



Marta Alexandra Dias Marques

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Processo de adsorção/dessorção para a purificação
de um extrato natural rico em hidroxitirosol:
Otimização do processo *batch***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Ana Vital Morgado Marques Nunes,
Investigadora REQUIMTE, FCT/UNL
Co-orientador: Mestre Maria Franco Portugal da Costa Romeu,
Empresa *Zeyton Nutraceuticals*

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio
Arguente: Professor Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva
Vogal: Professora Doutora Ana Vital Morgado Marques Nunes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2017

Marta Alexandra Dias Marques

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Processo de adsorção/dessorção para a purificação de
um extrato natural rico em hidroxitirosol: Otimização
do processo *batch***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Ana Vital Morgado Marques Nunes,
Investigadora REQUIMTE, FCT/UNL
Co-orientador: Mestre Maria Franco Portugal da Costa Romeu,
Empresa *Zeyton Nutraceuticals*

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio
Arguente: Professor Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva
Vogal: Professora Doutora Ana Vital Morgado Marques Nunes

Setembro de 2017

Direitos de cópia

Processo de adsorção/dessorção para a purificação de um extrato natural rico em hidroxitirosol: Otimização do processo *batch*

Copyright © 2017 - Marta Alexandra Dias Marques e Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Todos os direitos reservados.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero começar por agradecer ao Professor Doutor Manuel Nunes da Ponte e à Doutora Ana Nunes por me darem a oportunidade de fazer parte do desenvolvimento deste projeto e por toda a transmissão de conhecimentos. De seguida, um agradecimento muito especial à minha “orientadora” de laboratório, Maria Romeu, por toda a tua ajuda, atenção e paciência com as dúvidas que me foram surgindo (que não foram poucas!). A todos os colegas de laboratório e gabinete: Clarinda, Gosia, Catarina Melo, Catarina Araújo, Ana Rita, Marta, Raquel, Duarte, Guilherme, Sofia “Messi”, Inês Paninho e Sílvia, muito obrigada pelos momentos de boa disposição, bolos de aniversário e por toda a ajuda ao longo do semestre.

Um grande agradecimento à Dona Palminha por todo o apoio e ajuda no laboratório e, principalmente, pela companhia nas longas horas lá passadas.

Muito obrigada ao Nuno Costa pela disponibilidade e apoio na execução das análises em HPLC-UV, ao Professor Marco Silva e Davide, pela pronta disponibilidade em realizar as análises em GC e ao Doutor Alexandre Paiva e ao Bruno pela transmissão de conhecimentos e “empréstimo” dos equipamentos.

Aos dois alunos do curso de Química Aplicada, Rita Rodrigues e Filipe Santos, muito obrigada pela ajuda e pelo interesse que mostraram pelo desenvolvimento deste trabalho.

Quase no fim, mas não menos especial, um grande obrigado aos meus amigos; a duas companheiras de há 20 anos, Carolina e Susana. Obrigada por me acompanharem nesta “batalha” que custou, mas foi!

Finalmente, um agradecimento à minha família, em especial aos meus pais, irmão e à *Bella*, por me apoiarem e ajudarem a superar obstáculos que surgiram nesta etapa da minha vida.

Resumo

Neste trabalho pretendeu-se explorar a tecnologia de adsorção e dessorção no processamento de um extrato natural de azeitona rico em hidroxitirosol, para a sua aplicação na indústria alimentar e farmacêutica.

Para aplicação na indústria alimentar, nomeadamente aditivização a azeites, teve-se como principal objetivo eliminar compostos voláteis do extrato, nomeadamente o ácido acético e 4-etilfenol, responsáveis pelos odores avinagrado e avinhado respetivamente. Neste contexto, procedeu-se ao estudo da influência de vários parâmetros de adsorção/dessorção de maneira a otimizar cada um dos passos e recuperar a maior quantidade de hidroxitirosol possível. Obtiveram-se vários produtos desodorizados sem qualquer defeito, com uma eliminação de mais de 98% dos compostos voláteis e com uma recuperação de hidroxitirosol entre os 70-80%.

Desenvolveu-se com sucesso e pela primeira vez uma correlação entre a concentração de hidroxitirosol e tirosol num extrato de bagaço de azeitona e o seu conteúdo total em polifenóis (utilizando o método de *Folin-Ciocalteu*). Esta metodologia por ser simples e rápida pode ser realizada *on-site* (por exemplo, no lagar), durante o processo de produção do extrato como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência.

Para aplicação na indústria farmacêutica, o processo de adsorção/dessorção foi também explorado com o objetivo de eliminação de hidratos de carbono do extrato. Os hidratos de carbono afetam negativamente o processo de secagem (com obtenção de pós higroscópicos e pouco estáveis ao ar). A utilização do processo de adsorção/dessorção permitiu eliminar 91% dos hidratos de carbono.

No final deste trabalho, o processo de adsorção/dessorção foi efetuado com sucesso a uma escala piloto.

Palavras-Chave: Hidroxitirosol, tirosol, adsorção, polifenóis, azeite, *spray-drying*.

Abstract

In this work the adsorption/desorption technology was explored in the processing of an olive extract rich in hydroxytyrosol, for its application in the food and pharmaceutical industry.

For application in the food industry, the main objective was to eliminate the volatile compounds, namely acetic acid and 4-ethylphenol, which are responsible for the vinegar and wine like odours, respectively. In this context, different operating conditions were studied in order to optimize each one of the steps, as well as to recover as much hydroxytyrosol as possible, for its addition in olive oils. Several deodorized products were obtained without any defect, with an elimination of the volatile compounds of above 98%, as well as a recovery of hydroxytyrosol between 70-80%.

Furthermore, a correlation between hydroxytyrosol and tyrosol concentration in the extract and its total phenolic content (using the Folin-Ciocalteu method) was developed for the first time. Because this methodology is simple and fast, it can be carried out on site (e.g. in the olive mill), during the production of the extract, as an alternative to high performance liquid chromatography (HPLC).

For application in the pharmaceutical industry, the adsorption / desorption process was also explored with the objective of eliminating carbohydrates from the extract. Carbohydrates negatively affect the drying process (resulting highly hygroscopic and unstable powders). The use of the adsorption / desorption process allowed to eliminate 91% of carbohydrates.

At the end of this work, the adsorption / desorption process was successfully carried out on a pilot scale.

Key-words: Hydroxytyrosol, tyrosol, adsorption, polyphenols, olive oil, spray-drying

Índice

Índice de figuras	XV
Índice de tabelas	XVII
1. Introdução	1
1.1. Produção de azeite e sub-produtos da azeitona.....	1
1.2. Composição do bagaço de azeitona: tirosol e hidroxitirosol	2
1.4. Zeyton Nutraceuticals: A implementação de um processo inovador	5
1.5. Composição do extrato desenvolvido pela <i>Zeyton Nutraceuticals</i> em hidroxitirosol (HT), tirosol (TY) e outros compostos.....	6
1.6. Processos de purificação de extratos de azeitona.....	7
1.7. Objetivo desta dissertação	9
Bibliografia	10
2. Materiais e métodos.....	13
2.1. Materiais	13
2.1.1. Concentrados de osmose inversa (RO).....	13
2.1.2. Resina polimérica não iônica XAD4	14
2.1.3. Reagentes, solventes e padrões.....	15
2.2. Métodos.....	15
2.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	15
2.2.2. Cromatografia gasosa (GC)	16
2.2.3. Quantificação de fenóis totais	16
2.2.4. Quantificação de hidratos de carbono.....	17
2.2.5. Desodorização do concentrado de osmose inversa utilizando uma resina de adsorção (Resina XAD4)	18
Bibliografia	20
3. Apresentação e discussão de resultados	21
3.1. Composição dos extratos em hidroxitirosol e tirosol e avaliação da estabilidade do concentrado de osmose inversa (RO).....	21
3.2. Otimização do processo de desodorização do concentrado de osmose inversa.....	27
3.2.1. Ensaio realizado à escala piloto.....	27
3.2.2. Passo de adsorção.....	30
3.2.3. Passo de dessorção com água	31
3.2.4. Passo de dessorção com mistura de solventes biocompatíveis.....	31
3.2.5. Condições otimizadas	34
3.2.6. Eficácia da desodorização	36
3.2.7. Eliminação de hidratos de carbono para a aplicação do produto em <i>spray-drying</i>	41
3.3. Estudo de adsorção e dessorção de hidroxitirosol ao longo do tempo	45

3.4. Estudo da variação da concentração dos hidratos de carbono ao longo do processo de adsorção/ dessorção para a desodorização do extrato	50
3.5. Estudo da variação dos hidratos de carbono ao longo do processo de adsorção/dessorção para aplicação em <i>spray-drying</i>	51
3.6. Estudo do passo de regeneração da resina	53
Bibliografia	56
4. Conclusões.....	57
5. Anexos	59
A. Cromatografia líquida de alta eficiência	59
B. Estabilidade do concentrado de osmose inversa.....	61
C. Método de <i>Folin-Ciocalteu</i> – Retas de calibração e correlações.....	61
D. Adsorção/ Dessorção	65
D1. Condições de operação.....	65
D2. Aplicação em azeites.....	67
D3. Aplicação em <i>spray-drying</i>	74
D4. Quantificação de fenóis totais, hidroxitirosol e tirosol das amostras	78
E. Método de fenol-sulfúrico – Reta de calibração e concentração de amostras	79
F. Cromatografia gasosa	81

Índice de figuras

Figura 1.1 - Representação da área ocupada pelo cultivo de oliveiras em Portugal. ^[1]	1
Figura 1.2 - Representação esquemática da oleuropeína. ^[21]	3
Figura 1.3 - Molécula de tirosol. ^[23]	3
Figura 1.4 - Molécula de hidroxitirosol. ^[24]	3
Figura 1.5 - Esquema resumo do processo de produção do concentrado de osmose inversa. ^[10]	6
Figura 1.6 – Processos de concentração do hidroxitirosol	7
Figura 3.1 - Estabilidade do RO 164 ao longo do tempo. O RO foi armazenado à temperatura ambiente, em bidões de plásticos.	22
Figura 3.2 - Correlação entre as concentrações de fenóis totais e de hidroxitirosol para os RO.	23
Figura 3.3 - Correlação entre as concentrações de fenóis totais e de tirosol para os RO.	24
Figura 3.4 - Correlação entre as concentrações de fenóis totais e de hidroxitirosol para dessorvidos não evaporados (mistura de solventes biocompatíveis à base de água).....	25
Figura 3.5 - Correlação entre as concentrações de fenóis totais e de tirosol para dessorvidos não evaporados (mistura de solventes biocompatíveis à base de água).	26
Figura 3.6 - Montagem do processo batch em escala alargada (scale up).	28
Figura 3.7 - Representação esquemática do balanço mássico ao hidroxitirosol no ensaio realizado à escala piloto.	29
Figura 3.8 - Percentagem (%) de hidroxitirosol obtidas ao longo do processo e a % global do processo.	29
Figura 3.9 - Concentração de hidratos de carbono em produtos desodorizados.	33
Figura 3.10 - Balanço mássico ao hidroxitirosol nos efluentes do processo.	34
Figura 3.11 - Efluentes do processo: 1- não adsorvido; 2-dessorvido com água; 3- dessorvido não evaporado; 4- dessorvido evaporado.....	35
Figura 3.12 - Cromatograma do RO 164.	36
Figura 3.13 - Cromatograma do efluente NADS.	37
Figura 3.14 - Cromatograma do efluente DSS H ₂ O.	37
Figura 3.15 - Cromatograma do produto desodorizado (DSS evap).	38
Figura 3.16 – Gráfico com as áreas de picos dos compostos voláteis em várias amostras de efluentes “não adsorvidos”.	39
Figura 3.17 - Gráfico com as áreas de picos dos compostos voláteis em várias amostras de efluentes “dessorvidos com água”.	40
Figura 3.18 – Balanço mássico e percentagens de hidroxitirosol nos efluentes do processo. ..	43
Figura 3.19 – Gráfico com as concentrações de hidratos de carbono nos processos com aplicação em <i>spray-drying</i>	44
Figura 3.20 – Comportamento do hidroxitirosol ao longo do tempo no efluente “não adsorvido”. As concentrações foram determinadas pela correlação para RO.	45
Figura 3.21 - Comportamento do tirosol ao longo do tempo no efluente “não adsorvido”. As concentrações foram determinadas pela correlação dos RO.	46
Figura 3.22 – Concentrações de hidroxitirosol e tirosol do efluente “dessorvido com água” ao longo do tempo, calculadas utilizando a correlação dos RO.	46
Figura 3.23 - Concentrações do efluente “dessorvido não evaporado” ao longo do tempo (determinadas a partir de análises de HPLC).	47
Figura 3.24 – Concentrações de hidroxitirosol e tirosol na 2 ^a e 3 ^a dessorção ao longo do tempo (determinadas a partir de análises de HPLC).	48
Figura 3.25 - Concentrações de HT e TY presentes nos efluentes NADS e DSS H ₂ O.	49
Figura 3.26 - Balanço mássico e percentagens calculadas de hidratos de carbono nos efluentes do processo “ADS 1645”	51
Figura 3.27 - Balanço mássico e percentagens calculadas de hidratos de carbono nos efluentes do processo “ADS 1647”	52

