%, uma vez que percentagens de incorporação superiores afetaram os sinusoides hepáticos bem como o revestimento epitelial dos fígados das cobaias, utilizadas no estudo dos efeitos histopatológicos. Contudo e, apesar desta indicação, os autores consideram que a utilização da dreche na alimentação humana constituiu um bom suplemento proteico a ser utilizado em produtos de confeitaria.

## 2.5 Compostos bioativos na farinha de dreche

### Compostos fenólicos

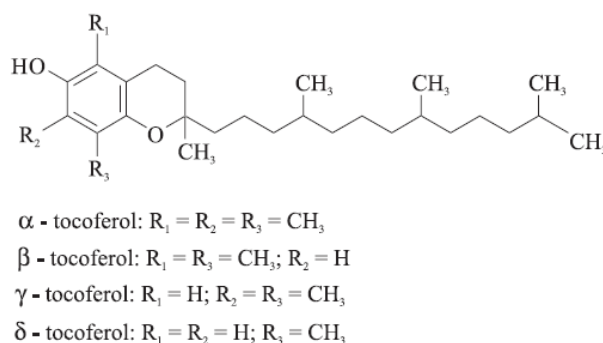
Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam grupos hidroxilo ligados a anéis aromáticos, nas formas simples ou em polímeros que lhes conferem poder antioxidante e, podem ocorrer em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas, destacando-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis, como sendo os mais comuns na natureza (Ângelo & Jorge, 2007, Zilic *et al.*, 2011).

Os flavonoides são derivados hidroxilados da cromona (benzo- $\gamma$ -pirona) e encontram-se habitualmente dissolvidos no fluido vacuolar sob diversas formas de heterósidos que são moléculas constituídas por uma parte não glucídica – a genina – e por uma parte glucídica,

sendo sempre solúveis em solvente polares. Os principais tipos de geninas são as flavonas, flavonóis (3-hidroxi flavonas), flavanonas, di-hidroflavonóis, flavan-3-óis, flavan-3,4-dióis, chalconas, auronas e antocianidóis (Pinto, 2010).

Os tocoferóis ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol e  $\delta$ -tocoferol), representados na Figura 2, são compostos monofenólicos com actividade antioxidante, cujo mecanismo de ação se baseia na captura de radicais livres (Goupy *et al.*, 1999, Angelo & Jorge, 2006). São considerados dos melhores antioxidantes e amplamente usados na inibição da oxidação dos ácidos gordos insaturados (Ramalho & Jorge, 2006).

O seu poder antioxidante decresce do composto  $\delta$  para o composto  $\alpha$ , o que quer dizer que o  $\alpha$ -tocoferol, mais conhecido como vitamina E, é o que tem menor poder antioxidante (Angelo & Jorge, 2006). Contudo, outros autores referem que o poder antioxidante dos tocoferóis depende da temperatura, da composição e forma do composto lipídico (líquido ou em emulsão) (Ramalho & Jorge, 2006).

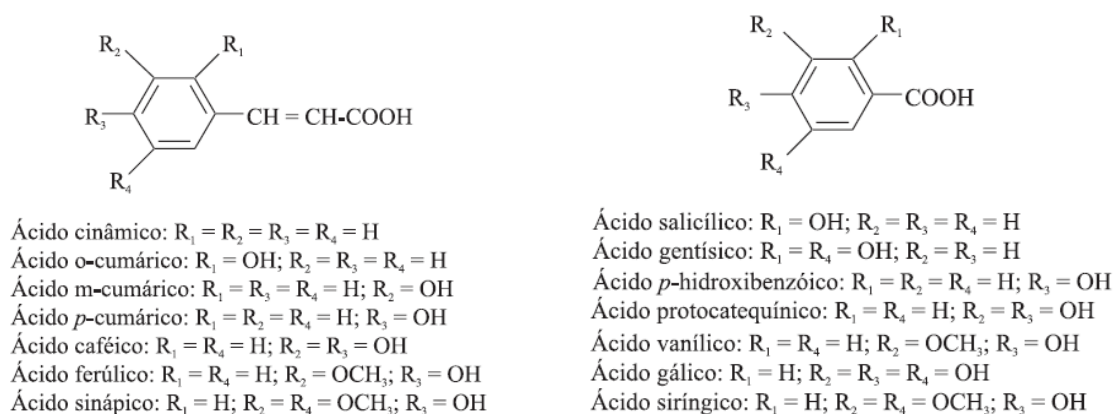


**Figura 2 – Estrutura molecular de tocoferol (Ramalho & Jorge, 2006)**

Na cevada, a maior classe de compostos fenólicos é a dos flavan-3-óis, aparecendo na forma de monómeros de (+)-catequina e de (-)-catequina, na forma de polímeros constituídos por unidades de (+)-catequina e de (+)-galhocatequina. Os dímeros mais abundantes são a prodelfinidina B3 e a procianidina B3 sendo os principais trímeros a procianidina C2 denominados trímeros proantocianidina T4 quando formado por 3 átomos de carbono e trímeros proantocianidina T1, T2 e T3 quando formados por 3 átomos de carbono e uma unidade de (+)- galhocatequina ligados entre si por ligações C4-C8 (Goupy *et al.*, 1999).

O teor de compostos fenólicos na drecbe depende das variedades de cevada, do seu tempo de colheita e das características edafo-climáticas, não se alterando com processos de secagem em estufa à temperatura de 60°C ou por liofilização, (Santos *et al.*, 2002).

Os ácidos fenólicos, representados na Figura 3, apresentam um grupo funcional carboxilo e são divididos em duas classes: os ácidos hidroxibenzoicos, componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis e os ácidos hidroxicinâmicos, presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal como café, erva-mate, maçã, ameixa e outras frutas, crucíferas e cereais, que podem estar esterificados ao ácido quinico, ácido tartárico ou glúcidos e derivados, mas também podem ser encontrados na forma livre em alimentos como o tomate e a cerveja (Oliveira *et al.*, 2011). Estes compostos também se encontram no vinho (Cabrita *et al.*, 2003).



**Figura 3 – Estrutura molecular dos ácidos benzoicos e cinâmicos (Ramalho & Jorge, 2006)**

Nos grãos de cevada, os ácidos fenólicos encontrados são: ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, protocatecuico e ácidos clorogenicos (Yu *et al.*, 2001). O ácido *p*-cumárico e o ácido ferúlico também foram detetados na dreche (McCarthy *et al.*, 2012), sendo os ácidos mais importantes da série cinâmica, também presentes na polpa e película das uvas encontrando-se combinados com o ácido tartárico na forma de monoésteres (Cabrita *et al.*, 2003).

Estes pertencem ao grupo dos fenilpropanoides que são compostos fenólicos do tipo  $C_6 C_3$ , designados por fenilpropenos e fenilpropanos, consoante apresentem ou não uma dupla ligação na cadeia lateral, sendo agentes antioxidantes (captadores de radicais livres) aparecendo sob a forma de heterósidos, ésteres e dímeros (Pinto *et al.*, 2010).

Os fenilpropanoides encontram-se polimerizados na parede celular da lenhina das gramíneas e são compostos por unidades de *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila e ácidos *p*-hidroxicinâmicos esterificados de baixo peso molecular e que se libertam da parede celular por hidrólise ácida (Saliba *et al.*, 2001).

A extração dos compostos fenólicos pode ser feita através de hidrólises aquosas, ácidas, enzimáticas ou numa conjugação entre estas. Num estudo efetuado por Yu *et al.*, (2001), nos cromatogramas obtidos das diferentes hidrólises, foi possível verificar que a hidrólise enzimática conjugada com a ácida foi a que registou picos mais bem definidos relativamente aos ácidos *p*-hidroxibenzoico, cafeico, protocatecuico, vanílico, clorogénicos, *p*-cumárico e ferúlico enquanto na hidrólise aquosa simples apenas foram identificados picos muito ligeiros referentes ao ácido protocatecuico e aos ácidos clorogénicos.

Infere-se então que a hidrólise aquosa permite a libertação de ácidos hidrobenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos, nas suas formas esterificadas, mas em muito pequenas quantidades e que a hidrólise enzimática ácida é a que permite obter maior quantidade destes compostos fenólicos.

## Carotenoides

Os carotenoides são um grande grupo de pigmentos lipossolúveis presentes em muitos frutos e vegetais folhosos e não folhosos, com importantes propriedades antioxidantes, dado que são captadores de radicais livres, principalmente o licopeno, a luteína e a zeaxantina (Pinto, 2010).

Devido à sua capacidade antioxidante, conferem estabilidade aos alimentos e durante muito tempo apenas se deu importância ao  $\beta$ -caroteno ou provitamina A contudo, vários estudos foram relacionando outros carotenoides com benefícios para a saúde, sendo hoje em dia dado grande enfoque ao  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina, considerados os principais carotenoides presentes nos alimentos e com efeitos benéficos para a saúde (Rodriguez-Amaya, 2010).

Em extratos de malte e de cevada foram encontrados duas estruturas de carotenoides – luteína e zeaxantina (Goupy *et al.*, 1999), sendo estes os carotenoides com menor pigmento, são os que se encontram em maior quantidade nos ovos e no milho (Rodriguez-Amaya, 2010).

## Biodisponibilidade

A biodisponibilidade dos compostos bioativos, presentes nos alimentos, pode ser alterada por diversos fatores, tais como: complexidade da matriz alimentícia, forma química do composto de interesse, estrutura e capacidade de outros compostos ingeridos em conjunto, (fatores exógenos) e, tempo de trânsito intestinal, esvaziamento gástrico, metabolismo do composto e

grau de conjugação, possíveis interações com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, composição da microflora intestinal e perfil genético do indivíduo (fatores endógenos).

Como já foi referido, na cevada é possível encontrar ácidos hidrobenzoicos (ácido gálgico ou outros), ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico) e ainda ácidos clorogénicos ou formas esterificadas dos ácidos hidroxicinâmicos (por ex: o ácido 5-cafeoilquinico).

A absorção dos ácidos clorogénicos, no trato intestinal, é inferior à dos ácidos hidroxicinâmicos livres, sendo a maior parte metabolizada e absorvida no colon, através de ação das estereases de origem microbiana que os hidrolisa dando origem aos ácidos fenólicos livres (quínico, cumárico, cafeico e ferúlico) os quais são depois metabolizados através de transportadores ativos (Oliveira *et al.*, 2011).

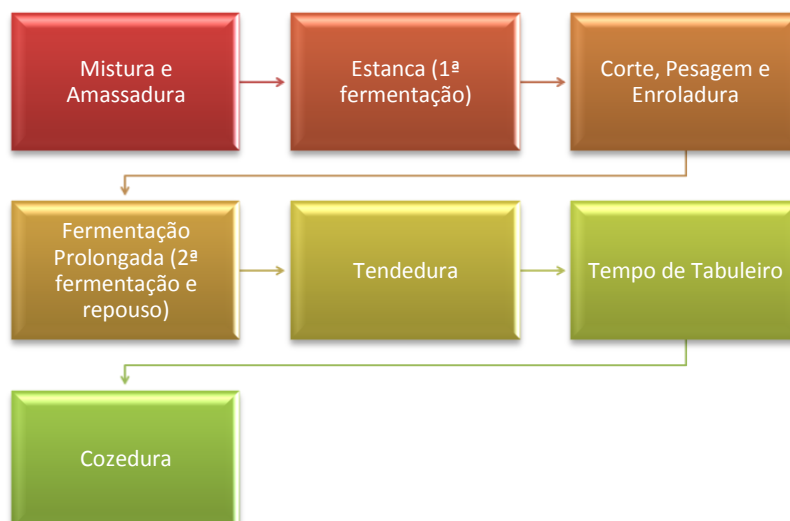
Relativamente à biodisponibilidade dos carotenóides, estes têm de ser libertados da matriz alimentar, por rutura desta (p.ex.: na mastigação) sendo as frações lipídicas depois digeridas através dos enzimas gástricos e pancreáticos e, solubilizadas em micelas dos sais biliares que são finalmente absorvidas pela mucosa intestinal (Rodriguez-Amaya, 2010).

## Efeitos do processo de panificação nos compostos bioativos

Os cereais panificáveis mais comuns (trigo, centeio, cevada) contêm compostos bioativos com interesse para a saúde.

A moagem e panificação são as técnicas mais comuns aplicadas aos cereais destinados à alimentação humana, tendo como principal vantagem, aumentar a biodisponibilidade dos nutrientes neles existentes (Martinez-Villaluenga *et al.*, 2009).

No processo de panificação, cujo diagrama está representado na Figura 4, desencadeiam-se complexas reações, durante a mistura, fermentação e cozedura ocorrendo evaporação de água, expansão do volume da massa, gelatinização do amido, desnaturação da proteína e formação de crostas.



**Figura 4 – Diagrama do processo de panificação (Adaptado de Costa, 2011)**

A ação do processo de panificação pode afetar a quantidade de compostos fenólicos resultantes, devido às alterações conformacionais das proteínas, ocorridas durante a mistura, ao consumo dos polissacarídeos durante a fermentação e as reações de Maillard ocorridas durante a cozedura (Sivam *et al.*, 2010).

Estudos efetuados por Martinez-Villaluenga *et al.*, (2009) avaliaram se o processo de panificação preserva a quantidade de compostos bioativos existentes nas farinhas de centeio e de trigo, tanto ao nível das vitaminas do complexo B (tiamina e riboflavina) como na atividade antioxidantes dos seus compostos (ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferóis, carotenoides, entre outros).

Nestes ensaios, o processo de panificação durou cerca de 55 horas, culminando no cozimento à temperatura de 260°C durante 40 minutos.

Para avaliação da atividade antioxidante, efetuaram dois tipos de extração nas massas panares e respectivos pães – uma com solução tampão fosfato-salina (PBS) de modo a não interferir na conformação molecular das amostras e outra com solução metanólica a 80%.

Os resultados obtidos em  $\mu\text{M}$  de Trolox (TEAC, PRSC e DPPH) e  $\mu\text{g}$  de tiamina e riboflavina, demonstraram que nos pães a atividade antioxidante assim como, o teor em tiamina e riboflavina foram inferiores aos das massas o que, poderá indicar que os compostos fenólicos e vitamínicos poderão ser afetados durante o processo de panificação. A atividade antioxidante decresceu cerca de 1,58  $\mu\text{M}$  de Trolox/g m.s., i.e., 10%, da massa panar para o respetivo pão,

enquanto os teores de tiamina e riboflavina, decresceram cerca de 62,17 µg/100 g e 63,88 µg/100 g, representando uma variação de 62% e 64%, respectivamente.

## 2.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante consiste em inibir ou interromper reações oxidativas que ocorrem naturalmente a nível celular.

Podem-se classificar os antioxidantes como: (i) primários ou compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres, por doação de átomos de hidrogénio (os tocoferóis estão incluídos neste grupo); (ii) sinergistas ou substâncias de baixa actividade antioxidante mas que podem aumentar a actividade dos antioxidantes primários; (iii) captadores de oxigénio (ex: ácido ascórbico) que podem atuar sinergicamente com os antioxidantes primários; (iv) biológicos ou enzimáticos (glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases) que atuam por remoção do oxigénio ou de outros compostos muito reativos; (v) agentes quelantes ou sequestradores que complexam iões metálicos (essencialmente cobre e ferro) sendo os mais comuns o ácido cítrico e os seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) e; (vi) mistos os quais tem sido amplamente estudados como antioxidantes alimentares, é o caso das proteínas hidrolisadas, dos flavonoides e derivados do ácido cinâmico (ácido cafeico) (Ramalho & Jorge, 2006).

A oxidação dos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo, por causas endógenas (redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases, presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de eletrões) que ocorrem na mitocôndria, nos lipossomas, no retículo endoplasmático, entre outros ou, causas exógenas tais como consumo do tabaco, da poluição do ar, de solventes orgânicos, de anestésicos, de pesticidas e de radiações (Soares, 2002).

O excesso de radicais livres, como por exemplo espécies reativas de oxigénio (ROS), incluindo superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e os radicais peróxidos lipídicos, têm sido associados ao envelhecimento e à ocorrência de doenças degenerativas, tais como cancro, doenças cardiovasculares e doenças neurológicas (Sun-Waterhouse, 2010).

Os subprodutos agroindustriais, ricos em fibra, contêm ácidos fenólicos derivados dos ácidos cinâmicos, sendo que os mais comuns encontrados em grãos de cereais são os ácidos hidroxicinâmicos (Bauer *et al.*, 2012).

Os ácidos fenólicos existentes nos cereais podem atuar como captadores de radicais livres, como redutores e como agentes complexantes de iões metálicos (Bauer *et al.*, 2012) bem como supressores da formação de oxigénio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), podendo ainda reduzir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (Zilic *et al.*, 2011), i.e., com impacto na colesterolémia.

A atividade antioxidante destes compostos pode ocorrer por transferência de átomos de hidrogénio, é o caso por exemplo dos tocoferóis (Ramalho & Jorge, 2006) ou por transferência de um eletrão, obtendo-se o mesmo resultado final dependendo a ocorrência de um ou outro mecanismo e a eficácia do antioxidante, da estrutura e propriedades do antioxidante, do seu coeficiente de solubilidade, da energia de dissociação e potencial de ionização (Prior *et al.*, 2005).

### 3.1. Farinha de Dreche

A farinha de dreche, utilizada neste trabalho experimental, foi obtida da matéria orgânica húmida (bagaço húmido de malte) resultante da filtração do mosto da cerveja e, proveniente da unidade industrial da Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, S.A., em Vialonga.

Esta massa foi transportada para o Instituto Superior de Agronomia em sacos de plástico e conservada em câmara de refrigeração a 4°C, durante o tempo em que foi decorrendo o processo de secagem, aproximadamente duas semanas.

O processo de secagem decorreu por “*batch*” de aproximadamente 8 kg, em estufa elétrica Binder, à temperatura de 60°C durante 48 horas. Depois de seca foi sujeita a processo de moenda, para obtenção de farinha, conforme ilustrado na Figura 5.

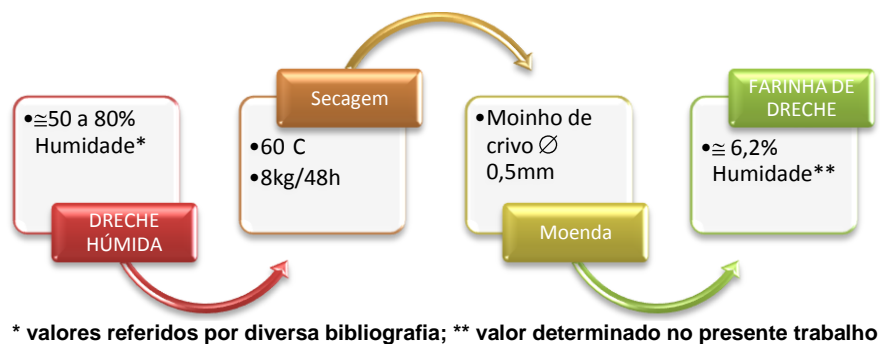


Figura 5 - Processo de secagem da dreche húmida

A farinha de dreche foi depois submetida a extração aquosa em sistema *Clevenger*, tendo-se obtido um resíduo sólido (húmido) que foi submetido a secagem e um extrato aquoso que foi liofilizado. Nas três matrizes foram determinados vários parâmetros de acordo com a Figura 6:

FARINHA DE DRECHE	RESÍDUO SÓLIDO INSOLUVEL	EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Massa específica</li> <li>• Cor</li> <li>• pH</li> <li>• Humidade</li> <li>• Cinza e Minerais</li> <li>• Proteína</li> <li>• Extrato orgânico</li> <li>• Atividade Antioxidante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humidade</li> <li>• Cinza e Minerais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polissacáridos</li> <li>• Fenóis Totais</li> <li>• Actividade Antioxidante</li> </ul>

Figura 6 – Caracterização das matrizes obtidas da Dreche

## 3.2. Caracterização físico-química da farinha

Na caracterização física da farinha de dreche, determinou-se a sua massa específica ou densidade absoluta ( $\rho$ ), cor. Quanto à caracterização físico-química aplicou-se o método de composição dos alimentos ou esquema de *Weende*, tendo-se procedido à determinação de pH, humidade, cinza e respectivos minerais, proteína e extrato orgânico.

Procedeu-se também à determinação da actividade antioxidante na farinha de dreche, através dos métodos do DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), reagente que atua como radical livre e do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), método baseado na capacidade dos compostos bioativos em reduzir o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (ião férrico complexado com 2,4,6-triaryls-triazine) a  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (ião ferroso complexado com 2,4,6-triaryls-triazine).

Na farinha de dreche após extração, apenas se procedeu à determinação de humidade, cinza e minerais.

### 3.2.1. Massa específica ( $\rho$ ) da farinha de dreche

A massa específica de uma substância é a relação entre a sua massa e o seu volume e expressa-se em  $\text{g}/\text{cm}^3$  (unidades CGS) e de acordo com a fórmula indicada na equação 1.

$$\rho = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Volume (cm}^3\text{)}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Para a determinação da massa específica da farinha de dreche, procedeu-se à tara de uma caixa em forma de paralelepípedo com 9, cm de largura, 10,9 cm de comprimento e 2,8 cm de altura, que se encheu com farinha de dreche, passando-se depois uma régua pela superfície de modo a torná-la numa superfície plana, retirando o excesso de farinha. De seguida, procedeu-se à pesagem, em duplicado (Tabela C, em anexo), do conjunto formado pela caixa e pela farinha de dreche e determinou-se o volume da caixa, de acordo com o esquema da Figura 7.

Com o valor da massa e o volume da caixa, aplicou-se a equação (1) obtendo-se o valor de massa específica da farinha de dreche.



Figura 7 – Esquema para medição do volume ocupado pela farinha de dreche no interior da caixa

### 3.2.2. Cor

Para determinação da cor da farinha de dreche utilizou-se um colorímetro Minolta com sistema de medição de cores CIE  $L^*a^*b^*$ . Este sistema descreve as cores básicas em três eixos:  $L^*$  a variar entre 0 (preto) e 100 (branco) e que corresponde à luminosidade,  $a^*$  a variar entre o verde (-60) e o vermelho (+60) e  $b^*$  a variar entre o amarelo (-60) e o azul (+60) que correspondem à cromaticidade.

### 3.2.3. pH

Para a determinação do pH da farinha de dreche, dissolveram-se 0,250 g de farinha, em 50 ml de água destilada com valor de pH conhecido. Após homogeneização da solução procedeu-se a medição do pH, em triplicado, através de um potenciómetro, com electrodo de membrana de vidro, modelo PHM82, da marca Radiometer.

### 3.2.4. Humidade

A determinação da percentagem de humidade foi efetuada através da técnica gravimétrica ou de medição da perda de massa das amostras, após secagem em estufa à temperatura de aproximadamente 105 °C, até obtenção de peso constante.

Este método poderá ser considerado pouco rigoroso, uma vez que as amostras poderão perder parte da sua massa não só por evaporação da água livre mas também por evaporação de outros constituintes voláteis, introduzindo algum erro nos valores obtidos.

Para tal, em balança de precisão (Kern), tararam-se seis cadinhos após terem sido mantidos à temperatura de 105 °C, durante 30 minutos, em estufa elétrica Binder e arrefecidos em exsiccador. De seguida, na mesma balança, pesaram-se rigorosamente 2 g de amostra para dentro de cada cadinho entretanto tarado e colocaram-se na estufa a 105 °C, durante 4 horas. No final deste tempo, arrefeceram-se em exsiccador e pesaram-se novamente, voltando-se a colocar em estufa à temperatura anterior e por mais 2 horas.

Este procedimento considerou-se terminado quando o peso das amostras foi igual ou superior à primeira pesagem após a secagem e arrefecimento em exsiccador. O cálculo da percentagem de humidade foi efetuado através da equação 2.

$$\% \text{ Humidade} = \frac{\text{massa inicial (g)} - \text{massa final (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100$$

Eq.(2)

### 3.2.5. Cinza e minerais

A percentagem de cinza foi determinada em amostras iguais às utilizadas na determinação da humidade e pela mesma técnica gravimétrica mas por calcinação da amostra até à obtenção do seu resíduo mineral, em mufla a cerca de 500 °C.

Neste sentido, tararam-se, em balança de precisão (Kern), quatro cápsulas de porcelana (2 amostras e respetivos duplicados) após terem permanecido na mufla a 500 °C, durante 1 hora e arrefecidos em exsiccador. Pesaram-se depois, na mesma balança, 2 g de cada amostra para cada cápsula e levaram-se à mufla até se obter um resíduo branco. No final deste processo as cápsulas, depois de arrefecidas em exsiccador, foram novamente pesadas. O cálculo da percentagem de cinza foi efetuado através da equação 3.

$$\% \text{ Cinza} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{massa inicial (g)} - \text{massa final (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \right) \right] \times 100$$

Eq.(3)

Após a determinação da percentagem de cinza, as amostras foram preparadas para quantificação de cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, ferro, zinco, manganês e cobre.

#### Preparação das amostras para determinação de minerais:

Às amostras calcinadas foram adicionados, por três vezes, 10 ml de ácido clorídrico 2 N sendo depois levadas à evaporação total nas duas primeiras adições. A terceira adição apenas evaporou durante 10 minutos, seguindo-se processo de filtração de todas as amostras, para balões volumétricos de 100 ml, perfazendo o volume de cada balão com água destilada.

A determinação dos minerais foi efetuada em por espectrofotometria de absorção atómica de chama.

Nesta técnica, a amostra é atomizada na chama (durante a combustão, os seus átomos são reduzidos ao estado atómico), através da qual é emitido, por uma lâmpada com um cátodo do mesmo elemento que se pretende analisar, um feixe de radiação que passa por um

monocromador atingindo um detetor. Os átomos livres vão absorver a radiação no comprimento de onda característico do elemento em análise e a redução de energia da radiação naquele comprimento de onda quantifica o elemento na amostra.

### 3.2.6. Proteína

A determinação de proteína na farinha de dreche foi efetuada pelo método de Kjeldahl e técnica macro.

Este método consiste na determinação da percentagem de azoto proteico existente no alimento, através de digestão ácida seguida de uma destilação e titulação. Durante a digestão e por ação do ácido sulfúrico, as formas azotadas transformam-se em sulfato de amónia. No processo de destilação com hidróxido de sódio, o sulfato de amónia liberta o amoníaco que se vai fixar num soluto de ácido de título conhecido e através da titulação e na presença de um indicador determina-se a quantidade de amoníaco fixado, determinando-se a quantidade de azoto presente na amostra.

Aos valores obtidos é aplicado o coeficiente geral 6,25 ou o coeficiente já existente para o alimento em causa.

No caso concreto e, dado que para a matriz em estudo, não existe um coeficiente específico, foi utilizado o coeficiente (ou fator) 6,25.

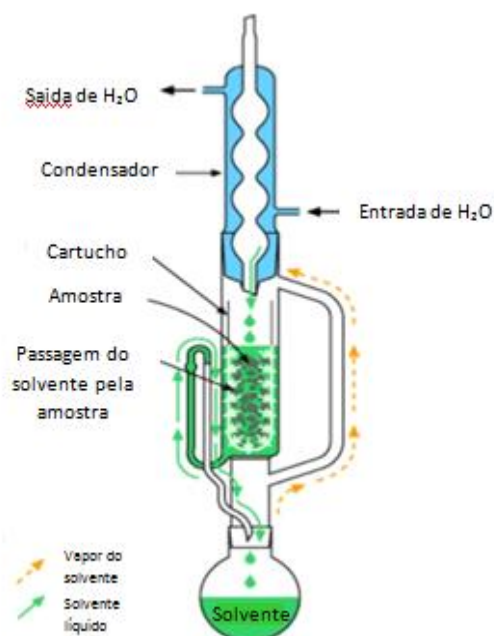
### 3.2.7. Extração orgânica

Para a quantificação do extrato orgânico da farinha de dreche foi utilizado o método de extração com Soxhlet e o clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) como solvente.

O método de extração com Soxhlet consiste, em fazer passar o solvente pela amostra de modo a extrair os compostos solúveis. Esta ação decorre por ciclos consecutivos durante o tempo ou número de ciclos determinados. O ciclo inicia-se no aquecimento do solvente que ao evaporar é conduzido até ao condensador onde volta ao estado líquido, caindo sobre o cartucho que contem a amostra. Ao passar pela amostra arrasta os compostos solúveis que são recolhidos no balão que contem o solvente de acordo com a Figura 8.