Figura 3.28 – Solventes utilizados na regeneração da resina	53
Figura 3.29 – Ensaio da regeneração, utilizando o etanol como solvente de limpeza, com vários tempos de regeneração	54
Figura 3.30 – Variação da temperatura na limpeza da resina	55
Figura 5.1 - Reta de calibração do hidroxitirosol padrão.	59
Figura 5.2 - Reta de calibração do tirosol padrão.	60
Figura 5.3 - Cromatograma de uma amostra de concentrado de osmose inversa (RO164).	60
Figura 5.4 - Reta de calibração do ácido gálico em água.	62
Figura 5.5 - Reta de calibração do ácido gálico em mistura de solventes biocompatíveis à base de água.	63
Figura 5.6 - Reta de calibração do ácido gálico em etanol.	64
Figura 5.7 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1640. .	67
Figura 5.8 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1641. .	68
Figura 5.9 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1642. .	69
Figura 5.10 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1643.	70
Figura 5.11 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1645. .	71
Figura 5.12 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS16410.	72
Figura 5.13 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol até ao passo de dessorção com água do processo ADS 16411.	73
Figura 5.14 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1646. .	74
Figura 5.15 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1647. .	75
Figura 5.16 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1648. .	76
Figura 5.17 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1649. .	77
Figura 5.18 - Reta de calibração para o método fenol-sulfúrico.	79
Figura 5.19 - Cromatograma da amostra "não adsorvido" do processo ADS 1641.	81
Figura 5.20 - Cromatograma da amostra "não adsorvido" do processo ADS 1642.	82
Figura 5.21 - Cromatograma da amostra "não adsorvido" do processo ADS 1643.	82
Figura 5.22 - Cromatograma da amostra "dessorvido com água" do processo ADS 1641.	82
Figura 5.23 - Cromatograma da amostra "dessorvido com água" do processo ADS 1642.	82
Figura 5.24 - Cromatograma da amostra "dessorvido com água" do processo ADS 1643.	83
Figura 5.25 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1640.	83
Figura 5.26 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1641.	83
Figura 5.27 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1642.	83
Figura 5.28 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1643.	84
Figura 5.29 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1645.	84
Figura 5.30 - Cromatograma da alimentação, RO 164 (após a manutenção da máquina).	84
Figura 5.31 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado 48 h" do processo ADS 16410 (após manutenção da máquina).	85
Figura 5.32 - Cromatograma da amostra "dessorvido não evaporado 48 h" do processo ADS 16410 (após manutenção da máquina).	85
Figura 5.33 - Cromatograma da amostra "condensado do dessorvido evaporado 48 h" do processo ADS 16410 (após manutenção da máquina).	85

Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Concentrados de osmose inversa e respetiva data de entrega e volume.....	13
Tabela 2.2 - Propriedades da resina XAD4 ^[2] , ^[3]	14
Tabela 2.3 - Reagentes, solventes e padrões.	15
Tabela 2.4 - Parâmetros alterados ao longo do processo.	19
Tabela 3.1 - Amostras e respetivas concentrações de hidroxitirosol e tirosol.	21
Tabela 3.2 - Condições de operação utilizadas no ensaio à escala piloto (<i>scale-up</i>).	27
Tabela 3.3 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo.	28
Tabela 3.4 - Percentagem de hidroxitirosol adsorvido.....	30
Tabela 3.5 - Percentagens de perdas do hidroxitirosol no dessorvido com água.	31
Tabela 3.6 - Percentagem de hidroxitirosol recuperado.	31
Tabela 3.7 - Percentagem de hidroxitirosol recuperado utilizando a razão 1:3 para diferentes tempos.....	32
Tabela 3.8 - Massa de hidroxitirosol calculada para todos os efluentes do processo ADS1644.	34
Tabela 3.9 – Concentração do hidroxitirosol nos dessorvidos evaporados de vários processos.	35
Tabela 3.10 – Percentagens de eliminação dos compostos voláteis no produto desodorizado.	38
Tabela 3.11 – Percentagens de eliminação nos produtos desodorizados (e um não evaporado) de diversos processos.....	39
Tabela 3.12 – pH dos efluentes do processo “ADS 1644”.....	40
Tabela 3.13 – Percentagens de hidroxitirosol adsorvidas e dessorvidas em diferentes processos.	41
Tabela 3.14 – Concentrações de HT e TY calculadas através do método de <i>Folin-Ciocalteu</i> para os processos com aplicação em <i>spray-drying</i>	42
Tabela 3.15 – Massa e percentagens de hidroxitirosol obtidas nos efluentes do processo Scale-up SD1.....	42
Tabela 3.16 – Resultados obtidos para os hidratos de carbono em cada um dos efluentes do processo “ADS 1645”. As concentrações foram calculadas através do método de fenol-sulfúrico.	50
Tabela 3.17 – Resultados obtidos para os hidratos de carbono em cada um dos efluentes do processo “ADS 1647”.....	52
Tabela 3.18 – Concentrações de fenóis totais na limpeza da resina.....	55
Tabela 5.1 - Áreas dos picos correspondentes a concentrações de hidroxitirosol padrão.	59
Tabela 5.2 - Áreas dos picos correspondentes a concentrações de tirosol padrão.	59
Tabela 5.3 - Concentrações de HT e TY no RO 164 ao longo do tempo.	61
Tabela 5.4 - Absorvâncias medidas para concentrações de ácido gálico conhecidas preparadas em água.....	61
Tabela 5.5 - Absorvâncias medidas para concentrações de ácido gálico conhecidas preparadas numa mistura de solventes biocompatíveis à base de água.	62
Tabela 5.6 - Absorvâncias medidas para concentrações de ácido gálico conhecidas preparadas em etanol.....	63
Tabela 5.7 - Medições de absorvâncias, fenóis totais e hidroxitirosol e tirosol (HPLC) de concentrados de osmose inversa.....	64
Tabela 5.8 - Medições de absorvâncias, concentração de fenóis totais e hidroxitirosol e tirosol (HPLC) de "dessorvidos não evaporados".....	65
Tabela 5.9 - Condições de operação do passo de adsorção para cada um dos processos.....	65
Tabela 5.10 - Condições de operação do passo de dessorção com água para cada um dos processos.....	66
Tabela 5.11 - Condições de operação do passo de dessorção com uma mistura de solventes biocompatíveis à base de água para cada um dos processos.....	66

Tabela 5.12 – Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1640.	67
Tabela 5.13 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1641..	68
Tabela 5.14 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1642..	69
Tabela 5.15 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1643.	70
Tabela 5.16 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1645.	71
Tabela 5.17 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 16410.	72
Tabela 5.18 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 16411.	73
Tabela 5.19 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1646..	74
Tabela 5.20 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1647.	75
Tabela 5.21 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1648..	76
Tabela 5.22 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1649.	77
Tabela 5.23 - Absorvâncias medidas e concentrações de hidroxitirosol e tirosol calculadas para efluentes de vários processos de adsorção/dessorção realizados ao longo do trabalho.	78
Tabela 5.24 - Absorvâncias medidas para concentrações de glucose conhecidas.	79
Tabela 5.25 - Absorvâncias medidas e concentrações de hidratos de carbono calculadas.	80
Tabela 5.26 - Absorvâncias e concentração de hidratos de carbono calculadas para o processo ADS 16410.	80
Tabela 5.27 - Áreas dos picos de cada composto volátil para várias amostras estudadas ao longo do trabalho.....	81

Lista de abreviaturas

3,4- DHPEA-EDA – Forma dialdeídica do ácido elenóico ligado ao hidroxitirosol

ADS 1640 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1640

ADS 1641 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1641

ADS 1642 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1642

ADS 1643 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1643

ADS 1644 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1644

ADS 1645 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1645

ADS 1646 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1646

ADS 1647 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1647

ADS 1648 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1648

ADS 1649 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 1649

ADS 16410 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 16410

ADS 16411 – Processo de adsorção/ dessorção n.º 16411

DSS não evap – Dessorvido não evaporado

DSS EVAP – Dessorvido evaporado

DSS H₂O – Dessorvido com água

EtOH – Etanol

GAE – Equivalente em ácido gálico (*acid gallic equivalent*)

GC – Cromatografia gasosa

GE – Equivalente em glucose (*glucose equivalent*)

HC – Hidratos de carbono

HPLC-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência

HT – hidroxitirosol

NADS – Não adsorvido

RO – Concentrado de osmose inversa

RO6- Concentrado de osmose inversa n°6

RO8- Concentrado de osmose inversa n°8

RO161- Concentrado de osmose inversa n°161

RO162- Concentrado de osmose inversa n°162

RO163- Concentrado de osmose inversa n°163

RO164- Concentrado de osmose inversa n°164

RO165- Concentrado de osmose inversa n°165

RO166- Concentrado de osmose inversa n°166

RO167- Concentrado de osmose inversa nº167

RO168- Concentrado de osmose inversa nº168

TY – Tيروسول

1. Introdução

1.1. Produção de azeite e sub-produtos da azeitona

Segundo a *International Olive Council*, no início de 2017, a área ocupada para o cultivo de oliveiras em Portugal era de 352 000 hectares, ou seja, cerca de 3,8 % do território total português. Desta área ocupada, a maior parte da plantação de oliveiras é feita no Alentejo (50%), seguido por Trás-os-montes, Centro, Ribatejo e, por fim, Algarve.^[1] Como se pode observar na figura 1.1.