O solvente utilizado deve ser adequado ao material que se pretende recolher, tendo-se especial atenção ao seu ponto de ebulição e ao seu carácter volátil. No caso concreto foi

utilizado clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) por ser um dos solventes orgânicos mais utilizados para pesquisa de carotenoides.



Adaptado de: <http://ainstrumental.wikispaces.com/EQUIPO+SOXHLET>

**Figura 8 – Esquema de Extrator Soxhlet**

### Quantificação do extrato orgânico

Procedeu-se à determinação da tara de um balão volumétrico de 250 ml, colocando-o na estufa durante 1 h, a temperatura próxima dos  $100^\circ\text{C}$ . Decorrido o tempo indicado, o balão arrefeceu em exsiccador e foi pesado novamente, obtendo-se assim a sua tara.

Entretanto, pesaram-se 3 g de amostra (farinha de dreche), para um cartucho de Soxhlet que foi colocado no respectivo vaso, adicionou-se um volume aproximado de 125 ml de Clorofórmio (metade do volume do balão) e deu-se início à extração.

No final de 5 horas de ciclos, levou-se a solução a evaporador rotativo, com banho a  $80^\circ\text{C}$  e uma pressão adequada (a pressão foi sendo acertada continuamente de modo a evitar extravase da solução) até a evaporação total, pesando-se de seguida o balão com o extrato obtido. O resultado foi obtido através da equação 4.

$$\% \text{ Extrato orgânico em Base Seca} = \frac{\text{extrato orgânico} \times \text{matéria seca}}{100}$$

Eq.(4)

### 3.3. Processo de Extração Aquosa

A farinha obtida caracteriza-se por ser bastante heterogénea, levando a que seja favorável transformá-la numa matriz de textura mais uniforme de modo a ser utilizada nos ensaios pretendidos. Para isso, procedeu-se a um processo de extração aquosa para obtenção de extrato liofilizado, de acordo com a Figura 9.

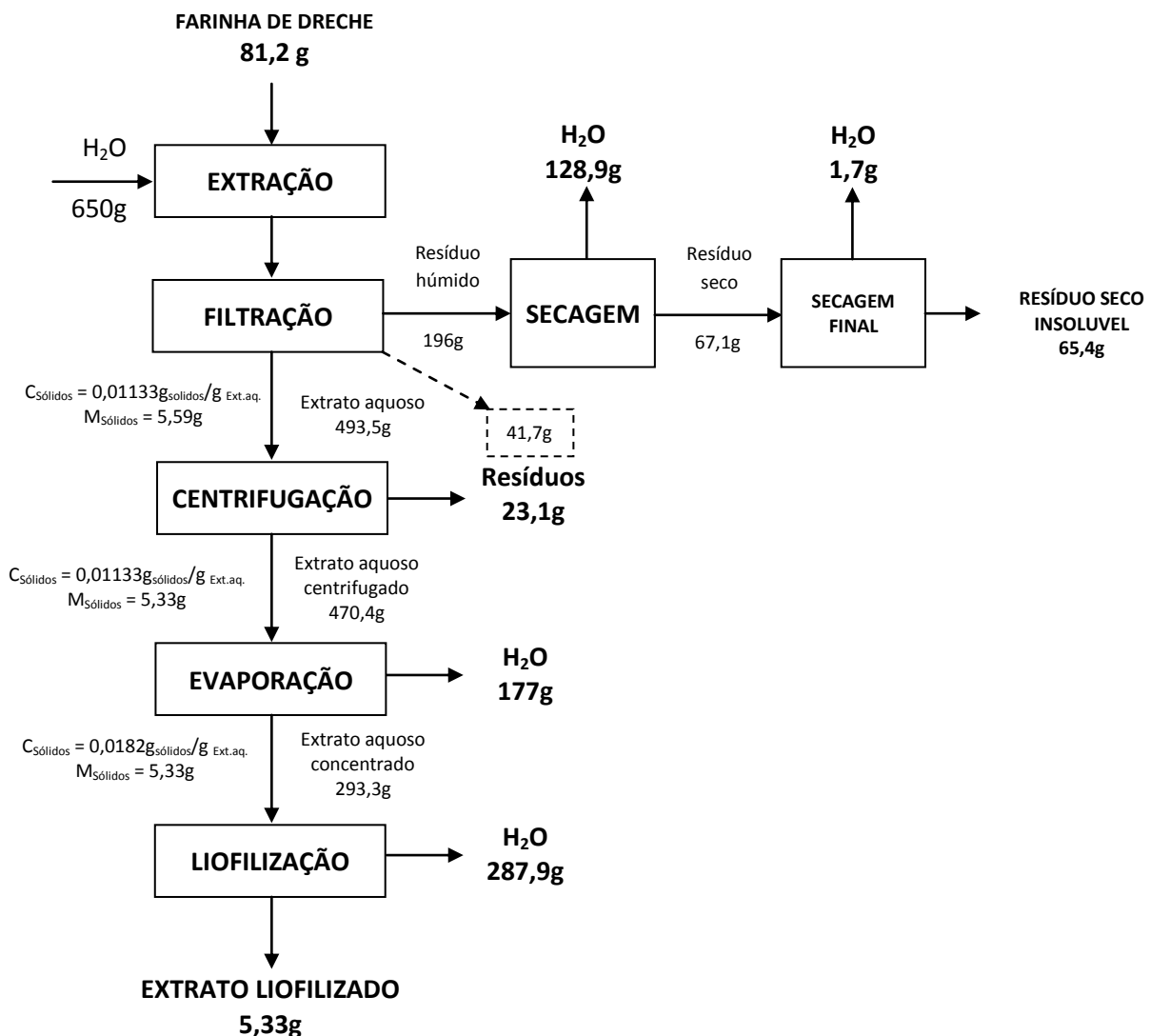


Figura 9 - Fluxograma do processo de extração aquosa com indicação de balanço de massas

O processo de extração aquosa da farinha de dreche iniciou-se com a imersão da farinha em água, numa relação de massa líquida/massa sólida de 8:1, de acordo com o descrito por

Garrote *et al.*, (2008) e Conde, *et al.*, (2009), sujeita a ebulição durante 1 hora à temperatura de 100°C, em sistema *Clevenger*.

De seguida a mistura aquosa foi filtrada (com um pano devido à densidade da solução), obtendo-se um extrato aquoso e uma massa húmida de sólidos insolúveis (extrato sólido húmido). Ambas as frações foram pesadas em balança analítica (Precisa BY1100).

A massa húmida de sólidos insolúveis foi sujeita a secagem (estufa elétrica Binder), como descrito em 3.1 mas com o binómio tempo/temperatura de 24h/60°C. Após esta secagem obteve-se uma massa de sólidos insolúveis – farinha de dreche após extração a qual foi guardada em caixa fechada e protegida da luz para posterior utilização. Nestes sólidos insolúveis foi determinada a humidade, cinza e respectivos minerais.

O extrato aquoso foi centrifugado (centrífuga HERMLE Z 383K), durante 15 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante foi depois concentrado, em evaporador rotativo B.U.CHI, em banho a 40°C e pressão entre de 28 e 40 mbar, durante aproximadamente 2 horas.

Após a evaporação, o condensado foi transferido para cadinhos próprios previamente tarados, foi pesado, congelado e liofilizado (Telstar lyoquest, Telstar Espanha) durante 23 horas. No final obteve-se um extrato liofilizado, altamente higroscópico que foi guardado em exsiccador ao abrigo da humidade e da luz, de modo a minimizar a hidratação e reações de oxidação.

### 3.4. Caracterização química do extrato aquoso

O objetivo da obtenção do extrato liofilizado é tornar a matriz original numa matriz mais adequada aos ensaios laboratoriais pretendidos, permitindo ainda comparar os resultados obtidos nas duas matrizes.

Decorrido o processo de extração, procedeu-se à caracterização química do extrato aquoso. Para tal, o extrato aquoso após concentração, foi dividido em duas partes – uma parte foi utilizada para determinação de polissacáridos totais e a outra parte foi utilizada para obtenção do extrato liofilizado, no qual se determinou o teor de compostos fenólicos totais e a actividade antioxidante (AOA).

## Polissacáridos

Para a quantificação de polissacáridos, aplicou-se a técnica de precipitação por adição de etanol ao extrato aquoso concentrado, na proporção de 4 volumes de etanol para 1 volume de extrato.

Deste modo, recolheram-se 35 ml de extrato aquoso concentrado, para erlenmeyer e adicionaram-se 140 ml de etanol a 96%, homogeneizou-se e deixou-se em repouso durante 12 horas, à temperatura de -20°C, de modo a otimizar o processo de precipitação. Posteriormente a solução foi pesada, para tubos de centrífuga previamente tarados ( $M_1$ ) e, sujeita a centrifugação a 7000 rpm, durante 15 minutos a temperatura de 20°C.

No final da centrifugação retirou-se o sobrenadante e, a massa obtida (gomos) foi sujeita a secagem em estufa elétrica (a mesma das secagens anteriores), à temperatura de 60°C durante 2 horas, procedendo-se de seguida a sua pesagem ( $M_2$ ). O cálculo da massa de polissacáridos foi efetuado, através da equação 5 e o teor de polissacáridos/g de extrato seco pela equação 6.

$$M_{\text{Polissacáridos}} (g) = M_2 (g) - M_1 (g) \quad \text{Eq.(5)}$$

$$\text{Teor de Polissacáridos } (g_{\text{Polissacáridos}} / g_{\text{Extrato}}) = \frac{\text{massa de polissacáridos}}{\text{massa de extrato seco}} \quad \text{Eq.(6)}$$

## Compostos fenólicos

Para a quantificação dos compostos fenólicos existentes no extrato liofilizado foi utilizado o Método Ribéreau-Gayon (1970) também denominado método direto. Este método consiste em adicionar um determinado volume de água destilada a uma quantidade de amostra, formando uma solução que é analisada em espectrofotómetro num comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 280 nm (U.V.). Os resultados obtidos são depois expressos em mg EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de matéria seca, de acordo com a respetiva reta de calibração.

### Determinação da reta de calibração

A partir de uma solução mãe de ácido gálico de 30 mg/L, prepararam-se várias soluções padrão por diluições sucessivas (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/L) correspondentes aos vários pontos da reta (Figura 10).

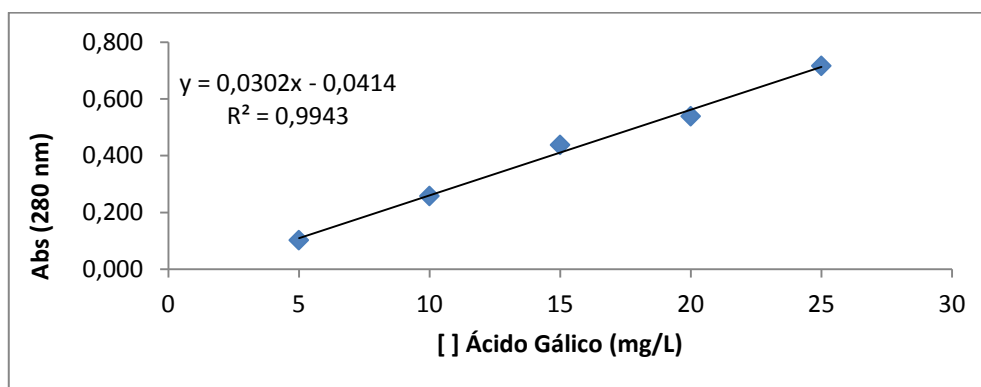


Figura 10 - Reta de calibração do ácido gálico

### 3.5. Atividade antioxidante - AOA

Procedeu-se à avaliação da actividade antioxidante, da farinha de dreche (pelo método de Quencher), e do seu extrato aquoso, através dos métodos do DPPH• e de FRAP. As matrizes foram preparadas de acordo com a Tabela 3.

O método de Quencher (Quick, Easy, New, Cheap and Reproducible) (Pereira, 2010) consiste na reação direta das matrizes sólidas com o radical DPPH ou com o reagente FRAP, sem efetuar um processo de extração intermédio (extração aquosa ou com solventes). Esta estratégia pode ser vantajosa na medida em que parte dos compostos de interesse poderão não ser extraídos na totalidade, tendo como consequência uma sub-avaliação do poder antioxidante do material quando se procede ao estudo dos seus extratos.

**Tabela 3 – Preparação das amostras de acordo com a matriz e o método utilizado**

<b>FARINHA DE DRECHE</b>				
<b>Método DPPH com processo de filtração</b>				
Farinha (mg)	Água (ml)	DPPH (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)
100,3	1,0	4,0	5,0	20,1
200,4	1,0	4,0	5,0	40,1
300,5	1,0	4,0	5,0	60,1
<b>Método FRAP com processo de filtração</b>				
Farinha (mg)	Água (ml)	FRAP (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)
50	1,0	2,7	3,7	13,7
25	1,0	2,7	3,7	6,8
<b>Método FRAP com processo de centrifugação</b>				
Farinha (mg)	Água (ml)	FRAP (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)
50	1,0	2,7	3,7	13,7
25	1,0	2,7	3,7	6,8
<b>EXTRATO LIOFILIZADO</b>				
<b>Método DPPH</b>				
Extrato (mg)	Água (ml)	DPPH (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)
5,0	1,0	4,0	5,0	1,0
10,0	1,0	4,0	5,0	2,0
5,0	2,0	8,0	10,0	0,5
10,0	2,0	8,0	10,0	1,0
<b>Método FRAP</b>				
Extrato liofilizado (mg/ml)	Volume da Amostra (ml)	FRAP (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)
5,0	0,36	2,7	3,06	0,59
2,5	0,36	2,7	3,06	0,29

### 3.5.1. Método DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Este método baseia-se na medição da capacidade dos antioxidantes reduzirem o radical DPPH•, podendo ser medida por ressonância magnética ou através da diminuição dos valores da absorvância que atinge o seu máximo num comprimento de onda de 517 nm. Este método foi referido pela primeira vez por Brand-William *et al.*, em 1995, sendo o seu mecanismo de ação, a transferência de eletrões (SET), tal como o método FRAP embora possa também ocorrer transferência de átomos de hidrogénio (HAT) (Prior *et al.*, 2005).

A estrutura do DPPH está representada Figura 11. É um dos radicais mais estáveis do azoto orgânico e apresenta uma cor púrpura intensa que passa a amarelo quando é reduzido (Prior *et al.*, 2005).