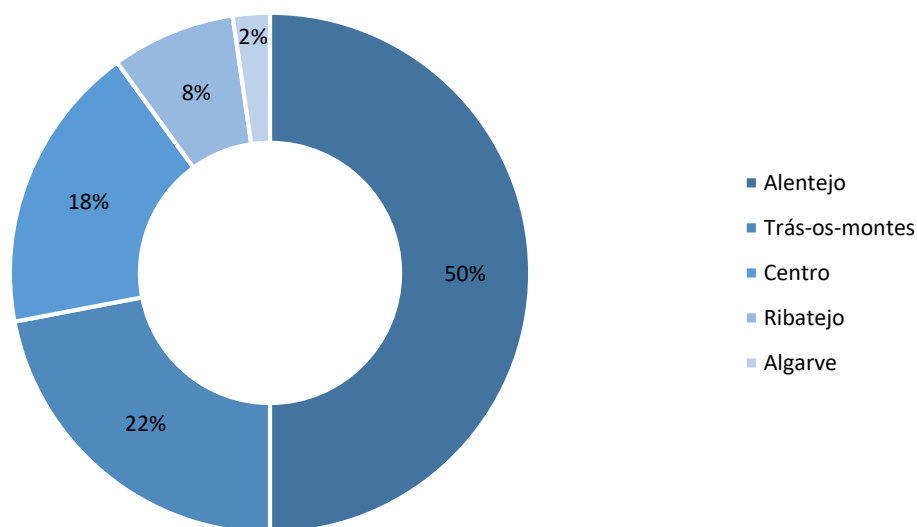


Figura 1.1 - Representação da área ocupada pelo cultivo de oliveiras em Portugal.^[1]

Para além disso, cerca de 97,5% da área total utilizada para o cultivo de azeitonas é direcionada para a produção de azeite, sendo os restantes 2,5% para a produção de azeitona de mesa. Por estes números é fácil perceber que o cultivo de oliveiras e, conseqüente, produção de azeite é uma atividade agrícola muito significativa no país.^[1]

Nos últimos anos em Portugal, houve uma série de investimentos que levaram a uma melhoria ao nível das tecnologias de extração do azeite, entre as quais a mais importante de todas: a substituição dos sistemas tradicionais por linhas contínuas de extração por centrifugação de massas (primeiramente em três fases e, de seguida, em duas fases). Apesar desta atualização, a indústria do azeite continua a gerar anualmente grandes quantidades de subprodutos, entre eles, o bagaço e águas ruças.^[2]

Do sistema de três fases resultam três fases distintas: águas residuais, fase sólida e azeite. As principais desvantagens deste processo é a utilização de grandes quantidades de

água, da qual resulta uma redução da quantidade de fenóis no azeite e a produção de grandes volumes de águas residuais. Estas últimas constituem um grande problema para o ambiente. Mais recentemente, o processo foi melhorado com o intuito de diminuir a quantidade de água utilizada.^{[3], [4]}

Como alternativa ao sistema de três fases e, de modo a combater os problemas intrínsecos à enorme produção de águas residuais, surgiu o sistema de duas fases. Neste tipo de sistema não é adicionada água, e os únicos produtos finais são o azeite e um novo subproduto, o bagaço, que consiste numa combinação entre resíduos sólidos e líquidos.^{[3], [5]}

Portanto, a principal vantagem deste sistema é a redução da quantidade de resíduos produzida e uma maior recuperação dos compostos fenólicos. Para além disto, há também uma redução em termos económicos, uma vez que os consumos de água e energia são menores.^{[3], [6]}

Aparentemente, com muito baixo valor comercial, estes subprodutos tornam-se num problema para os lagares de azeite, tanto ambiental (possuem grande carga poluente, devido à sua concentração em compostos orgânicos) como economicamente (processos de tratamento caros)^{[7], [8]}. A principal preocupação foi sempre o tratamento dos subprodutos antes do seu descarte/ compostagem ou utilização como combustível de queima.^{[5], [9]}

No entanto, durante a produção do azeite (fase lipídica), cerca de 98% dos compostos fenólicos, por serem compostos hidrofílicos, são perdidos na fase de bagaço ou águas ruças (fase aquosa).^{[5], [10]} Neste contexto vários estudos científicos têm sido publicados com o objetivo de aproveitar estes subprodutos para a extração de polifenóis.^{[11]-[13]} Para além dos compostos fenólicos, estes subprodutos contêm compostos orgânicos, inorgânicos e açúcares.^[14]

1.2. Composição do bagaço de azeitona: tirosol e hidroxitirosol

Os compostos fenólicos são compostos bioativos naturalmente presentes em plantas, vegetais e frutos, sendo o seu consumo normalmente associado aos benefícios da dieta mediterrânica.^{[15], [16]} Têm sido identificados como tendo um papel fundamental na defesa das plantas quando submetidas a condições de *stress*, tais como, condições climáticas extremas, infeções por fungos ou bactérias ou mesmo em situação de deficiência de nutrientes.^[10] Diversos estudos científicos que exploram a bioatividade destes compostos realçam ainda o seu interesse para aplicação na indústria alimentar e farmacêutica.^[10] Os compostos fenólicos estão também presentes nas azeitonas e atuam como antioxidantes para a conservação da azeitona e azeite. Os mais abundantes são os secoiridóides, flavonóides, ligninas e fenóis “simples”, tais como o hidroxitirosol e o tirosol.^[17] Os secoiridóides mais comuns são a oleuropeína e ligustrosídeo.^[18] Outros derivados importantes são o 3,4-DHPEA-EA e HPEA-EA, que são derivados do ácido elenólico na forma aldeídica ligado ao hidroxitirosol e tirosol, respetivamente.

A oleuropeína, o principal componente da azeitona, que lhe confere um sabor amargo, foi “descoberto” por *Bouquelot* e *Vintilesco* (1908), e é definido como um éster do ácido elenólico e do hidroxitirosol.^{[17], [19], [20]}

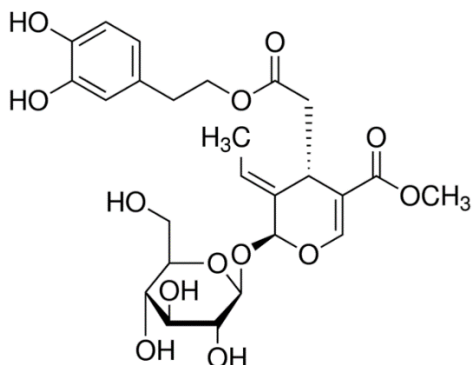


Figura 1.2 - Representação esquemática da oleuropeína.^[21]

Ao longo do processo de maturação da azeitona, as concentrações da oleuropeína e outros compostos conjugados diminuem e as concentrações de hidroxitirosol e tirosol aumentam.^{[16], [18]} Este composto fenólico complexo, quando hidrolisado, dá origem ao hidroxitirosol e ao oleosido-11-metil éster ou à glucose e oleuropeína aglicona.^[22]

O tirosol, com o nome *IUPAC* 4-(2-hidroxi-etil)fenol, representado na figura 1.3, está presente na azeitona e noutros derivados da oliveira.

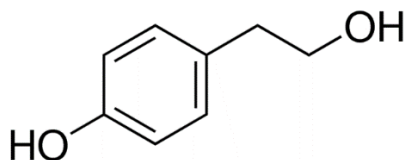


Figura 1.3 - Molécula de tirosol.^[23]

O hidroxitirosol, também conhecido como álcool 3,4-dihidroxifenilético (com o nome *IUPAC*: 4-(2-hidroxi-etil)benzeno-1,2-diol), representado na figura 1.4.

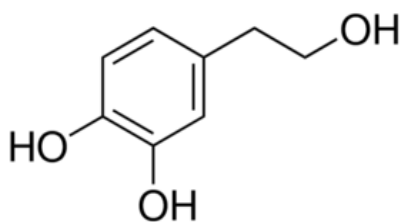


Figura 1.4 - Molécula de hidroxitirosol.^[24]

Este composto está presente abundantemente na azeitona e nas folhas da oliveira, pode aparecer na sua forma simples ou combinada. O hidroxitirosol apenas difere do tirosol num grupo hidroxilo adicional que está ligado ao anel fenólico. Este anel é responsável pela maior atividade antioxidante exercida pelo composto.^[25]

Para além do hidroxitirosol, o bagaço contém uma grande diversidade de polifenóis. Por exemplo num bagaço estudado por *Cioffi et al. (2010)*^[26], através da observação do cromatograma, verificou-se a presença de ácido gálico, tirosol, ácido cafeico, oleuropeína, ligustrosídeo aglicona, oleuropeína aglicona, ácido ferúlico e ácido vanílico. Já no artigo *Servili et al. (1999)*^[27], este bagaço apresentou na sua composição agliconas secoiridóides, como por exemplo, 3,4-DHPEA-EDA, forma dialdeídica do ácido elenólico ligado ao hidroxitirosol.

O bagaço de azeitona contém ainda \approx 2-3% de óleo não extraído^[28], açúcares, sais e ácidos orgânicos, nomeadamente grandes quantidades de ácido acético que foram identificadas em cromatografia gasosa por *headspace*.^[29]

Durante o processamento do azeite, a distribuição da quantidade de compostos fenólicos presente nos subprodutos e no azeite depende da sua solubilidade nestas duas fases. Devido à sua maior solubilidade em água e, conseqüentemente, nos subprodutos, apenas uma pequena porção dos polifenóis fica no azeite.

Em geral, e dependendo da variedade da azeitona, a concentração de fenóis no azeite está entre os 50 e 1000 $\mu\text{g/g}$ de azeite. Esta quantidade de compostos antioxidantes no azeite é apenas 1-2% dos antioxidantes que estão presentes na azeitona, o resto é “perdido” no bagaço (~45%) e nas águas ruças (53%), dependendo do sistema de extração.^[30]

1.3. Atividade biológica dos polifenóis do azeite

Através de vários estudos epidemiológicos chegou-se à conclusão de que existem diferenças geográficas na taxa de incidência das doenças cardiovasculares.^[31] Em comparação com outros países, os países do sul da Europa apresentam a menor taxa de incidência de doenças coronárias. A explicação encontrada e, com maior base de estudo, é a dieta mediterrânica, uma dieta rica em azeite (que contém a gordura monoinsaturada), legumes e frutas.^{[31]-[34]}

Em relação ao benefício do hidroxitirosol, presente no azeite, existem vários estudos científicos acerca da atividade biológica do composto, mas apenas um deles foi comprovado com estudos clínicos em seres humanos, como publicado por *M. I. Covas et al. (2006)*.^[35] Com base neste estudo, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*EFSA*)^[36], em 2011, reconheceu o benefício do hidroxitirosol em relação à prevenção da oxidação do colesterol LDL (*low-density lipoprotein*), conhecido como o “mau colesterol”, prevenindo a aterosclerose e outras doenças cardiovasculares:

- reduz o *stress* oxidativo;
- protege as células e o LDL dos danos oxidativos (atividade antioxidante).

O painel de especialistas da *EFSA* afirma que para sustentar esta reivindicação devem ser consumidos diariamente 5 mg de hidroxitirosol e derivados (oleuropeína e tirosol)/ 20 g de azeite.^[36]

Em muitos outros artigos, é demonstrado que, para além da atividade antioxidante, o hidroxitirosol possui propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas.

No artigo de *Bisignano et al. (1999)*^[37], o estudo *in-vitro* focou-se na capacidade (da oleuropeína e hidroxitirosol) de retardar ou inibir a taxa de crescimento de várias estirpes de bactérias, que causam infeções no trato respiratório ou intestinal. Também em *Furneri et al. (2004)*^[38] foi estudado o poder antimicrobiano do hidroxitirosol contra estirpes de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Em relação à atividade anti-inflamatória, recentemente *Gong et al. (2009)*^[39] comprovou os efeitos de um azeite, com 20% de hidroxitirosol, em ratos, que inibe o inchaço inflamatório e a hiperalgesia (sensibilidade exagerada à dor). Tanto os estudos em relação à atividade antimicrobiana como anti-inflamatória consideram que o hidroxitirosol pode ser um agente promissor no tratamento de infeções e inflamações, mas devido à falta de ensaios clínicos tais alegações não foram aprovadas pela *EFSA*.

Em *Bernini et al. (2013)*^[40] a atividade anticancerígena do hidroxitirosol foi estudada, como resultado da sua capacidade de inibir a proliferação celular, através da supressão da progressão e crescimento das células cancerígenas.^[40] Também no artigo *Fuggetta et al. (2012)*^[41] foi feito um estudo com vista à confirmação das propriedades antiproliferativas do hidroxitirosol e tirosol.^[41]

Em ambos os estudos^{[40], [41]}, os resultados sugerem que o hidroxitirosol possui propriedades quimiopreventivas promissoras. No entanto, nenhuma destas atividades foram realmente comprovadas, por falta de ensaios clínicos.

1.4. Zeyton Nutraceuticals: A implementação de um processo inovador

A empresa *Zeyton Nutraceuticals* tem como principal objetivo a produção e fornecimento de extratos naturais de alta qualidade, obtidos a partir do bagaço de azeitona. Estes extratos são ricos em hidroxitirosol, possuindo potenciais propriedades benéficas para o consumidor, de acordo com a alegação aceite pela *EFSA* em 2011 descrita na secção anterior. A empresa, desenvolveu e continua a desenvolver os seus processos patenteados, em colaboração com a *REQUIMTE* (especificamente com o grupo de investigação de Química Verde da Universidade Nova de Lisboa).^[42] A *Zeyton* patenteou um processo para a obtenção de um extrato natural

concentrado e rico em hidroxitirosol, através de resíduos e subprodutos da oliveira utilizando tecnologias limpas (US8066881).

Descrição do Processo

O processo está atualmente implementado num lagar de azeite na zona de Évora e utiliza parte dos equipamentos do lagar que devido à sazonalidade da produção de azeite, não são utilizados durante grande parte do ano (fevereiro a setembro). O primeiro passo do processo consiste na extração do bagaço de azeitona (resíduo semi-sólido obtido pelo processo de duas fases) com água. A fase aquosa, fase que contém o hidroxitirosol, depois de separada, é alimentada diretamente a uma unidade de nanofiltração. O passo de nanofiltração separa o hidroxitirosol e outros compostos bioativos, com baixo peso molecular, que são recuperados no permeado, dos compostos com um alto peso molecular, que ficam retidos na corrente do retentado. O permeado é enviado para uma unidade de osmose inversa.

A unidade de osmose inversa é utilizada para aumentar a concentração de hidroxitirosol no retentado, sendo o permeado (água) posteriormente reutilizada. A corrente rica em hidroxitirosol, é designada por “concentrado de osmose inversa (RO)”.^[10] Na figura 1.5, está esquematizado o processo de produção do RO.

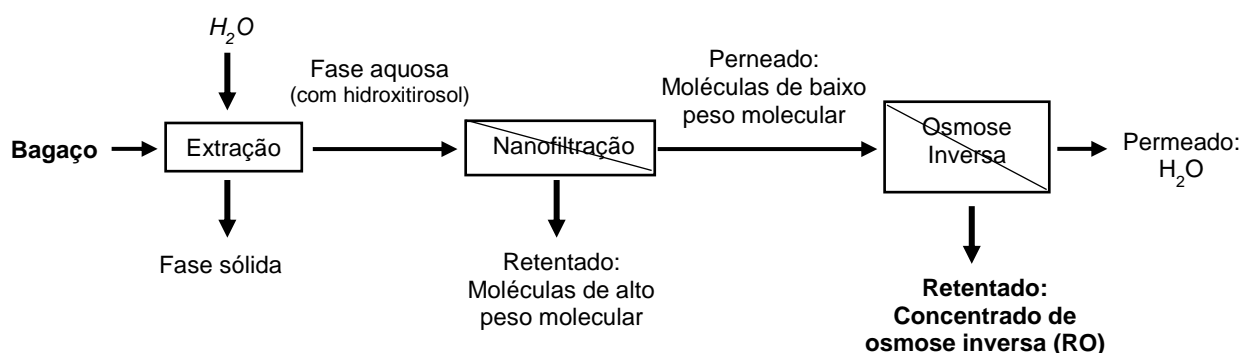


Figura 1.5 - Esquema resumo do processo de produção do concentrado de osmose inversa.^[10]

1.5. Composição do extrato desenvolvido pela Zeyton Nutraceuticals em hidroxitirosol (HT), tirosol (TY) e outros compostos

A qualidade do produto RO (retentado da osmose inversa) obtido pelo processo acima descrito, demonstrou ser muito dependente da qualidade do bagaço de azeitona e consequentemente da azeitona utilizada como matéria-prima, num estudo efetuado no âmbito de uma dissertação de mestrado realizada por *M. Romeu* (2016)^[29]. Nesse mesmo trabalho ficou demonstrado que os bagaços de azeitonas de campanhas afetadas por más condições climáticas e/ou fungos podem apresentar concentrações anormalmente baixas de hidroxitirosol. Para além da qualidade da azeitona, também o tempo de armazenamento do bagaço tem influência na sua concentração em hidroxitirosol. Concluiu-se que o armazenamento

em grandes depósitos ao ar livre submete o bagaço a uma série de transformações químicas, hidrólises e oxidações, frequentemente catalisadas por enzimas que aumentam a concentração de hidroxitirosol no bagaço. Outros estudos científicos chegaram a conclusões semelhantes, tendo mesmo sido demonstrado que a concentração de hidroxitirosol aumenta devido a uma diminuição na concentração de compostos como a oleuropeína e outros ésteres do hidroxitirosol. [43]–[45]

O processo de membranas implementado pela *Zeyton Nutraceuticals*, para além de efetuar uma separação com base no peso molecular dos compostos, utilizando uma membrana com massa molecular de corte de 200-400 Da, concentra o hidroxitirosol recuperado 10 vezes.

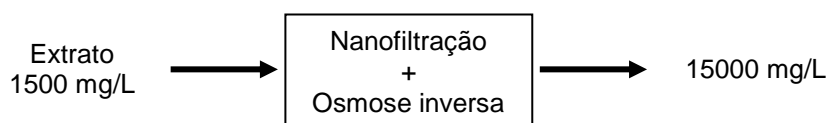


Figura 1.6 – Processos de concentração do hidroxitirosol

No entanto, este efeito de concentração é igualmente observado para outros compostos de baixo peso molecular existentes no extrato como sais, açúcares e ácidos orgânicos.

Na dissertação publicada por *M. Romeu (2016)*^[29], alguns compostos voláteis (por exemplo, o ácido acético e o 4-etilfenol) foram também detetados no produto final (extrato obtido pelo processo patenteado pela *Zeyton Nutraceuticals*). Através de análises de cromatografia gasosa por *headspace*, detetou-se a presença de compostos voláteis responsáveis pelos odores: ácido acético (avinagrado) e 4-etilfenol (avinhado). Concluiu-se que a presença destes compostos voláteis limita as potenciais aplicações do concentrado, quer seja na indústria alimentar como na indústria cosmética. De facto, sendo na sua maioria de baixo peso molecular, estes compostos não são eliminados durante o passo da nanofiltração, sendo mesmo, tal como o hidroxitirosol, concentrados no passo da osmose inversa (ao ponto de conferirem odores indesejáveis ao extrato). Por essa razão, no estudo efetuado por *M. Romeu (2016)*^[29] utilizou-se com sucesso um processo de adsorção numa resina polimérica para a purificação do RO.

1.6. Processos de purificação de extratos de azeitona

Uma vez que para além do extrato ser rico em hidroxitirosol, apresenta quantidades significativas de compostos não desejados, entre eles alguns compostos voláteis, existem vários métodos de purificação para a eliminação desses mesmos compostos ou purificação dos compostos fenólicos. Na literatura, existem vários métodos para a purificação do extrato ou tratamento de resíduos dos lagares, onde são utilizadas resinas poliméricas^{[11], [46], [47]}, carvões^{[48], [49]} e outros^[50].

É necessário ter em conta que a maioria dos estudos encontrados na literatura têm como objetivo o tratamento de águas ruças e não a purificação de um extrato natural. Em todo o caso, é possível avaliar a eficiência de alguns métodos e materiais explorados para a adsorção de fenóis. Por exemplo, no tratamento de águas, os carvões ativados são dos adsorventes mais utilizados, uma vez que adsorvem contaminantes indesejáveis. A remoção dos contaminantes através de carvões ativados resulta da interação das moléculas com os microporos e mesoporos que possuem dimensões semelhantes às das moléculas; mas a grande desvantagem do seu uso está associada com os grandes custos de regeneração.^{[46], [48]}

No artigo *García-Araya et al. (2003)*^[51], a adsorção em carvões ativados é utilizada para a remoção de fenóis de águas agroindustriais, como as resultantes da produção de azeite e vinhos, que, neste caso, provocam problemas nas unidades de tratamento de águas residuais. Neste artigo, concluiu-se que a adsorção é favorecida pelo pH, quando este se encontra entre 3 e 4, a temperatura não tem grande influência e a capacidade de adsorção do carvão ativado dependia diretamente da natureza do ácido fenólico.^[51] Também no artigo *Galiatsatou et al. (2002)*^[48], o objetivo da utilização dos carvões ativados é minimizar a quantidade de fenóis no resíduos dos lagares (“*olive mil waste water*”), ou seja, os fenóis ficam adsorvidos no carvão ativado.^[48] *Ena et al. (2012)*^[49] investiga a recuperação da fração fenólica dos resíduos dos lagares através de carvões ativados (*Azolla* e *GAC*); neste caso, ambos os carvões mostraram bons resultados para a adsorção e dessorção dos compostos fenólicos.

Mais recentemente, os adsorventes poliméricos surgiram como uma alternativa à adsorção em carvões ativados. No caso dos adsorventes poliméricos, a força das ligações entre o adsorvente e o adsorvato são mais fracas em comparação com o que acontece na adsorção com o carvão ativado. Desta forma, a sua limpeza/ regeneração é normalmente mais fácil.^{[46], [50]} Assim sendo, os compostos fenólicos podem ser recuperados de soluções aquosas através de adsorções moleculares ou de permuta iónica.^[11]

No artigo *Caetano et al. (2009)*^[46], são utilizadas resinas de permuta iónica aniónica forte, *Dowex XZ*, e de permuta iónica aniónica fraca, *AuRIX 100*, e ainda uma resina não iónica, *Macronet MN200*, para a remoção dos fenóis de águas residuais; no final é feita uma dessorção utilizando uma mistura de água/metanol. Das três resinas estudadas, a *AuRIX 100* foi aquela que mostrou melhores resultados na cinética de adsorção, ao passo que a resina não iónica, apresentou uma recuperação de 90% dos fenóis, no passo de dessorção. Também no artigo *Juang et al. (1999)*^[47] foi estudada a adsorção em resinas poliméricas (*XAD4*, *XAD7* e *XAD16*), de compostos fenólicos (mais especificamente 4-clorofenol e fenol) presentes em águas residuais.

Bertin et al. (2011)^[52] sugeriu a utilização de quatro resinas poliméricas: *XAD7*, *XAD16*, *IRA96* e *Isolute ENV+* para a recuperação de polifenóis presentes em dois tipos de águas ruças (*olive mil waste waters*, *OMWW*). Aquela que apresentou uma melhor adsorção em relação ao hidroxitirosol foi a resina *ENV+*, onde se observou uma adsorção entre 81-94%. Em relação ao passo de dessorção, também a resina *ENV+* mostrou melhores resultados, onde se recuperou

cerca de 77% do hidroxitirosol, quando utilizado como solvente de dessorção simplesmente o etanol.

No artigo de *Zagklis et al. (2015)*^[11] foram utilizadas resinas poliméricas não iônicas, XAD4, XAD7 e XAD16, para a recuperação de compostos fenólicos de baixo peso molecular presentes em *OMWW* e, simultaneamente, avaliar a sua separação dos hidratos de carbono. O extrato foi primeiramente filtrado e de seguida concentrado. Em processos *batch*, este produto foi depois posto em contacto com as três resinas poliméricas. Neste artigo, obteve-se uma melhor percentagem de adsorção para a resina XAD4, cerca de 75% para uma razão de 120 g de resina/L de concentrado. Já para a dessorção do produto, o solvente que apresentou uma maior percentagem de dessorção, cerca de 80%, e uma melhor separação de compostos fenólicos dos hidratos de carbono, foi o etanol. Finalmente, o produto foi concentrado através de uma evaporação, onde se obteve uma concentração final de hidroxitirosol de 84,8 g/L.