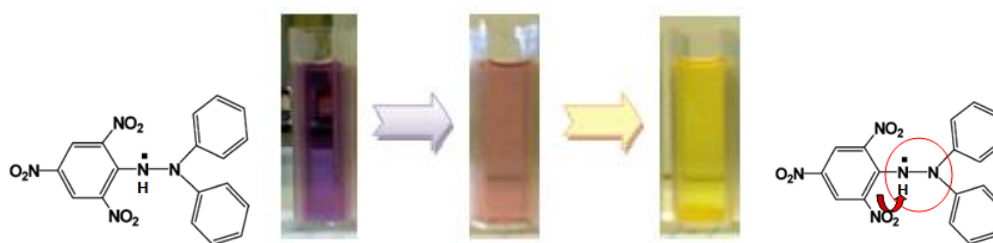


Figura 11 – Variação da cor do DPPH• de acordo com a actividade antioxidante das amostras (adaptado de Prior *et al.*, 2005)

O reagente DPPH foi utilizado em forma de uma solução preparada diariamente a partir de uma solução de stock.

A solução de stock foi preparada, com o mínimo de 2 horas de antecedência ao seu uso, pesando-se 24 mg de reagente para 100 mL de metanol (MeOH) e colocando sob agitação magnética e ao abrigo da luz. A solução diária foi preparada a partir da solução de stock por diluição com metanol (1:4). Após a preparação, procedeu-se à leitura da absorvância da solução, a um comprimento de onda de 517 nm, em espectrofotómetro UV4, Unicam (Abs DPPH). A absorvância da solução diária nunca excedeu o valor de 1,1.

A reação dos compostos da amostra com o radical DPPH foi medida por leitura da absorvância (517 nm) ao fim de 40 minutos de incubação em ambiente escuro (Abs matriz), após a adição de 4 ml de solução diária de DPPH a 1 ml de amostra (solução aquosa de extrato ou de farinha de dreche).

A forma de cálculo para obtenção dos RSA (radical scavenging activity) em %, foi a seguinte:

$$RSA_{DPPH} (\%) = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{Matriz}}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad Eq.(7)$$

#### Preparação das amostras de farinha

Para o método do radical DPPH, pesaram-se determinadas quantidades de farinha, adicionando-se de seguida 1 ml de água destilada a cada uma, obtendo-se soluções com diferentes concentrações (Tabela 3). A cada solução adicionaram-se depois 4 ml de reagente DPPH, obtendo-se misturas reacionais com um volume total de 5 ml e diferentes concentrações. Após o tempo de reação (40 minutos em ambiente escuro) e, antes da medição da absorvância a 517 nm, as misturas foram sujeitas a filtração de modo a retirar as partículas em suspensão.

#### Preparação das amostras de extrato liofilizado

Relativamente ao método DPPH, as amostras do extrato liofilizado prepararam-se da mesma forma que as amostras de farinha contudo, variou-se o volume de água destilada e de reagente DPPH, de modo a fazer variar a concentração da mistura reacional (Tabela 3). Assim, das soluções preparadas com 1 ml e 4 ml de reagente DPPH, obtiveram-se misturas reacionais com um volume total de 5 ml e concentrações de extracto de 1,0 mg/ml e 2,0 mg/ml. Nas soluções preparadas com 2 ml de água destilada e 8 ml de reagente DPPH, obtiveram-se misturas reacionais com um volume total de 10ml e concentrações de extracto 0,5 mg/ml e 1,0 mg/ml. Decorrido o tempo de reação (40 minutos em ambiente escuro), procedeu-se à medição da absorvância a 517 nm.

#### Determinação da Reta de Calibração

Preparou-se uma solução-mãe de Trolox com a concentração de 800 µM. A partir desta solução-mãe (800 µM), prepararam-se diluições de 10 µM, 20 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM e 600 µM.

Posteriormente, de cada diluição e em triplicado, foram retirados 150 µl de solução aos quais se juntou 850 µl de água destilada de modo a perfazer 1 ml de padrão Trolox. Cada padrão

obtido foi colocado a reagir com 4 ml de solução diária de DPPH, durante 40 minutos, em ambiente escuro. Após esse tempo procedeu-se à medição da respectiva absorvância no espectrofotómetro UV4 UNICAM, num comprimento de onda de 517 nm (Figura 12).

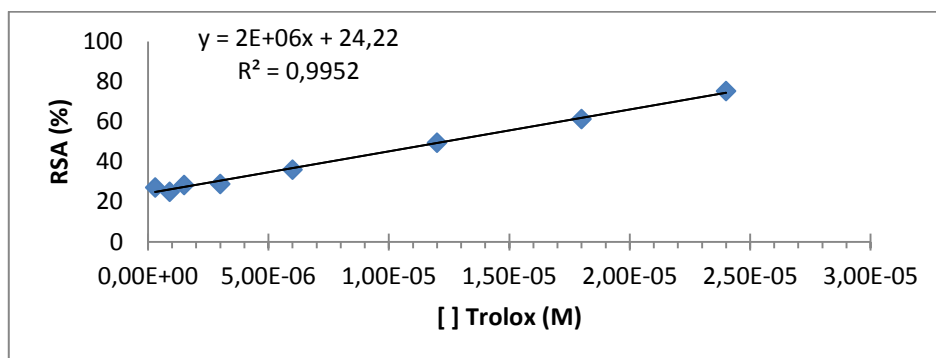


Figura 12 - Reta de calibração do DPPH

### 3.5.2. Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Este método consiste na avaliação do poder antioxidante dos compostos existentes na matriz estudada, capazes de reduzir o complexo  $Fe^{3+}$ -TPTZ (ferritripiridiltriazina) a  $Fe^{2+}$ -TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina). O complexo ferroso-tripiridiltriazina tem uma cor azul intensa cuja máxima absorção ocorre num comprimento de onda próximo de 595 nm. A atividade antioxidante, dos compostos em estudo, é medida pelos valores de absorvância obtidos, quando sujeitos à ação do reagente FRAP.

O aumento dos valores de absorvancia das soluções é diretamente proporcional ao aumento da actividade antioxidante dos compostos da matriz ou seja, quanto maior o valor de absorvancia, mais azul será a solução (Figura 13) e maior será a actividade antioxidante dos compostos.

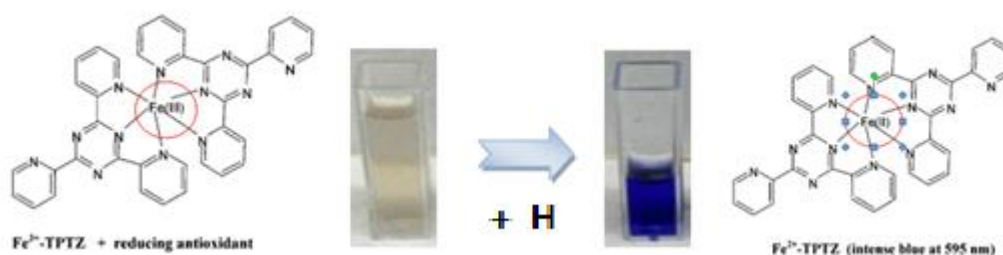


Figura 13 – Variação da cor do FRAP de acordo com a actividade antioxidante das amostras (adaptado de Prior et al., 2005)

Contudo, este método apresenta algumas limitações uma vez que, nem todos os redutores capazes de reduzir o  $F^{3+}$ -TPTZ (ferritripiridiltriazina) a  $Fe^{2+}$ -TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina) são antioxidantes assim como, nem todos os antioxidantes têm capacidade para reduzir estes complexos (Vasconcelos *et al*, 2007).

A solução do reagente FRAP foi preparada imediatamente antes da sua utilização, a partir da mistura de 25 mL de solução tampão acetato 0,3 M com 2,5 mL de solução de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM, e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, de acordo com o procedimento descrito no Comunicado Técnico on-line 125 (2006).

À farinha de dreche ou ao extrato liofilizado foi adicionado um volume de 2,7 ml de solução reagente FRAP. A reacção decorreu durante 30 minutos, em banho de água a 37°C e em ambiente escuro. Após esse tempo procedeu-se à medição da respectiva absorvância no espectrofotómetro UV4 UNICAM, num comprimento de onda de 595 nm.

A forma de cálculo para obtenção do RSA (radical scavenging activity) foi a seguinte:

$$RSA_{FRAP} = \frac{Abs_{Matriz} - Abs_{FRAP}}{Abs_{FRAP}} \quad Eq.(8)$$

#### Preparação das amostras de farinha

Para o método da avaliação do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), pesaram-se determinadas quantidades de farinha, adicionando-se de seguida 1 ml de água destilada a cada uma, obtendo-se soluções com diferentes concentrações (Tabela 3). A cada solução adicionaram-se depois 2,7 ml de reagente FRAP, obtendo-se misturas reacionais com um volume total de 3,7 ml e diferentes concentrações. Após o tempo de reacção (30 minutos em ambiente escuro e banho a 37°C) e, antes da medição da absorvância a 595 nm, as misturas foram sujeitas a filtração/centrifugação de modo a retirar as partículas em suspensão.

#### Preparação das amostras de extrato liofilizado

Relativamente ao extrato liofilizado as amostras prepararam-se, diluindo 50 mg de extrato em 10 ml de água destilada, obtendo-se uma solução com uma concentração de 5 mg/ml. Desta solução procedeu-se depois a uma diluição de 1:2, obtendo assim uma solução com a concentração de 2,5 mg/ml. De cada solução, retiraram-se 0,36 ml aos quais de adicionaram 2,7 ml de reagente FRAP, perfazendo um volume de 3,06 ml. As misturas reacionais ficaram

com concentrações de 0,6 mg/ml e 0,3 mg/ml. Decorrido o tempo de reação (30 minutos em ambiente escuro e banho a 37°C), procedeu-se à medição da absorvância a 595 nm.

#### Determinação da Reta de Calibração

A reta de calibração (Figura 14) foi determinada da mesma forma que a reta de calibração do DPPH com alteração nos volumes das soluções referentes aos pontos da reta. Assim, de cada diluição da solução de Trolox e em triplicado, foram retirados 70 µl de solução aos quais se juntou 200 µl de água destilada de modo a perfazer 0,270 ml de padrão de Trolox. Cada padrão obtido foi colocado a reagir com 2,7 ml de solução reagente FRAP, durante 30 minutos, em banho de água a 37°C e em ambiente escuro. De seguida procedeu-se à medição da respectiva absorvância no espectrofotómetro UV4 UNICAM, num comprimento de onda de 595 nm.

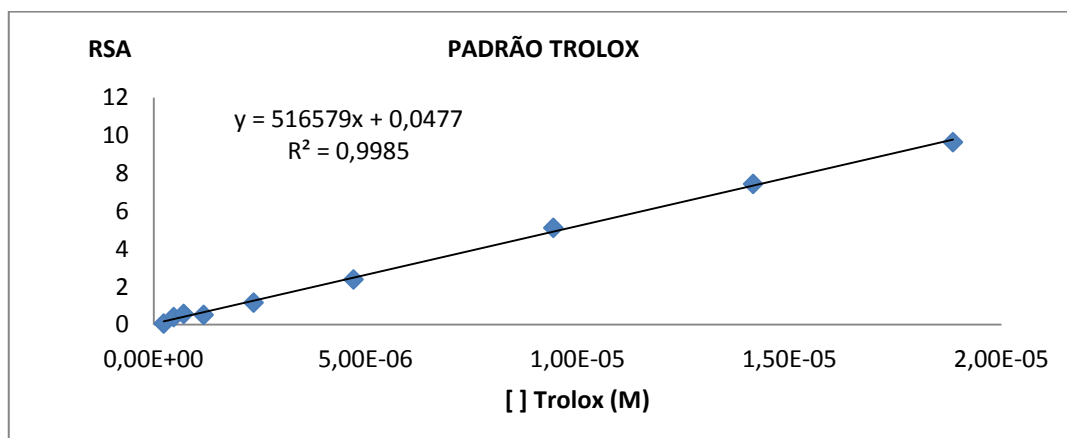


Figura 14 - Reta de calibração do FRAP

## 4.1. Caracterização da farinha de dreche

Os resultados obtidos nas determinações efetuadas na farinha de dreche encontram-se sintetizados na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização da farinha de dreche

FARINHA DE DRECHE	
Parâmetros físicos	
Cor (CIE Lab)	Castanho dourado
L - Luminosidade	63,83 ±0,30
a* - vermelho-verde	2,97 ±0,06
b* - amarelo-azul	19,29 ±0,40
Massa específica ( $\rho$ )	0,56 ±0,01 g/cm <sup>3</sup>
Parâmetros químicos	
pH	5,30 ±0,02
Humidade*	6,20 ±0,08
Cinza*	3,00 ±0,01
Proteína (Base seca)*	23,10 ±1,09
Extrato orgânico (Base seca)*	16,50 ±2,94
Resíduo Sólido insolúvel (Base seca)*	85,87

\*g/100g de Farinha

Da conjugação dos valores obtidos de luminosidade (L) e de cromaticidade (a\* e b\*), verifica-se que a cor da farinha de dreche se aproxima do castanho dourado e a sua massa específica é de cerca de 0,56 g/cm<sup>3</sup>.

A farinha de dreche em estudo, apresenta um pH de 5,3, um valor um pouco mais baixo que a maioria das farinhas tradicionais que tem valor de pH próximo de 6. Esta diferença poderá ser justificada por se tratar de um sub-produto, isto é, a farinha de dreche é um produto que já sofreu alguma degradação.

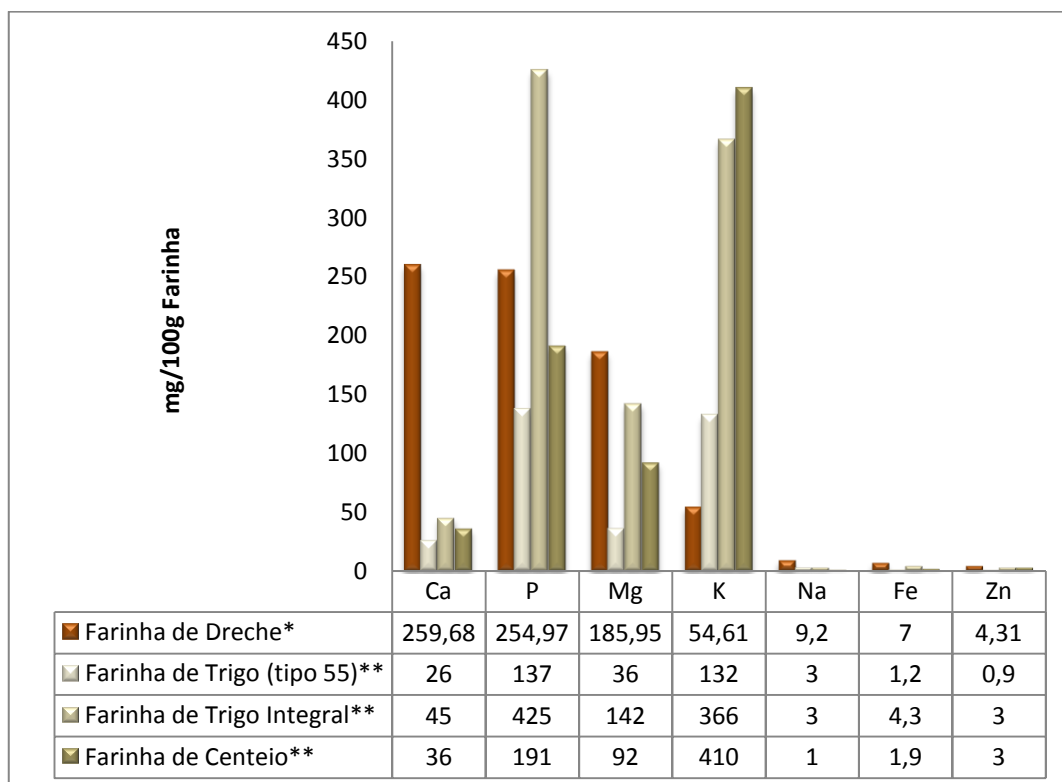
Após a determinação do valor da cinza, procedeu-se à identificação e quantificação de alguns elementos químicos (Tabela F, em anexo).

Comparativamente com outras farinhas panificáveis (Figura 15), na farinha de dreche, o teor de cálcio é significativamente mais elevado que o valor médio das três farinhas indicadas.

O teor de magnésio é superior ao verificado na farinha de trigo integral e na farinha de centeio.

O teor de sódio, de ferro e de zinco são também mais elevados na farinha de dreche. Relativamente ao teor de fósforo, apenas a farinha de trigo integral apresenta valores superiores.

Quanto ao teor de potássio na farinha de dreche, é cerca de 7 vezes menor que a média dos valores registados na farinha de centeio e trigo integral.



\*mg/100g de Farinha; \*\* mg/100g da parte edível – Tabela da Composição dos Alimentos – INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge)

**Figura 15 – Comparação do teor em minerais na farinha de dreche com outras farinhas panificáveis**

Na Figura 16 é visível que do total da fração mineral da farinha de dreche, aproximadamente 66% é formada por cálcio e fósforo, elementos importantes na formação e manutenção da massa óssea (fosfato de cálcio) e noutras funções biológicas (fosfolípidos, trifosfato de adenosina e fosfato de creatina) e 24% por magnésio (nutriente importante na transmissão dos impulsos nervosos e no relaxamento muscular).

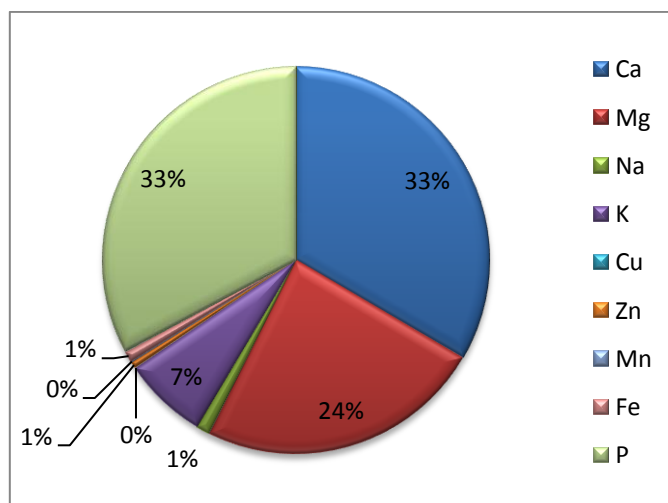


Figura 16 – Percentagem de cada elemento no total de cinza

#### 4.2. Rendimento da Extração Orgânica

O extrato orgânico obtido da farinha de dreche foi de 16,5 g por 100 g de farinha (Tabela G, em anexo), e tem por objetivo futuro identificar compostos com poder antioxidante, nomeadamente alguns carotenoides como a luteína e a zeaxantina.

#### 4.3. Processo de extração aquosa

Após alguns ensaios preliminares do processo de extração, optou-se por adicionar 650 g de água a 81,2 g de farinha de dreche, obtendo-se uma suspensão com cerca de 731,2 g.

Decorrido o tempo de extração, a suspensão foi filtrada, obtendo-se uma fração sólida húmida com cerca de 196 g e uma fração líquida com cerca de 493,5 g tendo-se perdido cerca de 41,7 g da suspensão inicial. Esta fração líquida denominada extrato aquoso, foi depois sujeito a centrifugação, tendo-se obtido cerca de 470,4 g. Na centrifugação perdeu-se cerca de 23,1 g.

Após a centrifugação, levou-se o extrato aquoso ao evaporador rotativo tendo-se obtido um extrato aquoso concentrado com cerca de 293,3 g dos quais se obteve cerca de 5,33 g de extrato seco liofilizado, sendo o rendimento do processo de liofilização de cerca de 0,015 g de extrato seco/ml de extrato aquoso.

No total dos 76,16g de farinha de dreche (base seca) obtiveram-se cerca de 5,33g de extrato liofilizado, dando um rendimento de extração de 6,99% ou seja, aproximadamente 7g de extrato liofilizado por 100g de farinha.

#### 4.4. Caracterização do extrato aquoso e da fração insolúvel

##### 4.4.1. Extracto aquoso

O extrato aquoso (liofilizado) foi caracterizado em termos de teor de polissacáridos e teor de compostos fenólicos totais (Tabelas H e I, em Anexo).

A determinação do teor de polissacáridos no extrato aquoso da farinha de dreche foi efetuada por processo de precipitação com etanol no extrato aquoso concentrado.

O rendimento da massa de polissacáridos por massa de extrato liofilizado foi de cerca de 28,1%. Os polissacáridos contêm essencialmente unidades de xilose, arabinose, manose e galactose (Kabel *et al.*, 2002; Parajó *et al.*, 2009).

Relativamente à massa de polissacáridos solúveis por massa de farinha (Tabela 5) o valor obtido foi de 1,968g de polissacáridos por 100g de farinha, dando um rendimento de extração de aproximadamente 2%.

**Tabela 5 - Teor de Polissacáridos do extrato aquoso**

Extrato aquoso concentrado (ml)	[ ] ext. aq. conc. (g de extrato seco/g de extrato aquoso)	Massa de extrato seco (g)	Massa de polissacaridos (g)	g Polissacáridos /g Extrato seco	g Polissacáridos /100g Farinha
35,0	0,02	0,63	0,18	0,28	1,97

O teor em compostos fenólicos do extrato liofilizado (Figura 17) foi determinado por dissolução do extrato em água destilada com diferentes concentrações: 1,0g/L, 1,4g/L e 2,0g/L. Os resultados estão apresentados na Figura 17 e na Tabela I, em anexo.

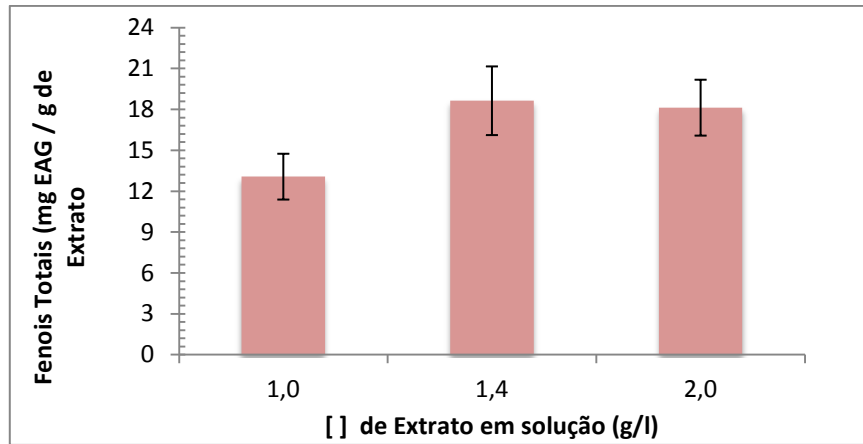


Figura 17 – Determinação do teor de compostos fenólicos pelo Método Ribéreau-Gayon, ( $\lambda$  280nm U.V.), no extrato liofilizado da farinha de dreche

O extrato liofilizado apresentou um teor de fenólicos totais entre 13,06 mg EAG/g de Extrato e 18,63 mg EAG/g de Extrato. Estes valores, quando comparados com os valores obtidos de extrato de carqueja (Pimenta, 2012) que variaram entre 245 e 400 mg EAG/g de matéria seca, mostram que a farinha de dreche apresenta uma composição em fenólicos totais, bastante menor. Grande parte dos compostos fenólicos presentes na matéria-prima inicial será extraída durante o processo de produção da cerveja.

#### 4.4.2. Caracterização do resíduo sólido insolúvel

O resíduo sólido insolúvel foi caracterizado em termos de percentagem de humidade e de cinza, (Tabelas D e E, em anexo) e, quantificaram-se os mesmos minerais identificados na farinha de dreche (Tabela F, em anexo).

A percentagem de resíduo sólido insolúvel (base seca), encontrada na farinha de dreche foi cerca de 85,9%. A dreche cervejeira é composta, essencialmente por material lenhinocelulósico, praticamente insolúvel em água, o que justifica um valor tão elevado para o resíduo sólido obtido do processo de extração aquosa da farinha de dreche.

Na Figura 18, estão representados os valores comparativos, relativos à quantificação dos minerais identificados, tanto na farinha de dreche como no resíduo sólido insolúvel.

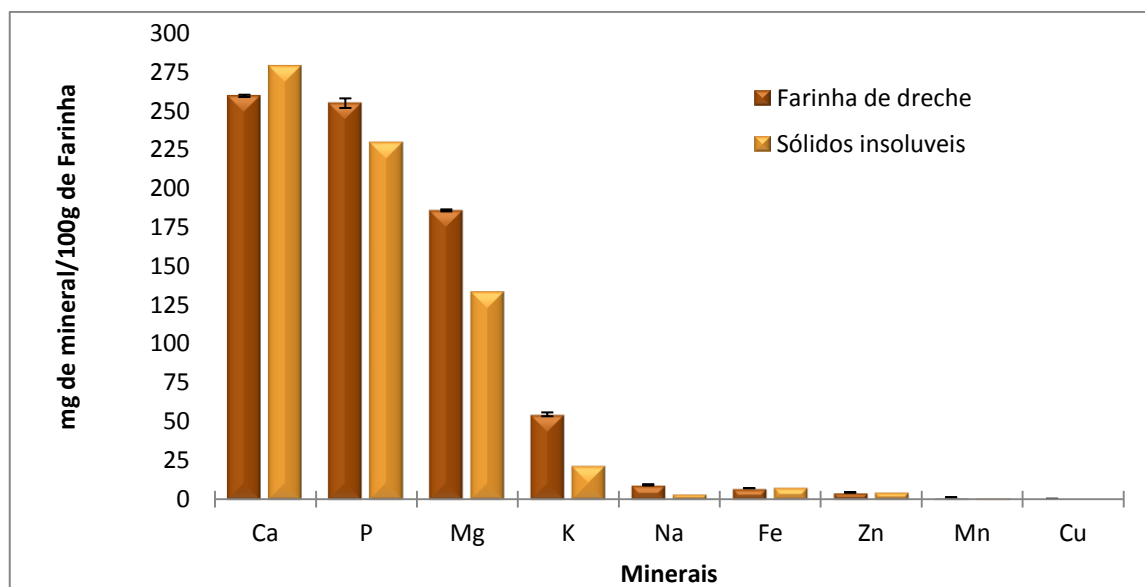


Figura 18 – Comparação dos teores de minerais na farinha de dreche e nos sólidos insolúveis

Observa-se que houve um decréscimo dos teores de fósforo e de magnésio na fração insolúvel relativamente à farinha de dreche, de cerca de 9% e 28%, respetivamente. Adicionalmente, durante o processo de extração também ocorreu uma extração significativa de potássio e de sódio, apresentando ambos uma diminuição de cerca de 60% da sua quantidade nos sólidos insolúveis em relação à farinha de dreche. Os restantes minerais apresentam uma diferença bastante inferior.

#### 4.5 Avaliação da atividade antioxidante da farinha de dreche e do seu extrato liofilizado

A atividade antioxidante dos compostos bioativos existentes na Farinha de Dreche foi, avaliada pelo método do radical DPPH e pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) ou método do poder redutor do ião férrico ( $F^{3+}$ ) a ião ferroso ( $F^{2+}$ ), conforme descrito em 0, com reação direta com farinha ou com soluções do seu extrato aquoso liofilizado. Os resultados obtidos estão separados por tipo de amostra avaliada e por método utilizado e são expressos em TEAC

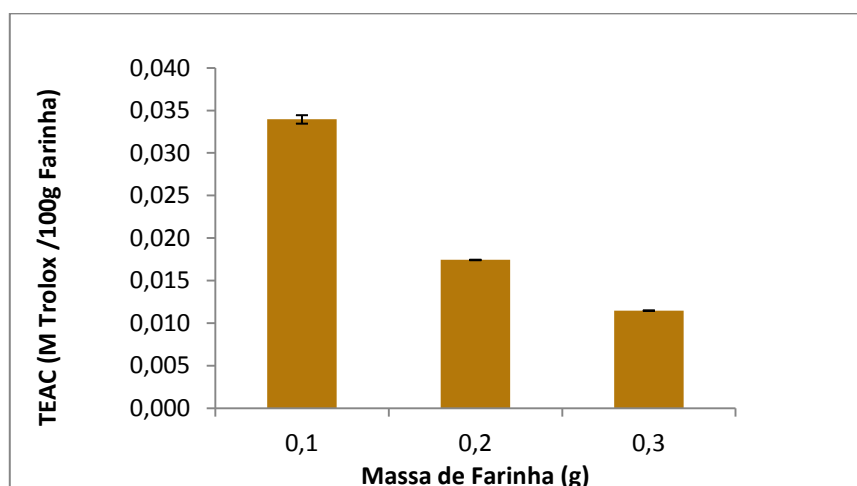
##### 4.5.1 Farinha de Dreche

Relativamente à farinha de dreche, a actividade antioxidante foi determinada fazendo reagir diferentes quantidades de farinha diretamente com o radical DPPH ou com reagente FRAP. Estudou-se o efeito da massa de farinha de dreche e usada no valor final da AOA. Quando se

usou o reagente FRAP, avaliou-se ainda o método de remoção dos sólidos em suspensão (filtração ou centrifugação) antes da medição da absorvância.