Mais recentemente, *Frasconi et al. (2016)*^[50] desenvolveu um processo contínuo de adsorção/dessorção para a recuperação de compostos fenólicos a partir de *OMWW*. Utilizou como agente adsorvente a resina XAD16 e uma coluna empacotada com 0.53 metros. O principal objetivo centrou-se na avaliação do desempenho da resina na adsorção e dessorção dos compostos fenólicos e no desenvolvimento de um modelo. A *OMWW* foi sujeita a um pré-tratamento (centrifugação e filtração), de modo a evitar a obstrução da coluna por parte dos sólidos em suspensão. Como solvente de dessorção é utilizado o etanol acidificado.^[50]

No caso do extrato desenvolvido pela empresa *Zeyton Nutraceuticals* (secção 1.2), na dissertação realizada por *M. Romeu (2016)*^[29], obtiveram-se bons resultados recorrendo à resina XAD4 para eliminação de odores indesejáveis (compostos voláteis) de um extrato natural de bagaço de azeitona para aplicação na indústria alimentar.

M. Romeu (2016)^[29] baseou-se no trabalho efetuado por *Zagklis et al. (2015)*^[11] efetuando algumas alterações como a quantidade de resina utilizada e tempos de adsorção e dessorção. O processo de adsorção provou uma elevada eficiência na separação do hidroxitirosol de outros compostos existentes no concentrado, principalmente compostos voláteis como o ácido acético, responsável pelo cheiro avinagrado.

1.7. Objetivo desta dissertação

No contexto da eliminação de compostos voláteis indesejáveis presentes no extrato rico em hidroxitirosol, desenvolvido pela *Zeyton Nutraceuticals*, o desafio proposto pela empresa e, que é o principal objetivo desta dissertação, consiste na otimização do processo de adsorção/dessorção, publicado por *M. Romeu*^[29] em 2016. Embora a eliminação do ácido acético tenha sido conseguida com sucesso, a percentagem de recuperação do hidroxitirosol foi muito baixa, o que impede a implementação do processo à escala industrial.

Bibliografía

- [1] "Neswletter March 2017," *International Olive Council*.
- [2] Gabinete de Planeamento e Políticas, "Olivicultura: Diagnóstico sectorial 2007," p. 52, 2007.
- [3] N. Kalogeropoulos, A. C. Kaliora, A. Artemiou, and I. Giogios, "Composition, volatile profiles and functional properties of virgin olive oils produced by two-phase vs three-phase centrifugal decanters," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 58, no. 1, pp. 272–279, 2014.
- [4] E. De Marco, M. Savarese, A. Paduano, and R. Sacchi, "Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters," *Food Chem.*, vol. 104, no. 2, pp. 858–867, 2007.
- [5] J. Fernández-Bolaños, G. Rodríguez, R. Rodríguez, R. Guillén, and A. Jiménez, "Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste," *Grasas y Aceites*, vol. 57, no. 1, pp. 95–106, 2006.
- [6] J. A. de la Casa, M. Lorite, J. Jiménez, and E. Castro, "Valorisation of wastewater from two-phase olive oil extraction in fired clay brick production," *J. Hazard. Mater.*, vol. 169, no. 1–3, pp. 271–278, 2009.
- [7] H. K. Obied, D. R. Bedgood, P. D. Prenzler, and K. Robards, "Effect of processing conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive mill waste," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 11, pp. 3925–3932, 2008.
- [8] L. M. Nieto, G. Hodaifa, S. R. Vives, and J. A. G. Casares, "Industrial Plant for Olive Mill Wastewater from Two-Phase Treatment by Chemical Oxidation," *J. Environ. Eng.*, vol. 136, no. November, pp. 1309–1313, 2010.
- [9] I. Leouifoudi, H. Harnafi, and A. Zyad, "Olive Mill Waste Extracts: Polyphenols Content, Antioxidant, and Antimicrobial Activities," *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2015.
- [10] M. N. Da Ponte, J. L. Dos Santos, A. A. Matias, A. V. Nunes, C. M. Duarte, and J. P. Crespo, "US 8066881 B2," 2011.
- [11] D. P. Zagklis, A. I. Vavouraki, M. E. Kornaros, and C. A. Paraskeva, "Purification of olive mill wastewater phenols through membrane filtration and resin adsorption/desorption," *J. Hazard. Mater.*, vol. 285, pp. 69–76, 2015.
- [12] S. Takaç and A. Karakaya, "Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater," *Recent Patents Chem. Eng.*, vol. 2, pp. 230–237, 2009.
- [13] M. Savarese, E. De Marco, S. Falco, I. D'Antuoni, and R. Sacchi, "Biophenol extracts from olive oil mill wastewaters by membrane separation and adsorption resin," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 11, pp. 2386–2395, 2016.
- [14] B. Aliakbarian, D. Palmieri, A. A. Casazza, D. Palombo, and P. Perego, "Antioxidant activity and biological evaluation of olive pomace extract," *Nat. Prod. Res. Former. Nat. Prod. Lett.*, vol. 26, no. 24, pp. 2280–2290, 2012.
- [15] G. Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, "Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats—a proteomics and network analysis approach," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 56, no. 7, pp. 1137–1147, 2012.
- [16] G. Boskou, "Antioxidant Capacity and Phenolic Profile of Table Olives from the Greek Market," *Food Chem.*, vol. 94, pp. 558–564, 2006.
- [17] G. Purcaro, R. Codony, L. Pizzale, C. Mariani, and L. Conte, "Evaluation of total hydroxytyrosol and tyrosol in extra virgin olive oils," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 116, no. 7, pp. 805–811, 2014.
- [18] S. Charoenprasert and A. Mitchell, "Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, pp. 7081–7095, 2012.
- [19] M. J. Amiot, A. Fleuriet, and J. J. Macheix, "Importance and Evolution of Phenolic

- Compounds in Olive during Growth and Maturation," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 34, no. 5, pp. 823–826, 1986.
- [20] E. Tripoli, M. Giammanco, G. Tabacchi, D. Di Majo, S. Giammanco, and M. La Guardia, "The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health," *Nutr. Res. Rev.*, vol. 18, pp. 98–112, 2005.
- [21] Sigma-Aldrich, "Oleuropeína." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/12247>. [Accessed: 15-Sep-2014].
- [22] C. Manna *et al.*, "Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 15, no. 8, pp. 461–466, 2004.
- [23] Sigma-Aldrich, "Tirosol." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/24hydroxyphenylethanol1381650194011?lang=pt®ion=PT>. [Accessed: 01-Sep-2017].
- [24] Sigma-Aldrich, "Hidroxitirosol." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h4291?lang=pt®ion=PT>. [Accessed: 15-Sep-2017].
- [25] R. Di Benedetto *et al.*, "Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness," *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 17, pp. 535–545, 2007.
- [26] G. Cioffi, M. S. Pesca, P. De Caprariis, A. Braca, L. Severino, and N. De Tommasi, "Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity," *Food Chem.*, vol. 121, no. 1, pp. 105–111, 2010.
- [27] M. Servili, M. Baldioli, R. Selvaggini, E. Miniati, A. Macchioni, and G. Montedoro, "High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D- and 2D-nuclear magnetic resonance characterization," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 76, no. 7, pp. 873–882, 1999.
- [28] S. M. Cardoso, S. Guyot, N. Marnet, J. A. Lopes-da-Silva, C. M. G. C. Renard, and M. A. Coimbra, "Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 85, no. 1, pp. 21–32, 2005.
- [29] M. Romeu, "Desenvolvimento de alimentos funcionais enriquecidos em polifenóis de azeitona," Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, 2016.
- [30] P. S. Rodis, V. T. Karathanos, and A. Mantzavinou, "Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 3, pp. 596–601, 2002.
- [31] A. Mente, L. de Koning, H. Shannon, and S. Anand, "A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease.," *Arch Intern Med*, vol. 169, no. 7, pp. 659–689, 2009.
- [32] R. M. Valls *et al.*, "Effects of functional olive oil enriched with its own phenolic compounds on endothelial function in hypertensive patients. A randomised controlled trial," *Food Chem.*, vol. 167, pp. 30–35, 2015.
- [33] A. S. Dontas, N. S. Zerefos, D. B. Panagiotakos, C. Vlachou, and D. A. Valis, "Mediterranean diet and prevention of coronary heart disease in the elderly.," *Clin. Interv. Aging*, vol. 2, no. 1, pp. 109–15, 2007.
- [34] A. H. Rahmani, A. S. Albutti, and S. M. Aly, "Therapeutics role of olive fruits/oil in the prevention of diseases via modulation of anti-oxidant, anti-tumour and genetic activity," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 7, no. 4, pp. 799–808, 2014.
- [35] M.-I. Covas *et al.*, "The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors: A randomized trial," *Ann. Intern. Med.*, vol. 145, pp. 333–341, 2006.
- [36] EFSA, "Polyphenols in olive related health claims," *EFSA J.*, vol. 9, no. 4, pp. 1–25, 2011.
- [37] G. Bisignano, A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Crisafi, N. Uccella, and A. Saija, "On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol.," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 51, pp. 971–974, 1999.
- [38] P. M. Furneri, A. Piperno, A. Saija, and G. Bisignano, "Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 12, pp. 4892–4894, 2004.
- [39] D. Cruz-Vega *et al.*, "Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza radix and its

- bioactive compounds," *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, vol. 22, no. April 2008, pp. 557–559, 2009.
- [40] R. Bernini, N. Merendino, A. Romani, and F. Velotti, "Naturally Occurring Hydroxytyrosol: Synthesis and Anticancer Potential," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 5, pp. 655–670, 2013.
- [41] M. P. Fuggetta, A. Cottarelli, G. Lanzilli, M. Tricarico, and R. Bernini, "In Vitro Antitumor Activity of Olive Oil Tyrosol and Hydroxytyrosol and their Methyl Carbonate Derivatives Maria," *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.*, vol. 6, no. 2, pp. 25–30, 2012.
- [42] "Zeyton Nutraceuticals." [Online]. Available: <http://dev.impactwave.com/sites/ritarivotti/teste5/pt/>.
- [43] M. Feki, N. Allouche, M. Bouaziz, A. Gargoubi, and S. Sayadi, "Effect of storage of olive mill wastewaters on hydroxytyrosol concentration," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 108, no. 12, pp. 1021–1027, 2006.
- [44] P. Sánchez Moral and M. V. Ruiz Méndez, "Production of pomace olive oil," *Grasas y Aceites*, vol. 57, no. 1, pp. 47–55, 2006.
- [45] D. Ryan, H. Lawrence, P. D. Prenzler, M. Antolovich, and K. Robards, "Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea*," *Anal. Chim. Acta*, vol. 445, no. 1, pp. 67–77, 2001.
- [46] M. Caetano, C. Valderrama, A. Farran, and J. L. Cortina, "Phenol removal from aqueous solution by adsorption and ion exchange mechanisms onto polymeric resins," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 338, no. 2, pp. 402–409, 2009.
- [47] R. Juang, J. Shiau, and H. Shao, "Effect of Temperature on Equilibrium Adsorption of Phenols onto Nonionic Polymeric Resins," vol. 34, no. 9, pp. 1819–1831, 1999.
- [48] P. Galiatsatou, M. Metaxas, D. Arapoglou, and V. Kasselouri-Rigopoulou, "Treatment of olive mill waste water with activated carbons from agricultural by-products," *Waste Manag.*, vol. 22, no. 7, pp. 803–812, 2002.
- [49] A. Ena, C. Pintucci, and P. Carozzi, "The recovery of polyphenols from olive mill waste using two adsorbing vegetable matrices," *J. Biotechnol.*, vol. 157, no. 4, pp. 573–577, 2012.
- [50] D. Frascari, A. E. M. Bacca, F. Zama, L. Bertin, F. Fava, and D. Pinelli, "Olive mill wastewater valorisation through phenolic compounds adsorption in a continuous flow column," *Chem. Eng. J.*, vol. 283, pp. 293–303, 2016.
- [51] J. F. García-Araya, F. J. Beltrán, P. Álvarez, and F. J. Masa, "Activated carbon adsorption of some phenolic compounds present in agroindustrial wastewater," *Adsorption*, vol. 9, no. 2, pp. 107–115, 2003.
- [52] L. Bertin, F. Ferri, A. Scoma, L. Marchetti, and F. Fava, "Recovery of high added value natural polyphenols from actual olive mill wastewater through solid phase extraction," *Chem. Eng. J.*, vol. 171, no. 3, pp. 1287–1293, 2011.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Concentrados de osmose inversa (RO)

A matéria-prima utilizada ao longo deste trabalho foi o concentrado de osmose inversa (RO), especificamente o concentrado com o código RO 164, com uma concentração em hidroxitirosol de $\approx 12\ 000$ mg/L, fornecida pela empresa AZAL – Azeites do Alentejo, com sede em Redondo, Évora.

O RO foi produzido utilizando o processo patenteado (*US 8066881 B2*), descrito na secção 1.4..

Foram fornecidos vários RO, com datas de produção diferentes. Estes foram armazenados em bidões de plástico, à temperatura ambiente (5-30°C). A tabela 2.1, apresenta o volume e data de receção dos mesmos.

Tabela 2.1 - Concentrados de osmose inversa e respetiva data de entrega e volume.

Amostras	Data de entrega	Volume recebido (L)
RO6	Sem informação	Sem informação
RO 8	16/10/2015	Sem informação
RO 161	27/04/2016	20
RO 162	27/05/2016	80
RO 163	17/06/2016	60
RO 164	14/07/2016	60
RO 165	05/12/2016	0,5
RO 166	05/12/2016	0,5
RO 167	05/12/2016	0,5
RO 168	05/12/2016	0,5

2.1.2. Resina polimérica não iónica XAD4

A resina utilizada neste trabalho é a resina XAD4 da marca *Alfa Aesar*, esta é uma resina adsorvente polimérica não iónica, onde a matriz é o poliestireno e o agente reticulante o divinilbenzeno, que adsorve e “dessorve” espécies iónicas tendo em conta interações polares e hidrofóbicas.^[1]

As propriedades de adsorção devem-se à estrutura macroreticular, natureza aromática e boa área de superfície da resina. Uma das suas grandes vantagens é o facto de poder ser “reutilizada”. Para tal necessita de uma lavagem com um solvente, podendo este ser um solvente orgânico miscível em água (acetona, metanol, etanol, etc.).

A tabela 2.2 apresenta as propriedades da resina, fornecidas pelo fabricante na ficha do produto.

Tabela 2.2 - Propriedades da resina XAD4^{[2], [3]}.

Matriz	Resina polimérica macro-reticulada
Aspeto físico	Esferas brancas translúcidas
Tamanho da partícula (mm)	0,49-0,69
Área de superfície (m²/g)	≥ 750
Porosidade ⁽¹⁾ (mL/mL)	≥ 0,50
Densidade relativa	1,01 – 1,03

(1) Valores contratuais

2.1.3. Reagentes, solventes e padrões

A tabela 2.3 apresenta os reagentes, solventes e padrões, utilizados ao longo deste trabalho, bem como os respectivos CAS, grau de pureza e marca.

Tabela 2.3 - Reagentes, solventes e padrões.

Reagente/ solvente/ padrão	CAS	Grau de pureza (%)	Marca
Acetona	67-64-1	≥ 99,8	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ácido acético glacial	200-580-7	100	<i>Merck</i>
Ácido Gálico	149-91-7	99	<i>Alfa Aesar</i>
Ácido Sulfúrico	7664-93-9	95-97	<i>Fluka</i>
Árgon	7440-44-0	-	<i>Norit</i>
Carbonato de Sódio	497-19-8	99,5	<i>Alfa Aesar</i>
D(+)-glucose	50-99-7	99,5	<i>Sigma-Aldrich</i>
Etanol	64-17-5	96	<i>Carlo Erba</i>
Fenol	108-95-2	99	<i>Sigma-Aldrich</i>
Hidroxitirosol	10597-60-1	≥ 98	<i>ExtraSynthese</i>
Metanol	67-56-1	≥ 99,9	<i>Carlo Erba</i>
Reagente Folin-Ciocalteu	-	-	<i>Sigma- Aldrich</i>
Resina XAD4	37350-42-0	-	<i>Alfa Aesar</i>
Tirosol	501-94-0	98	<i>Sigma-Aldrich</i>

2.2. Métodos

2.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (TY) livres contabiliza apenas as moléculas de HT e TY que não se encontram ligadas a outras moléculas.

A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (HT e TY) das várias amostras utilizando os equipamentos *Thermo Finnigan Surveyor HPLC System* e *Agilent Infinity 1100* com os softwares *Chemstation OpenLAB*, respectivamente. A coluna usada foi uma coluna *Waters Novapak C18* (150 x 3,9 mm). A temperatura da coluna foi mantida a 25°C. A fase móvel consistiu de um sistema binário usando 10% metanol e 2% ácido acético, em água ultra-pura Tipo I. As amostras foram corridas com um caudal de 0,5 mL/min, durante 15 minutos. A detecção

e quantificação foram realizadas a um comprimento de onda de 280 nm. A curva de calibração foi analisada no início da corrida.

Foram preparadas soluções padrão de hidroxitirosol e tirosol com diferentes concentrações e determinaram-se as respectivas áreas de picos. De seguida, foram realizadas as retas de calibração das concentrações (mg/L) em função das áreas dos picos (UA).

No anexo A estão apresentadas as tabelas com as áreas dos picos (tabelas 5.1 e 5.2) e as respectivas retas de calibração (figuras 5.1 e 5.2).

Finalmente, através do cromatograma (figura 5.3), foram determinados os tempos de retenção dos dois padrões. O hidroxitirosol possui um tempo de retenção \approx 3 minutos, que corresponde ao pico mais intenso, e o tirosol com um tempo de retenção \approx 4.6 minutos.

As equações das retas de calibração foram utilizadas para calcular as concentrações de hidroxitirosol/ tirosol nas amostras

2.2.2. Cromatografia gasosa (GC)

As análises foram realizadas num sistema GC/MS, que consiste num cromatógrafo gasoso *Bruker GC 456* acoplado a um espectrofotómetro de massa *Scion TQ*. O injetor automático utilizado foi *CTC Analysis autosampler CombiPAL*, os dados foram obtidos com *MSWS 8.2 Bruker* e analisados com *Bruker MS Data Review 8.0*. O injetor no modo *splitless* foi operado a 260°C durante 3 minutos. Para algumas amostras, a separação foi realizada em duas colunas *ZB-WAX PLUS* (60 m x 0,32 x, 1 μ m di) ligada a uma coluna *ZB-5 MS* (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m film di), para outras, foi utilizada uma coluna *ZB-WAX PLUS* (60 m x 0,32 x, 1 μ m di) ligada a uma coluna *ZB-5 MS* (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m di). A temperatura inicial do forno foi de 40°C durante 5 minutos, seguida de um aquecimento até 240°C a uma taxa de 4°C/min, permanecendo nesta temperatura durante 15 minutos. O gás de corrida utilizado foi hélio com um fluxo constante de 1,70 mL/min.

A temperatura da linha de transferência foi de 240°C, enquanto que a temperatura da fonte foi 220°C. Os iões foram analisados a 40-450 u.

2.2.3. Quantificação de fenóis totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita através do método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, adaptado do protocolo microescala descrito por *Waterhouse et al. (2002)*.^[4]

De uma maneira simplificada, o método de *Folin-Ciocalteu* é um método colorimétrico, que permite a quantificação de fenóis totais, utilizando o ácido gálico como padrão de referência. O reagente *Folin-Ciocalteu* não possui na sua composição quaisquer fenóis. Em vez disso, o

reagente reage com os fenóis e substâncias redutoras não fenólicas que formam cromógenos que são detetados no espectrofotômetro. O aparecimento da cor azul deve-se à transferência de elétrons onde se dá a redução do ácido complexo fosfomolibdico/ fosfotúngstico.^[5]

Para a construção da reta de calibração foram utilizadas soluções com concentrações de 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L de ácido gálico, utilizando uma solução padrão. A solução padrão, com uma concentração de 5 g/L, foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de ácido gálico em 10 mL de etanol, num balão volumétrico de 100 mL, onde se fez o restante volume com água destilada.

Para um *vial*, foram pipetados 20 µL da amostra/ soluções de ácido gálico/ branco, adicionaram-se 1,58 mL de água destilada e 100 µL de reagente *Folin-Ciocalteu*. Agitou-se a solução e deixou-se incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida, foram adicionados 300 µL de uma solução de carbonato de sódio com concentração de 0,2 g/L e agitou-se novamente. Incubou-se a mistura num banho de água quente a 40°C, durante 30 minutos. Por fim, foi medida a absorvância (a 750 nm) num espectrofotômetro (*Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer*). A concentração das amostras foi determinada através da reta de calibração do ácido gálico, em mg/L GAE (*Gallic Acid Equivalent*).

Primeiramente, foi necessário determinar as retas de calibração para três solventes diferentes: água, mistura de solventes biocompatíveis à base de água e etanol. Com esse intuito, foram preparadas soluções com diferentes concentrações de ácido gálico e medidas as respetivas absorvâncias. As unidades de concentração são apresentadas em mg/L GAE (*Gallic Acid Equivalent*).

No anexo C estão apresentados os gráficos das retas de calibração (figuras 5.4, 5.5 e 5.6)) e respetivas tabelas (tabelas 5.4, 5.5 e 5.6).

2.2.4. Quantificação de hidratos de carbono

De todos os métodos colorimétricos utilizados para a quantificação de hidratos de carbono, o método do Fenol-ácido sulfúrico é mais simples de ser reproduzido.

O método do Fenol-ácido sulfúrico, conhecido simplesmente pelo método Fenol-sulfúrico, foi adaptado de um protocolo modificado de *Masuko et al. (2004)*.^[6]

A quantificação de hidratos de carbono é feita com base na reta de calibração, e a concentração é expressa em g/L glucose equivalente. Para a construção da reta de calibração, foi preparada uma solução padrão de D(+)-glucose mono-hidratada com uma concentração de 1 g/L. Esta solução foi preparada adicionando 0,1 g da D(+)-glucose num balão volumétrico de 100 mL, onde se fez o volume com água destilada. Através desta solução padrão, foram então preparadas soluções com concentrações de 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,65, 0,085 e 0.1 g/L.

Para um tubo de ensaio, foram pipetados 500 µL da amostra/ soluções de D(+)-glucose, de seguida foram adicionados 1,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e 300 µL de uma solução aquosa 5% (m/v) de fenol. A solução foi agitada durante 5 segundos num vórtex (*Vortex Mixer Labnet*) e incubada no banho seco quente (*Accu Block™ Digital Dry Bath*) a 90°C, durante 5 minutos. Para finalizar a reação, a solução foi agitada novamente e colocada num banho de água durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

As absorvâncias das amostras/ soluções de D(+)-glucose foram medidas a 490 nm no espectrofotómetro (*Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer*).

A reta de calibração determinada está apresentada no Anexo E, na figura 5.18, e a respetiva tabela na tabela 5.24. Através da equação linear obtida na reta de calibração, foram calculadas as concentrações de HC nas amostras de “dessorvidos evaporados” dos vários processos.

2.2.5. Desodorização do concentrado de osmose inversa utilizando uma resina de adsorção (Resina XAD4)

Este processo foi adaptado do artigo *Zagklis et al. (2015)*.^[7] Resumidamente, o processo de desodorização inicia-se com a adsorção do concentrado RO 164 na resina XAD4, com agitação orbital num shaker (*JP Selecta Rotatorm*) ou numa placa de agitação (*Stuart RB 172*), à temperatura ambiente. De seguida efetua-se a separação da resina do concentrado não adsorvido denominado por NADS (não adsorvido) através de uma filtração a vácuo.

A dessorção é realizada primeiramente utilizando água para a separação dos hidratos de carbono. Esta dessorção é realizada com agitação orbital num shaker ou numa placa de agitação. A separação da resina do efluente dessorvido com água denominado por DSS H₂O (dessorvido com água) é efetuada recorrendo a uma filtração a vácuo.