### **Método DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)**

Os valores de AOA obtidos nas amostras de farinha de 100, 200 e 300 mg de matéria seca, diluídas diretamente em 5 ml de reagente DPPH e, sujeitas a filtração após reação para remoção dos sólidos antes da medição da absorvância do sobrenadante, estão representados na Figura 19 e na Tabela J, em anexo. Verifica-se que à medida que a massa da amostra na mistura reacional aumenta, ocorre um decréscimo do valor da atividade antioxidante, de 0,034 para 0,011 TEAC (M Trolox/100g Farinha), para valores de massa a variar de 100 para 300 mg de farinha, respectivamente, i.e., uma variação de 67,7%.



**Figura 19 – Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH• em farinha filtrada – efeito da concentração de farinha**

Ocorreu um comportamento idêntico com outras matrizes sólidas, nomeadamente orégãos, repiso de tomate e bagaço de azeitona. A AOA dos orégãos decresceu de 4,08 TEAC (M Trolox/100g de m.s.) para 0,7 TEAC (M Trolox/100g de m.s.) para valores de massa de amostra a variar de 0,25 para 2,5 mg de m.s.. A AOA do bagaço de azeitona, decresceu de 0,066 TEAC (M Trolox/100g de m.s.) para 0,030 TEAC (M Trolox/100g de m.s.) para valores de massa de amostra a variar de 5,5 para 40 mg de m.s.; e a AOA do repiso de tomate, decresceu de 0,083 TEAC (M Trolox/100g de m.s.) para 0,044 TEAC (M Trolox/100g de m.s.) para valores de massa de amostra a variar de 5,5 para 40 mg de m.s. (Pereira, 2010). Este comportamento pode ser devido a limitações difusionais, cujos efeitos se tornam mais significativos à medida que a massa de sólido na mistura reacional aumenta.

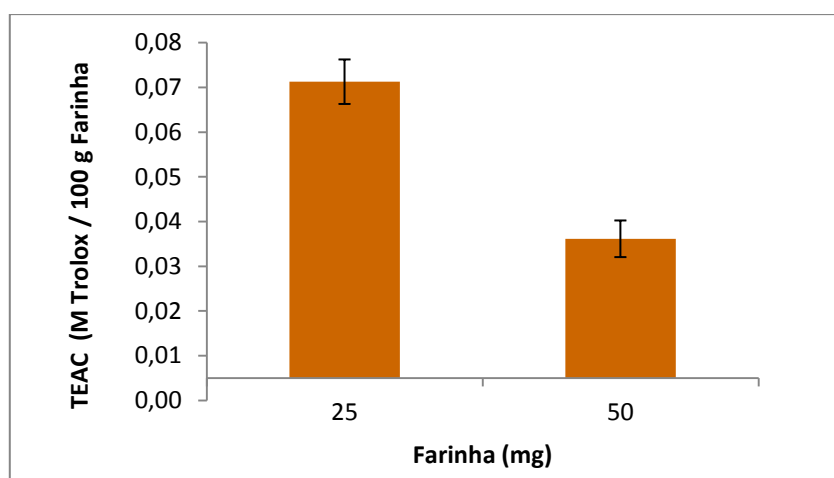
Os valores de AOA registados na farinha de dreche quando comparados com valores de AOA obtidos para repiso de tomate e oregãos, mostram que a farinha de dreche tem uma atividade antioxidante mais baixa (Tabela 6). Este facto poderá estar relacionado com o menor teor de compostos fenólicos e de carotenóides presentes na farinha de dreche, em comparação com oregãos e repiso de tomate, respectivamente.

**Tabela 6 – Comparação de valores de TEAC obtidos em farinha de dreche, repiso de tomate e oregãos**

Matriz	Massa (mg)	TEAC (M Trolox/100g de m.s.) (método DPPH)
Farinha de dreche	100	0,034
Repiso de tomate	40	0,044
Orégãos	2,5	0,7

### **Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) Poder Antioxidante de Redução do Ferro**

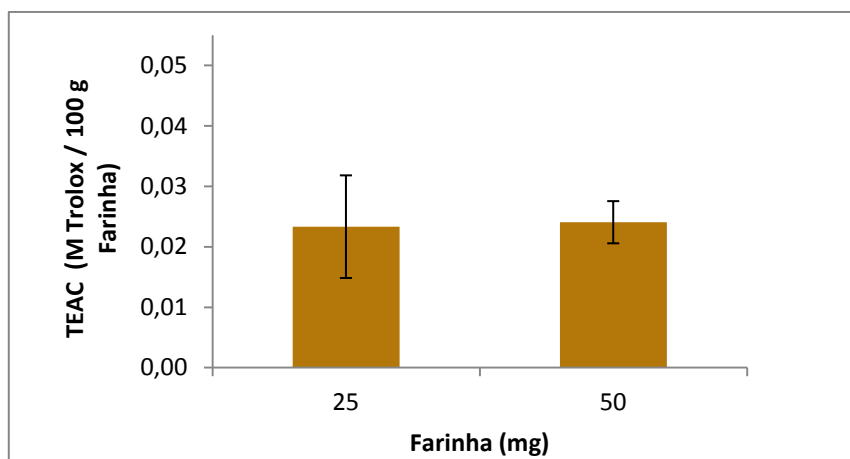
Os valores de AOA obtidos das amostras de farinha de dreche com 25 e 50 mg de matéria seca, diluídas em 1 ml de água destilada e 2,7 ml de reagente FRAP e centrifugadas após reação para a remoção dos sólidos antes da medição da absorvância do sobrenadante, estão representados na Figura 20 e na Tabela K, em anexo. Verifica-se que, para uma massa de 25 mg de m.s., o valor de AOA é de 0,066 ( $\pm 0,005$ ) TEAC (M Trolox/100 g de Farinha). Quando se aumenta a massa de farinha utilizada para 50 mg, os valores de AOA decrescem para 0,031 ( $\pm 0,004$ ) TEAC (M Trolox/100 g de Farinha). Parece ocorrer a mesma limitação difusional que ocorre com o método do radical DPPH.



**Figura 20 - Avaliação da Atividade Antioxidante da farinha de dreche pelo método FRAP – efeito da concentração de farinha. Mistura reacional clarificada por centrifugação**

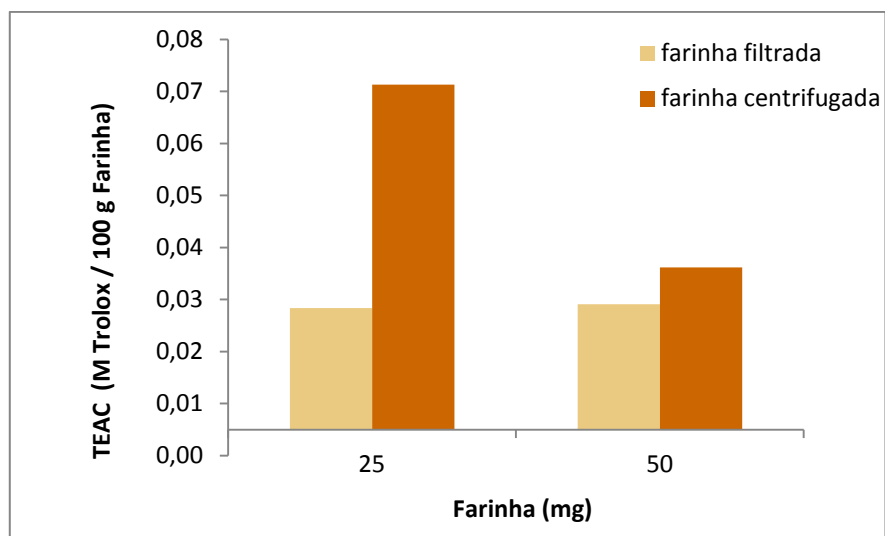
Efetuuou-se o mesmo procedimento para a determinação da AOA com o reagente FRAP, mas usando o processo de filtração para a remoção dos sólidos após reação, antes da medição da absorvância do sobrenadante.

Na Figura 21 e na Tabela K, em anexo, estão apresentados os valores obtidos para amostras preparadas com 25 e 50 mg de m.s. Neste caso não se verifica uma variação significativa do valor do TEAC, ao contrário do que foi observado quando se usou o processo de centrifugação.



**Figura 21 – Avaliação da Atividade Antioxidante da farinha de dreche pelo método FRAP – efeito da concentração de farinha. Mistura reacional clarificada por filtração**

Além disso, quando comparados os valores de AOA, obtidos usando os processos de centrifugação e de filtração (Figura 22), verifica-se que com a filtração, se obtiveram valores inferiores de TEAC. Este facto parece indicar que a aplicação de pressão no processo de filtração provoca um maior contacto entre o sólido e o líquido, podendo promover a ocorrência de reações secundárias, com um efeito direto na absorvância do filtrado, a partir da qual se calcula a AOA. Nesta situação, a variação do valor da absorvância da mistura reacional poderá não ser exclusivamente devido à reação de redução do íão ferro com os antioxidantes, prevista na metodologia.



**Figura 22 – Avaliação da Atividade Antioxidante da farinha de dreche pelo método FRAP – efeito do processo. Mistura reacional clarificada por centrifugação e por filtração**

Na aplicação do método de Quencher à farinha de dreche, verificou-se a necessidade de recorrer ao processamento das amostras, por centrifugação ou por filtração, antes da medição da absorvância do sobrenadante. Esta necessidade ficou a dever-se à turbidez verificada nas amostras o que, poderá ser explicado pela percentagem de sólidos insolúveis existentes na farinha de dreche (cerca de 82%). Este processamento final pode induzir reações secundárias que podem levar a uma sub ou sobreavaliação da actividade antioxidante.

#### 4.5.2 Extrato liofilizado da farinha de dreche

No extrato liofilizado da farinha de dreche, as amostras também foram preparadas a partir de diferentes massas de matéria seca (m.s.) em diferentes diluições (Tabela 3), tendo-se efetuado a avaliação da atividade antioxidante através de aplicação direta do método do radical DPPH e do método do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP).

##### **Método DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)**

Na Figura 23, estão representados os valores obtidos das amostras preparadas com 5 e 10 mg de extrato diluídos em 1 ml de água destilada e 4 ml de reagente DPPH (5 ml de mistura reacional); e das amostras preparadas com 5 e 10 mg de extrato diluídos em 2 ml de água destilada e 8 ml de reagente DPPH (10 ml de mistura reacional).

Verifica-se que, para a mesma massa de extrato na mistura reacional (5 ou 10 mg), a AOA aumenta quando se aumenta o volume da mistura reacional de 5 para 10 ml: para 5 mg de massa de extrato, a AOA aumenta de 0,084 TEAC (M Trolox/100 g de Extrato) para 0,269 TEAC (M Trolox/100 g de Extrato); quando se usa 10 mg de massa de extrato, a AOA aumenta de 0,044 TEAC (M Trolox/100 g de Extrato) para 0,192 TEAC (M Trolox/100 g de Extrato), conforme Tabela L em anexo. Este facto pode ser devido a uma maior solubilização do extrato, que aumenta a disponibilidade dos compostos ativos para a reação com o radical.

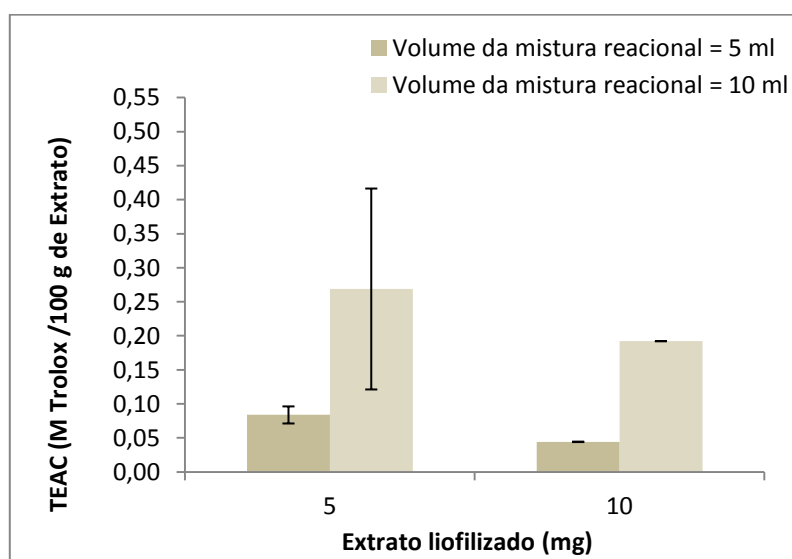
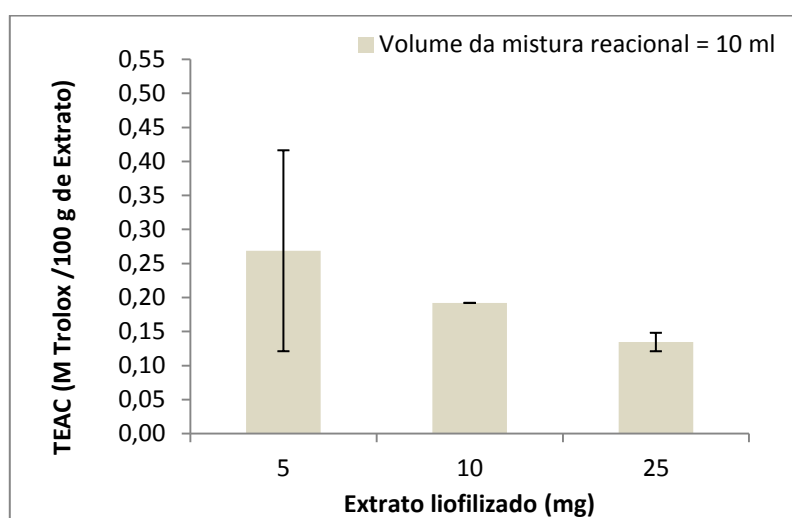


Figura 23 – Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método do DPPH• em Extrato Liofilizado

Relativamente ao efeito de diferentes massas de extrato diluídas no mesmo volume de mistura reacional (Figura 24), parece ocorrer o mesmo comportamento que ocorreu nas amostras de farinha de dreche, i.e., ocorreu um decréscimo dos valores da AOA à medida que a massa de extrato aumentou.