Finalmente, a última dessorção é efetuada recorrendo a uma mistura de solventes biocompatíveis à base de água. De seguida, efetua-se a separação do produto final, denominado por DSS não evap. (dessorvido não evaporado). No final do processo o produto é concentrado 17 vezes num evaporador rotativo (*Heidolph* ou *IKA*).

Foram feitos vários ensaios em escalas diferentes: escala laboratorial, laboratorial alargada e, por fim, um aumento de escala (*scale up*).

Nos ensaios realizados em escala piloto (*scale up*), os passos do processo são realizados dentro de um bidão, onde é introduzido um filtro “fechado” com a resina XAD4. O bidão é carregado com a solução pretendida, conforme o passo do processo a iniciar. A agitação é levada a cabo por um *orbital shaker*. Por fim, para retirar o efluente, basta abrir a torneira e descarregar.

Com o objetivo de otimizar o processo foram feitas alterações em vários parâmetros do processo: tempo, razão resina/ RO 164 e no tipo de agitação (agitação magnética ou agitação no *orbital shaker*), com vista à otimização do processo. Na tabela 2.4, apresentam-se os vários parâmetros estudados.

Tabela 2.4 - Parâmetros alterados ao longo do processo.

Parâmetros/ Passos do processo	Razão Resina/RO ou solvente	Tempo
Adsorção	1:1	10 min; 30 min; 1 h; 2 h; 3 h;
	1:2	4 h; 6 h; 8 h; 16 h
Dessorção com H ₂ O	1:1	10 min; 30 min; 1 h; 2 h; 3 h
Dessorção	1:3	10 min; 30 min; 1 h; 2 h; 3 h;
	1:5	4 h; 6 h; 8h; 16 h; 24 h; 48 h

No final, amostras do “não adsorvido” (NADS), “dessorvido com água” (DSS H₂O), “dessorvido não evaporado” (DSS não evap.) e “dessorvido evaporado” (DSS evap.) são analisadas por *HPLC* para quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (TY) livres (ver secção 2.2.1.).

De modo a determinar o pH ao longo do processo, foram medidos os pHs de todos os efluentes do processo, incluindo a alimentação (RO 164).

As amostras do “dessorvido evaporado” foram também analisadas por cromatografia gasosa (GC) para a determinação da percentagem de eliminação de compostos voláteis, através das áreas dos picos (ver secção 2.2.2.).

O processo de desodorização é seguido de uma regeneração da resina para a sua posterior reutilização. A lavagem é primeiramente feita com etanol e, por fim, uma lavagem com água. Todos estes passos da lavagem são feitos com uma razão resina/ solvente de 1:3, durante 1/2 horas à temperatura ambiente e com agitação num *orbital shaker*/ placa de agitação.

Bibliografia

- [1] Sigma-Aldrich, “Resina XAD-4.” [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/xad4?lang=pt®ion=PT>. [Accessed: 15-Sep-2017].
- [2] R. and Haas, “Resina XAD4.” [Online]. Available: <http://www.lenntech.com/Data-sheets/Amberlite-XAD4-L.pdf>.
- [3] Sigma-Aldrich, “Resina XAD4,” *Product information*. [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/xad4pis.pdf. [Accessed: 10-Sep-2017].
- [4] A. L. Waterhouse, “Determination of Total Phenolics,” *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*, p. 11.1.1.-11.1.8, 2002.
- [5] Sigma-Aldrich, “Folin-Ciocalteu’ s phenol reagent,” *Product information*. .
- [6] T. Masuko, A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S. I. Nishimura, and Y. C. Lee, “Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format,” *Anal. Biochem.*, vol. 339, no. 1, pp. 69–72, 2005.
- [7] D. P. Zagklis, A. I. Vavouraki, M. E. Kornaros, and C. A. Paraskeva, “Purification of olive mill wastewater phenols through membrane filtration and resin adsorption/desorption,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 285, no. November 2014, pp. 69–76, 2015.

3. Apresentação e discussão de resultados

3.1. Composição dos extratos em hidroxitirosol e tirosol e avaliação da estabilidade do concentrado de osmose inversa (RO)

Os concentrados de osmose inversa (RO), referenciados na secção 2.1.1., utilizados ao longo deste trabalho, foram produzidos e cedidos pela empresa AZAL.

As concentrações de hidroxitirosol e tirosol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método de HPLC está descrito na secção 2.2.1.

Na tabela 3.1 estão apresentadas as concentrações do hidroxitirosol e tirosol, de vários concentrados de osmose inversa.

Tabela 3.1 - Amostras e respectivas concentrações de hidroxitirosol e tirosol.

Amostras	Hidroxitirosol (mg/L)	Tirosol (mg/L)
RO6	4300	950
RO 8	2200	550
RO 161	9800	1450
RO 162	6000	1000
RO 163	9200	1950
RO 164	12000	2000
RO 165	12000	1900
RO 166	16000	2400
RO 167	16500	2050
RO 168	15000	2250

Como foi referido na secção da introdução, a variação dos vários RO relativamente à sua concentração em hidroxitirosol (HT) e tirosol (TY) deve-se a diferenças na matéria-prima utilizada.

Como os RO são provenientes de um extrato natural, estão sujeitos a vários fatores (alterações climáticas, pragas e doenças das oliveiras) que acabam por influenciar a composição das azeitonas e, conseqüentemente, a do concentrado de osmose inversa.

Sabe-se, por exemplo, que a concentração de hidroxitirosol no RO 8 foi baixa uma vez que as azeitonas desta colheita foram atacadas por uma praga da mosca-da-oliveira. Nestas condições, o hidroxitirosol atua através da sua atividade antioxidante, para proteger o fruto. Assim sendo, ao longo do tempo a concentração do hidroxitirosol presente na azeitona vai

diminuindo, o que resultou numa matéria-prima com menor concentração em hidroxitirosol e, conseqüentemente, num RO com uma concentração de apenas 2200 mg/L.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade dos RO seguiu-se a concentração de HT e TY para o RO 164 ao longo de 7 meses de realização desta dissertação (a partir do 7^o mês de estudo e até ao 14^o). Os resultados obtidos em conjunto com resultados obtidos anteriormente estão apresentados na figura 3.1.

Na figura 3.1 pode observa-se a concentração de hidroxitirosol e tirosol ao longo do tempo para o mesmo RO.

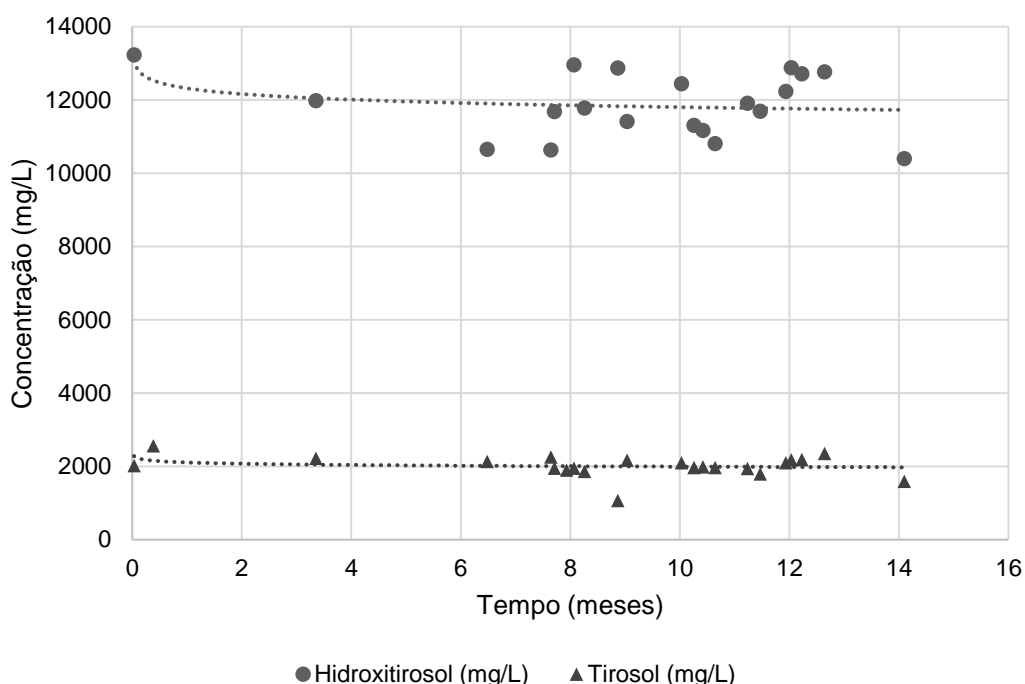


Figura 3.1 - Estabilidade do RO 164 ao longo do tempo. O RO foi armazenado à temperatura ambiente, em bidões de plásticos.

Como se pode observar, quando foi recebido o RO 164 apresentava uma concentração em hidroxitirosol (HT) de 13233 mg/L e 2028 mg/L em tirosol (TY).

No anexo B, na tabela 5.3, estão apresentados os valores para as concentrações de HT e TY ao longo do tempo.

Verificou-se que ambas as concentrações se mantêm bastante estáveis ao longo dos 14 meses estudados. É também de notar uma maior dispersão nos valores obtidos para o HT do que para o TY, com variância de 11,4 % para o HT.

Como se pode verificar, a tendência das concentrações do HT e TY é a sua estabilização nos 12000 mg/L e 2000 mg/L, respetivamente.

Numa tentativa de desenvolver um método que permitisse avaliar a qualidade do produto de forma rápida, efetuou-se um estudo com o objetivo de correlacionar a concentração de HT e TY com a quantificação em fenóis totais. Esta quantificação pode ser realizada por um método colorimétrico rápido, o método de *Folin-Ciocalteu*^{[1], [2]}, como descrito na secção dos 2.2.3..

Para os vários RO produzidos pela AZAL e analisados por HPLC relativamente ao seu conteúdo em HT e TY (tabela 3.1), efetuou-se o método de *Folin-Ciocalteu* para determinação dos fenóis totais de acordo com o método discutido na secção 2.2.3..

Na figura 3.2, estão representados os valores relativos à concentração de HT para os vários RO em função dos valores obtidos para os fenóis totais.

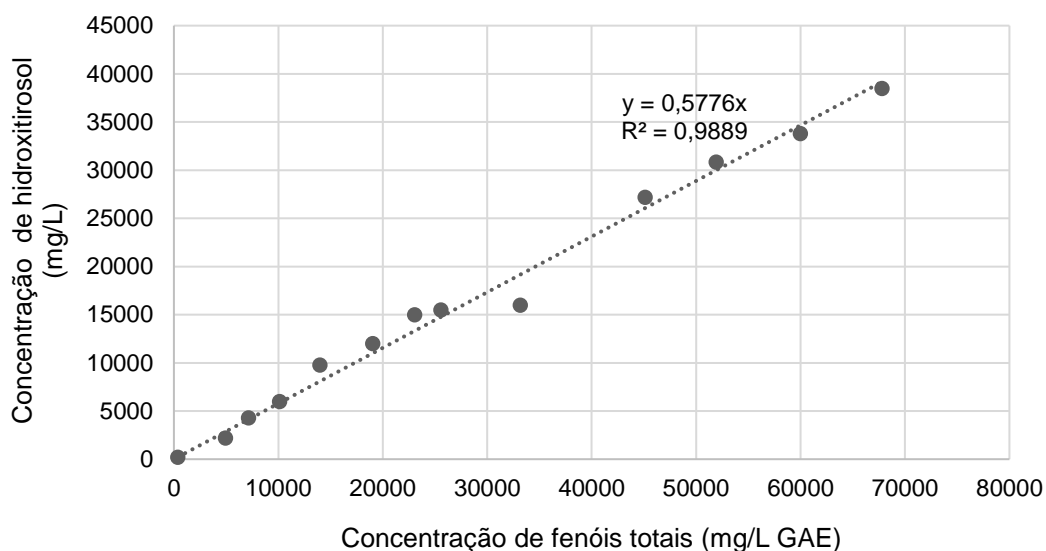


Figura 3.2 - Correlação entre as concentrações de fenóis totais e de hidroxitirosol para os RO.