A AOA decresceu de 0,269 TEAC (M Trolox/100g de Extrato) para 0,135 TEAC (M Trolox/100g de Extrato) para valores de massa de extrato a variar de 5mg para 25 mg, respectivamente, correspondendo a uma variação de aproximadamente 50% (Tabela L, em anexo).



**Figura 24 – Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método do DPPH• em Extrato Liofilizado – efeito da concentração de extrato na mistura reacional**

Comparando os valores de AOA obtidos no extrato liofilizado da farinha de dreche com os valores AOA obtidos no extrato liofilizado de carqueja (Tabela 7), observa-se que actividade antioxidante deste último é bastante superior, muito devido ao facto da carqueja ser uma matriz não processada antes da obtenção do extrato aquoso, e de apresentar à partida um maior teor de compostos fenólicos.

De qualquer modo, dos dados obtidos, parece ser possível afirmar que a farinha de dreche, apesar de ser um sub-produto, ainda apresenta alguma actividade antioxidante.

**Tabela 7 – Comparação de valores de TEAC obtidos em extrato de farinha de dreche e extrato de carqueja**

Matriz	[ ] Amostra (mg/ml)	TEAC (M Trolox/100g de m.s.) (método DPPH)
Extrato liofilizado de Farinha de dreche	1,0	0,084
Extrato liofilizado de caules de Carqueja	0,04	0,900

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados de TEAC obtidos com a reação direta com a farinha de dreche (método de Quencher), em comparação com os valores de TEAC obtidos usando o extrato aquoso, tendo em conta que por cada 100mg de farinha se obteve cerca de 7mg de extrato liofilizado. Verifica-se que fazendo reagir diretamente o radical DPPH com a farinha de dreche origina um valor de TEAC inferior.

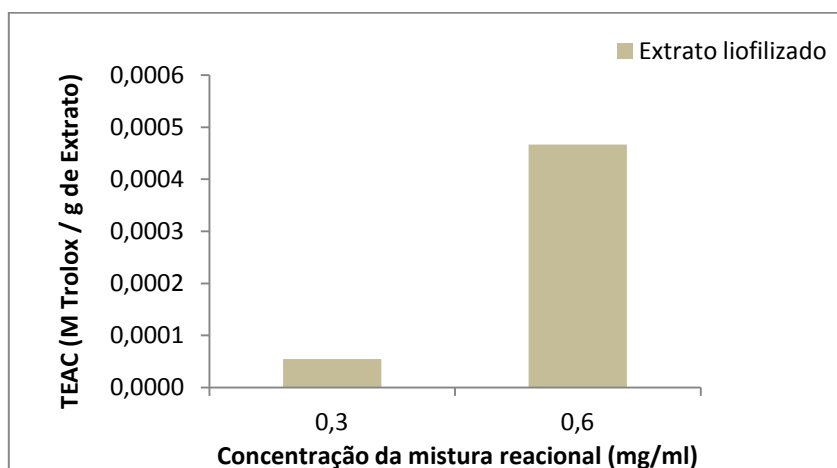
**Tabela 8 – Avaliação da actividade antioxidante nas diferentes matrizes pelo método Quencher**

Matriz	Massa (mg)	TEAC (M Trolox/100g de m.s.) (método DPPH)
Farinha de dreche	100	0,0342
Extrato liofilizado de farinha de dreche	7	Entre 0,0443 e 0,0838

**Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) Poder Antioxidante de Redução do Ferro**

Para este método as amostras do extrato liofilizado foram preparadas a partir de uma solução inicial de 50 mg de extrato liofilizado diluídos em 10 ml de água destilada, procedendo-se depois a uma diluição de 1:2, obtendo-se amostras com concentrações de 5 mg/ml e 2,5 mg/ml.

Para a avaliação da atividade antioxidante, retirou-se um volume de 360 µl de cada uma das soluções (inicial e diluição) aos quais se adicionou 2,7 ml de reagente FRAP. Os valores de AOA obtidos foram em média 0,0005 TEAC (M Trolox / g de Extrato) na mistura reacional com concentração média de extrato 0,6mg/ml e de 0,0001 TEAC (M Trolox / g de Extrato) na mistura reacional com concentração média de extrato de 0,3 mg/ml (Figura 25).



**Figura 25 – Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método FRAP no extrato liofilizado**

## 5. CONCLUSÕES

---

O objetivo deste trabalho tinha como enfoque principal a caracterização química da farinha de dreche e a avaliação da actividade antioxidante dos seus compostos, através de dois métodos diferentes e, sem recorrer a processos de extração com solventes químicos.

Dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- A farinha de dreche é composta essencialmente por material insolúvel, cerca de 82g por cada 100g de farinha;
- O teor em minerais da farinha de dreche é elevado, consistindo essencialmente em cálcio, magnésio e fosforo
- O rendimento da extração aquosa em termos de extrato liofilizado é de cerca de 7g extrato/100g farinha;
- O extrato aquoso apresenta um teor de polissacáridos de cerca de 28% m/m
- Tanto a farinha de dreche como o seu extrato aquoso apresentam actividade antioxidante, determinada pelos métodos baseados na redução do radical DPPH e do ião  $Fe^{2+}$  (FRAP). Porém, em ambos os métodos, o valor de AOA medido, expresso em MTrolox/100g m.s, revelou ser dependente da concentração de dreche e de extrato aquoso na mistura reacional. No que diz respeito ao método FRAP, o valor da AOA obtido para a farinha de dreche também variou com o método de remoção dos sólidos em suspensão da mistura reacional antes da medição da absorvância (centrifugação ou filtração).
- O procedimento experimental para a determinação da AOA pelos métodos DPPH e FRAP deve ser otimizado, relativamente à concentração de material a usar e método de separação de sólidos solúveis.

Das conclusões apresentadas, a farinha de dreche, apesar de ser um sub-produto, apresenta alguma actividade antioxidante e elevado teor em minerais, sendo de considerar a sua incorporação em produtos de panificação, como incremento de compostos bioativos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abreu D.A.P., Rodriguez K.V., Cruz J.M., (2011) - Extraction, purification and characterization of an antioxidant extract from barley husks and development of an antioxidant active film for food package – *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Article Press, (8 pag.);

Aguiar A., Ferraz A., (2011) – Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas – *Química Nova*, Volume 34, (1729-1738);

Ajanakua K.O., Dawodub F.A., Siyanbola T.O., (2010) – Histopathological Studies of Utilization of Brewery Spent Grains Effect in Humans Food Chain – *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*, , Volume 1, No.2;

Aliyu S., Bala M., (2011) – Brewer's spent grain: A review of its potentials and Applications – *African Journal of Biotechnology* Volume 10(3), (324-331);

Ângelo P.M., Jorge N., (2007) – Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão – *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 66(1), (1-9);

Bauer J.L., Harbaum-Piayda B., Schwarz K., (2012) – Phenolic compounds from hydrolyzed and extracted fiber-rich by-products – *LWT – Food Science and Technology*, 47, (246-254);

Beldman G., Hennekan J., Voragen A.G.J., (1987) – Enzymatic hydrolysis of beer brewer's spent grain and the influence of pretreatments – *Biotechnology and bioengineering*, Volume 30, (668-671);

Cabrita M.J., Ricardo-da-Silva J., Laureano O., (2003) – Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos – Trabalho apresentado no I Seminário Internacional de Vitivinicultura, Ensenada, México;

Conde E., Gullón P., Moure A., Dominguez H., Parajó J.C., (2009) – Fraction of industrial solids containing barley husks in aqueous media – *Food and Bioproducts Processing*, Volume 87, (208-214);

Costa, S.B., (2011) – 3ª. Aula de Cereais da Unidade Curricular Tecnologia Alimentar, do Curso de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, Pós-Laborar, ISA, Lisboa;

Duarte L.C., Esteves M.P., Carvalheiro F., Vicente P., Gírio F.M., (2007) - Os subprodutos agro-industriais de natureza lenhocelulósica: caracterização da situação portuguesa – *Revista Engenharia Química*, Nº. 5, 1º. Trimestre (56-62);

- Essien J.P., Udotong J.R. (2008) – Amino acid profile of biodegraded brewers spent grain (BSG) – *Journal Appl. Sci. Environmental Management*, Volume 12(1), (109-111);
- Garrote G., Cruz J.M., Dominguez H., Parajó J.C., (2008) – Non-isothermal autohydrolysis of barley husks: Product distribution and antioxidant activity of ethyl acetate soluble fractions – *Journal of Food Engineering*, Volume 84, (544-552);
- Goupy P., Hugues M., Boivin P., Amiot M.J., (1999) – Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds – *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 79, (1625-1634);
- Gregori A., Svagelj M., Pahor B., Berovic M., Pohleven F., (2008) – The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production – *New Biotechnology* doi:10.1016/j.nbt.2008.08.003;
- Gupta M., Abu-Ghannam N., Gallagher E., (2010) – Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products – *Comprehensive reviews in food science and food safety* – Volume 9, (318-328);
- Kabel M.A., Carvalheiro F., Garrote G., Avgeninos E., Parajó J.C., Girio F.M., Schols H.A. , Voragen A.G.J., (2002) – Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides – *Carbohydrate Polymers*, Volume 50 (47-56);
- Martinez-Villaluenga C., Michalska A., Frias J., Piskula M.K., Vidal-Valverde C., Zielinski H., (2009) – Effect of Flour Extraction Rate and Baking on Thiamine and Riboflavin Content and Antioxidant Capacity of Traditional Rye Bread – *Journal of food science*, Volume 74(1), (49-55);
- McCarthy A.L., O'Callaghan Y.C., Connolly A., Piggott C.O., FitzGerald R.J., O'Brien N.M., (2012) – Phenolic extracts of brewer's spent grain (BSG) as functional ingredients – assessment of their DNA protective effects against oxidant-induced DNA single strand breaks in U937 cells – *Food Chemistry*, Volume 134, (641-646);
- Mussatto S.I., Roberto I.C., (2005) – Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol – *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 85, (2453–2460);
- Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C., (2006) – Brewery spent grain: generation, characteristics and potential applications – *Journal of Cereal Science*, Volume 43(1), (1-14);
- Oliveira D.M., Bastos D.H.M., (2011) – Disponibilidade de ácidos fenólicos – *Química Nova*, volume 34, nº. 6 (1051-1056);

Pereira M.O.S., (2010) – Estudo comparativo de métodos de avaliação de capacidade antioxidante de compostos bioactivos – Dissertação para a obtenção de grau de mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa;

Pimenta A.C.M., (2012) – Extratos aquosos de *Pterospartum Tridentatum* L. – Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante – Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa;

Pinto F.P., (2010) – Nutracêuticos e Alimentos Funcionais – Substâncias de origem natural como fonte de suplementos alimentares – Lidel – Edições Técnicas, Lda., Lisboa-Porto, (15-40);

Ramalho V.C., Jorge N., (2006) – Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos – Química Nova, Volume 29, Numero 4, (755-760);

Rodriguez-Amaya, D.B., (2010) – Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidante activity of food carotenoids – A review – Journal of Food Composition and Analysis, 23, (726-740);

Saliba E.O.S., Rodriguez N.M., Morais S.A.L., Piló-Veloso D., (2001) – Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química – Ciência Rural, Santa Maria, Volume 31, Numero 5, (917-928);

Santos M., Jimenez J.J., Bartolomé B., Gomez-Cordovés C., Nozal M.J., (2003) – Variability of brewer's spent grain within a brewery – Food Chemistry, Volume 80, (17-21);

Thaipong K.S., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D.H., (2006) – Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts – Journal of Food Composition and Analysis, 19, (669-675);

Vasconcelos S.M.L., Goulart M.O.F., Moura J.B.F., Benfato V.M., Silveira M., Kubota L.T., (2007) – Espécies reactivas de oxigenio e de nitrogénio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação – Química Nova, Volume 30, Numero 5, (1323-1338);

Viëtor R.J., Voragen A.G.J., Angelino S.A.G.F., (1993) – Composition of non-starch polysaccharides in wort and spent grain from brewing trials with malt from a good malting quality barley and a feed barley – Journal Inst. Brew, Maio-Junho Volume 99, (243-248);

Yu J., Vasathan T., Temelli F., (2001) – Analysis of Phenolic Acids in Barley by High-Performance Liquid Chromatography – Journal Agriculture Food and Chemistry, Volume 49, (4352-4358);

Zilic S., Sukalovic V.H., Dodig D., Maksimovic V., Maksimovic M., Basic Z., (2011) – Antioxidant activity os small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants – Journal of Cereal Science, 54, (417-424);

Páginas da internet consultadas:

<http://www.apcv.pt;>

<http://www.pofc.gren.pt;>

<http://www.dq.fct.unl.pt;>



TABELA A – Determinação da cor da Farinha de Dreche

**Modelo de cor Hunter Lab / CIELab**

Amostra	L - Luminosidade	a - vermelho-verde	b - amarelo-azul
1	63,49	3,02	19,74
2	64,03	2,91	19,16
3	63,98	2,97	18,97
média	63,83	2,97	19,29
desvp	0,298	0,055	0,401

TABELA B – Determinação do pH da Farinha de Dreche

Ensaio	pH da Água Destilada	pH da Solução de Farinha de dreche
1º.	5,56	5,30
2º.		5,31
3º.		5,28
<b>Média</b>		5,30
<b>DesvPadrão</b>		0,015

TABELA C – Determinação da massa específica ( $\rho$ ) da Farinha de Dreche

**Massa Específica da Farinha de Dreche**

Ensaio	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	Massa (g)	Volume (cm <sup>3</sup> )
1º.	0,57	162,64	286,89
2º.	0,57	162,74	
Média	0,57	162,69	
DesvPadrão	0,000	0,071	

**TABELA D – Determinação de teor de humidade**

Amostra	Cadinho nº.	Peso do cadinho (g)	Peso da farinha (g)	Peso Inicial (g)	Peso final (g)	% Humidade		
Farinha de Dreche	A	20,69	2,00	22,69	22,57	6,32	6,23	±0,080
	R	20,59	2,00	22,59	22,47	6,20		
	7	15,85	2,00	17,85	17,73	6,18		
Farinha de dreche após extração	4	15,94	2,00	17,94	17,89	2,53	2,58	±0,087
	12	20,75	2,00	22,75	22,70	2,52		
	15	15,99	2,00	17,99	17,93	2,68		

**TABELA E – Determinação de teor de cinza**

Amostra	Cadinho nº.	Tara (g)	Massa Amostra (g)	Peso Inicial (g)	Peso final (g)	% Cinza		
Farinha de Dreche	17	22,33	2,00	24,33	22,39	2,96	2,96	±0,007
	23	25,95	2,00	27,95	26,01	2,97		
Farinha de dreche após extração	18	25,20	2,00	27,20	25,25	2,84	2,84	

**TABELA F – Identificação de elementos minerais (mg de mineral/100g de Farinha)**

Mineral	Farinha de dreche		Fração de Sólidos insolúveis
mg de mineral/100g de Farinha			
Ca	259,68	±0,735	278,62
P	254,97	±3,087	229,65
Mg	185,95	±0,636	133,8
K	54,61	±1,230	21,83
Na	9,2	±0,424	3,57
Fe	7,05	±0,021	7,84
Zn	4,31	±0,092	4,72
Mn	1,04	±0,046	1,07
Cu	0,19	±0,035	0,33

**TABELA G – Determinação do extrato orgânico pelo método Soxhlet**

Farinha de Dreche (g)	Extrato orgânico (g)	Rendimento de Extração (%) Base Seca
3,0001	0,49	15,19
3,0172	0,48	14,90
3,2199	0,67	19,41
		<b>16,50 ±2,937</b>

TABELA H – Determinação do teor de polissacáridos no extrato aquoso concentrado

Extrato aquoso concentrado (ml)	M1 Tara dos tubos de centrifuga (g)	Tara + Extrato aquoso (g)	Extrato aquoso (g)	Tara + Extrato aquoso após centrifugação (g)	M2 Tara + Extrato aquoso após secagem (g)	Massa precipitado (gomas) (g)
<b>35,0</b>	10,61	36,94	26,33	11,57	10,64	0,033
	10,36	36,98	26,62	11,49	10,39	0,035
	10,34	34,40	24,06	10,78	10,37	0,029
	9,81	34,58	24,77	10,33	9,84	0,030
	10,38	20,64	10,26	10,67	10,39	0,012
	9,69	20,64	10,95	9,95	9,71	0,014
	10,41	20,86	10,44	10,72	10,42	0,013
	10,40	20,83	10,43	10,66	10,41	0,013
<b>Total</b>	<b>81,99</b>	<b>225,86</b>	<b>143,87</b>	<b>86,18</b>	<b>82,17</b>	<b>0,179</b>

TABELA I – Teor de Compostos Fenólicos Totais no Extrato Aquoso Liofilizado da Farinha de Dreche

Extrato Liofilizado (mg)	H <sub>2</sub> O (ml)	[ $\lambda$ ] Amostra (g/l)	Abs. (280nm)	[ $\lambda$ ] Acido Gálico (mg/l) $y = 0,0302x - 0,0414$	mg EAG /g Extrato	Desvio Padrão
<b>10</b>	10	1,0	0,399	14,583	14,583	
<b>10</b>	10	1,0	0,399	14,583	14,583	
<b>10</b>	10	1,0	0,400	14,616	14,616	
<b>10</b>	10	1,0	0,306	11,503	11,503	
<b>10</b>	10	1,0	0,307	11,536	11,536	
<b>10</b>	10	1,0	0,307	11,536	11,536	
<b>Média</b>	<b>10</b>	<b>1,0</b>	<b>0,353</b>	<b>13,060</b>	<b>13,060</b>	<b><math>\pm 1,681</math></b>
<b>35</b>	25	1,4	0,850	29,517	20,845	
<b>35</b>	25	1,4	0,847	29,417	20,775	
<b>35</b>	25	1,4	0,653	22,993	16,471	
<b>35</b>	25	1,4	0,651	22,927	16,423	
<b>Média</b>	<b>25</b>	<b>1,4</b>	<b>0,750</b>	<b>26,214</b>	<b>18,629</b>	<b><math>\pm 2,519</math></b>
<b>51</b>	25	2,0	1,189	40,742	19,971	
<b>51</b>	25	2,0	1,192	40,841	20,020	
<b>51</b>	25	2,0	1,190	40,775	19,988	
<b>52</b>	25	2,1	0,977	33,722	16,212	
<b>52</b>	25	2,1	0,981	33,854	16,276	
<b>52</b>	25	2,1	0,980	33,821	16,260	
<b>Média</b>	<b>25</b>	<b>2,1</b>	<b>1,085</b>	<b>37,292</b>	<b>18,121</b>	<b><math>\pm 2,051</math></b>

TABELA J – Atividade Antioxidante – Método do DPPH• - Farinha de dreche

Mistura reacional com processo de filtração											
Farinha (mg)	Água (ml)	DPPH (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)	Abs <sub>DPPH</sub>	Abs <sub>Amostra</sub>	RSA (%)	C <sub>Trolox</sub> (M) y=2E+06x+24,22	TEAC (M Trolox/g Farinha)	TEAC (M Trolox/100g Farinha)	Desvio Padrão
<b>100,3</b>	1,0	4,0	5,0	20,1	1,033	0,071	93,127	3,445E-05	0,0003	0,034	
<b>100,4</b>	1,0	4,0	5,0	20,1	1,033	0,075	92,740	3,426E-05	0,0003	0,034	
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>	<b>20,1</b>	<b>1,033</b>	<b>0,073</b>	<b>92,933</b>	<b>3,436E-05</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,034</b>	<b>0,000</b>
<b>200,4</b>	1,0	4,0	5,0	40,1	1,033	0,060	94,192	3,499E-05	0,0002	0,018	
<b>200,2</b>	1,0	4,0	5,0	40,0	1,033	0,063	93,901	3,484E-05	0,0002	0,017	
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>	<b>40,1</b>	<b>1,033</b>	<b>0,062</b>	<b>94,047</b>	<b>3,491E-05</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,017</b>	<b>0,000</b>
<b>300,5</b>	1,0	4,0	5,0	60,1	1,033	0,069	93,320	3,455E-05	0,0001	0,012	
<b>300,6</b>	1,0	4,0	5,0	60,1	1,033	0,069	93,320	3,455E-05	0,0001	0,012	
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>	<b>60,1</b>	<b>1,033</b>	<b>0,069</b>	<b>93,320</b>	<b>3,455E-05</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,012</b>	<b>0,000</b>

TABELA K – Atividade Antioxidante – Método FRAP – Farinha de Dreche

Mistura reacional com processo de filtração											
Farinha (mg)	Água (ml)	FRAP (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)	Abs Amostra	Abs FRAP	RSA (%)	$C_{Trolox} (M)$ $y=5E+07x+4,7709$	TEAC (M Trolox/g Farinha)	TEAC (M Trolox/100g Farinha)	Desvio Padrão
50,6	1,0	2,7	3,7	13,7	0,877	0,113	676,106	1,343E-05	0,0003	0,027	
50,2	1,0	2,7	3,7	13,6	0,731	0,113	546,903	1,084E-05	0,0002	0,022	
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>2,7</b>	<b>3,7</b>	<b>13,6</b>	<b>0,804</b>	<b>0,113</b>	<b>611,504</b>	<b>1,213E-05</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,024</b>	<b>0,004</b>
25,2	1,0	2,7	3,7	6,8	0,536	0,113	374,336	7,391E-06	0,0003	0,029	
25,7	1,0	2,7	3,7	6,9	0,370	0,113	227,434	4,453E-06	0,0002	0,017	
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>2,7</b>	<b>3,7</b>	<b>6,9</b>	<b>0,453</b>	<b>0,113</b>	<b>300,885</b>	<b>5,922E-06</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,023</b>	<b>0,009</b>
Mistura reacional com processo de centrifugação											
Farinha (mg)	Água (ml)	FRAP (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)	Abs Amostra	Abs FRAP	RSA (%)	$C_{Trolox} (M)$ $y=5E+07x+4,7709$	TEAC (M Trolox/g Farinha)	TEAC (M Trolox/100g Farinha)	Desvio Padrão
50,6	1,0	2,7	3,7	13,7	0,926	0,113	719,469	1,429E-05	0,0003	0,028	
50,2	1,0	2,7	3,7	13,6	1,084	0,113	859,292	1,709E-05	0,0003	0,034	
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>2,7</b>	<b>3,7</b>	<b>13,6</b>	<b>1,005</b>	<b>0,113</b>	<b>789,381</b>	<b>1,569E-05</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,031</b>	<b>0,004</b>
25,2	1,0	2,7	3,7	6,8	1,012	0,113	795,575	1,582E-05	0,0006	0,063	
25,7	1,0	2,7	3,7	6,9	1,132	0,113	901,770	1,794E-05	0,0007	0,070	
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>2,7</b>	<b>3,7</b>	<b>6,9</b>	<b>1,072</b>	<b>0,113</b>	<b>848,673</b>	<b>1,688E-05</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,066</b>	<b>0,005</b>

TABELA L – Atividade Antioxidante – Método do DPPH• - Extracto liofilizado

Mistura reacional com volume total de 5 ml (4 ml DPPH)											
Extrato (mg)	Água (ml)	DPPH (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)	Abs <sub>DPPH</sub>	Abs <sub>Amostra</sub>	RSA (%)	C <sub>Trolox</sub> (M) y=2E+06x+24,22	TEAC (M Trolox/g Extrato)	TEAC (M Trolox/100g Extrato)	Desvio Padrão
5,0	1,0	4,0	5,0	1,0	1,072	0,732	31,716	3,748E-06	0,0007	0,075	
5,1	1,0	4,0	5,0	1,0	1,072	0,711	33,675	4,728E-06	0,0009	0,093	
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,072</b>	<b>0,722</b>	<b>32,696</b>	<b>4,238E-06</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,084</b>	<b>0,013</b>
10,2	1,0	4,0	5,0	2,0	1,072	0,715	33,302	4,541E-06	0,0004	0,045	
10,2	1,0	4,0	5,0	2,0	1,072	0,716	33,209	4,495E-06	0,0004	0,044	
<b>Média</b>	<b>1,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>	<b>2,0</b>	<b>1,072</b>	<b>0,716</b>	<b>33,256</b>	<b>4,518E-06</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,044</b>	<b>0,000</b>
Mistura reacional com volume total de 10 ml (8 ml DPPH)											
5,2	2,0	8,0	10,0	0,5	0,997	0,585	41,324	8,552E-06	0,0016	0,165	
5,1	2,0	8,0	10,0	0,5	0,997	0,376	62,287	1,903E-05	0,0037	0,373	
<b>Média</b>	<b>2,0</b>	<b>8,0</b>	<b>10,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,997</b>	<b>0,481</b>	<b>51,805</b>	<b>1,379E-05</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,269</b>	<b>0,148</b>
10,3	2,0	8,0	10,0	1,0	1,089	0,361	63,791	1,979E-05	0,0019	0,192	
10,2	2,0	8,0	10,0	1,0	1,089	0,398	63,453	1,962E-05	0,0019	0,192	
<b>Média</b>	<b>2,0</b>	<b>8,0</b>	<b>10,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,089</b>	<b>0,380</b>	<b>63,622</b>	<b>1,970E-05</b>	<b>0,0019</b>	<b>0,192</b>	<b>0,000</b>
21,8	2,0	8,0	10,0	2,2	1,089	0,140	87,144	3,146E-05	0,0014	0,144	
27,3	2,0	8,0	10,0	2,7	1,089	0,081	92,562	3,417E-05	0,0013	0,125	
<b>Média</b>	<b>2,0</b>	<b>8,0</b>	<b>10,0</b>	<b>2,5</b>	<b>1,089</b>	<b>0,111</b>	<b>89,853</b>	<b>3,282E-05</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,135</b>	<b>0,014</b>

TABELA M – Atividade Antioxidante – Método do FRAP - Extrato liofilizado (solução inicial preparada com 50mg de extrato seco e 10ml de água destilada)

Efeito da concentração da mistura reacional											
Extrato liofilizado(mg/ml)	Volume da Amostra (ml)	FRAP (ml)	Volume da solução reacional (ml)	[ ] solução reacional (mg/ml)	Abs Amostra	Abs FRAP	RSA	CTrolox (M) $y=516579x+0,0477$	TEAC (M Trolox/g Extrato)	TEAC (M Trolox/100g Extrato)	Desvio Padrão
5,0	0,36	2,7	3,06	0,59	1,126	0,080	13,075	2,522E-05	0,0005	0,050	
5,0	0,36	2,7	3,06	0,59	0,975	0,080	11,188	2,156E-05	0,0004	0,043	
5,0	0,36	2,7	3,06	0,59	0,986	0,080	11,325	2,183E-05	0,0004	0,044	
5,0	0,36	2,7	3,06	0,59	0,983	0,080	11,288	2,176E-05	0,0004	0,044	
<b>Média</b>	<b>0,4</b>	<b>2,7</b>	<b>3,06</b>	<b>0,6</b>	<b>1,018</b>	<b>0,080</b>	11,719	2,259E-05	0,0005	0,045	<b>0,004</b>
2,5	0,36	2,7	3,06	0,29	0,227	0,086	1,640	3,081E-06	0,0001	0,006	
2,5	0,36	2,7	3,06	0,29	0,213	0,086	1,477	2,766E-06	0,0001	0,006	
2,5	0,36	2,7	3,06	0,29	0,187	0,086	1,174	2,181E-06	0,0000	0,004	
2,5	0,36	2,7	3,06	0,29	0,204	0,086	1,372	2,564E-06	0,0001	0,005	
<b>Média</b>	<b>0,4</b>	<b>2,7</b>	<b>3,06</b>	<b>0,3</b>	<b>0,208</b>	<b>0,086</b>	1,416	2,648E-06	0,0001	0,005	<b>0,001</b>