É possível observar que a relação entre a concentração de HT e os fenóis totais é linear para o intervalo de concentrações estudadas.

Ao aplicar a regressão linear simples obtém-se a equação da reta:

$$y = 0,5776x, \quad \text{com } R^2=0,9889$$

Esta relação entre a concentração de HT e fenóis totais foi determinada pela primeira vez e pode ser utilizada para avaliar a eficiência do processo recorrendo a um método simples.

No anexo C está apresentada a tabela 5.7, onde estão os valores das amostras utilizadas para a correlação, a absorvância medida, a concentração de fenóis totais e as concentrações de hidroxitirosol e tirosol.

De forma análoga, foi determinada uma correlação entre a concentração de tirosol e de fenóis totais, apresentada na figura 3.3.

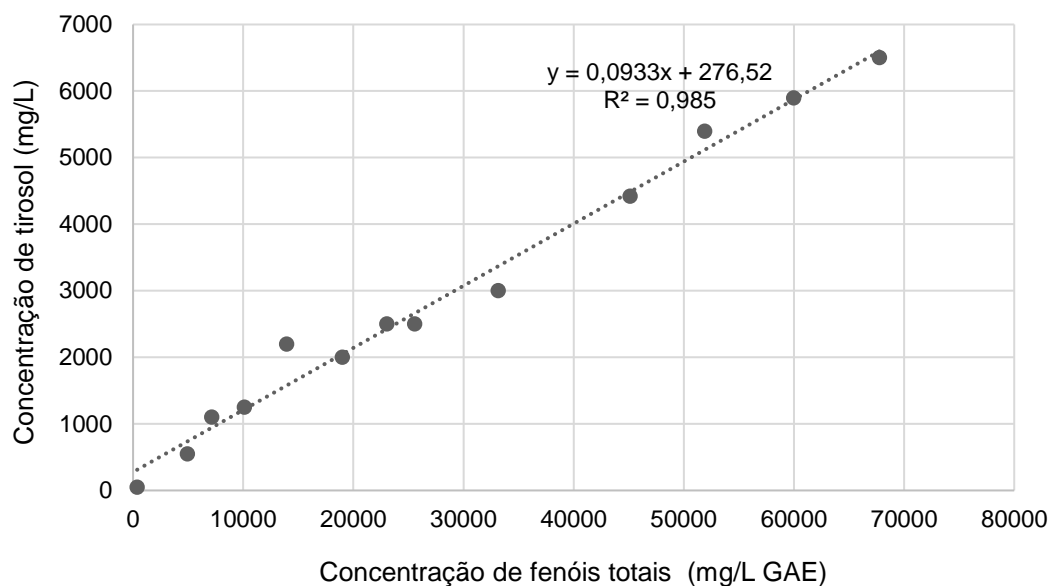


Figura 3.3 - Correlação entre as concentrações de fenóis totais e de tirosol para os RO.

Mais uma vez, é possível observar uma relação linear entre a concentração de TY e fenóis totais. Aplicando uma regressão linear obtém-se a equação da reta:

$$y = 0,0933x + 276,52, \quad \text{com } R^2=0,985$$

Pela necessidade de obter resultados mais rápidos também para o processo de adsorção, foi estudada uma nova correlação para avaliar a qualidade dos extratos dessorvidos

Foram utilizados produtos dessorvidos não evaporados, resultantes de vários processos de adsorção/dessorção, onde já tinham sido determinadas as concentrações de HT e TY (por HPLC). Mais uma vez, utilizando a reta de calibração, mas desta feita para mistura de solventes biocompatíveis à base de água, foram determinadas as concentrações de fenóis totais para as amostras de dessorvidos não evaporados.

No anexo C, tabela 5.8, estão exibidas as amostras utilizadas, respectivas absorvâncias medidas e as concentrações de fenóis totais, hidroxitirosol e tirosol.

Na figura 3.4, estão representados os valores relativos à concentração de HT para os vários dessorvidos em função dos valores determinados para os fenóis totais.

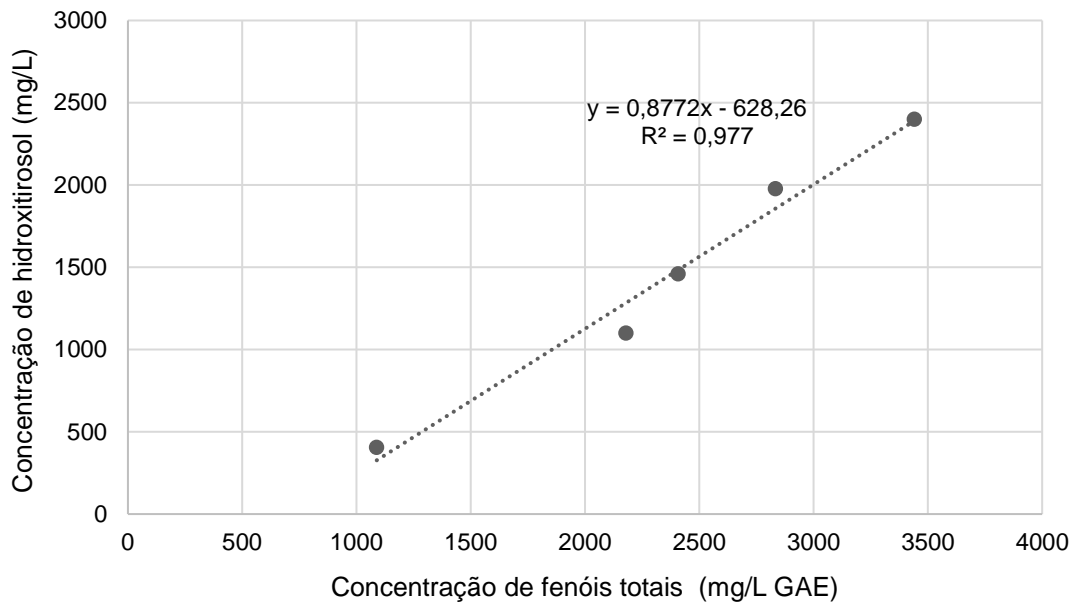


Figura 3.4 - Correlação entre as concentrações de fenóis totais e de hidroxitirosol para dessorvidos não evaporados (mistura de solventes biocompatíveis à base de água).

Como se pode verificar pela figura anterior, neste caso foram poucos os dessorvidos não evaporados analisados e, por essa razão, deve efetuar-se mais experiências para avaliar esta correlação, principalmente para dessorvidos com [HT] < 1000 mg/L.

De qualquer forma, ao aplicar-se uma regressão linear obteve-se a equação:

$$y = 0,8772x - 628,26, \quad \text{com } R^2=0,977$$

Da forma análoga, foi efetuado o mesmo estudo para a concentração de fenóis totais e a concentração de tirosol, apresentada na figura 3.5.

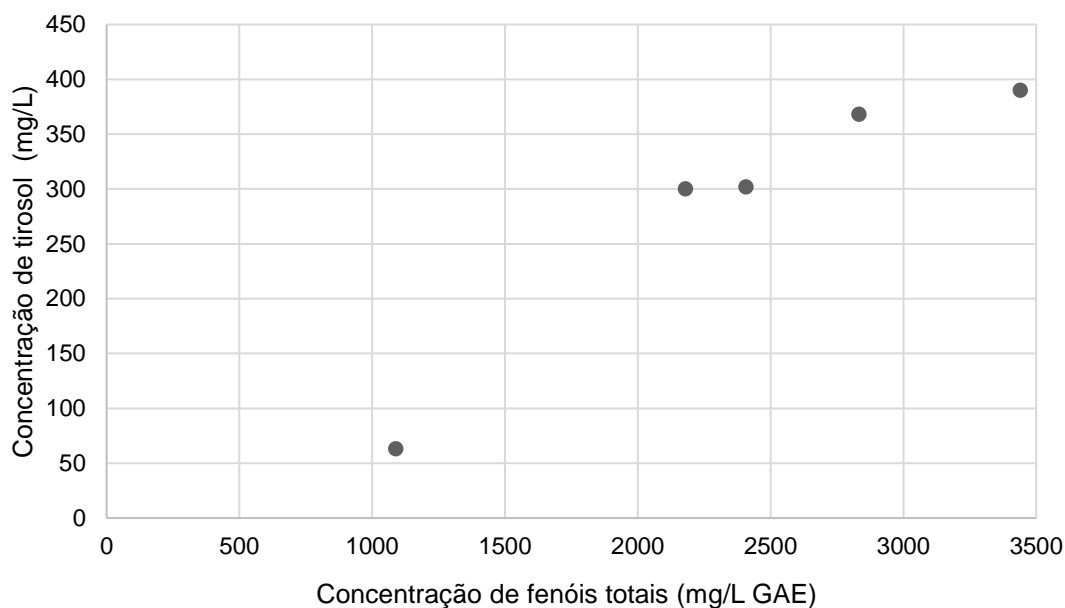


Figura 3.5 - Correlação entre as concentrações de fenóis totais e de tirosol para dessorvidos não evaporados (mistura de solventes biocompatíveis à base de água).

Neste caso é bastante óbvio que para extratos dessorvidos não evaporados não é possível delinear nenhuma tendência para a determinação da concentração de tirosol através da concentração de fenóis totais.

No final de cada processo de desodorização a resina é regenerada utilizando o etanol como solvente de limpeza. Neste caso, foi também desenvolvida uma reta de calibração.

Uma vez que o hidroxitirosol e tirosol não são os compostos fenólicos maioritários nestas soluções etanólicas, verificou-se que não havia uma relação linear entre a concentração do hidroxitirosol e/ou tirosol e a concentração dos fenóis totais. Deste modo, não foi possível desenvolver uma correlação viável entre as duas concentrações.

De modo a contornar este problema, decidiu-se seguir apenas o comportamento dos fenóis totais ao longo da limpeza da resina. Uma vez que o objetivo é regenerar a resina, sabe-se que quanto menor a quantidade de fenóis totais presentes na solução, menor será a quantidade de hidroxitirosol e tirosol, que é o objetivo deste passo de limpeza.

3.2. Otimização do processo de desodorização do concentrado de osmose inversa

Com o objetivo de eliminar defeitos do produto, devidos à existência de compostos voláteis, procedeu-se, na sequência de um estudo anterior, à otimização do processo de adsorção. Efetuaram-se estudos a diferentes escalas: piloto, laboratoriais alargadas e laboratoriais.

As condições de operação utilizadas em cada um dos processos realizados ao longo deste trabalho estão apresentadas no Anexo D1, nas tabelas 5.9-5.11.

Uma vez que se trata de um estudo de otimização, as condições de operação (tempo de operação, razão resina/ RO ou solvente, escala e tipo de agitação) foram variadas de processo para processo.

Inicialmente, o tipo de agitação não seria um parâmetro em estudo, mas por motivos de avaria do *orbital shaker* foi necessário utilizar outro tipo de agitação, a agitação magnética. Com este contratempo aproveitou para se estudar também a influência do tipo de agitação utilizada no processo. Todos os ensaios foram realizados tendo em conta a descrição do processo referida na secção 2.2.5..

Para além disto, a razão resina/ H₂O utilizada na dessorção com água foi alterada de 1:1 para 1:3. Esta decisão foi tomada com o intuito de aumentar a limpeza dos hidratos de carbono e compostos voláteis. Mais à frente, é também possível verificar que o aumento desta razão não aumentou significativamente a perda de hidroxitirosol e tirosol neste passo.

3.2.1. Ensaio realizado à escala piloto

Na tabela 3.2 estão apresentadas as condições de operação utilizadas nos vários passos do processo, para o primeiro ensaio realizado à escala piloto. Neste ensaio foram utilizados 5,5 kg de resina XAD4.

Tabela 3.2 - Condições de operação utilizadas no ensaio à escala piloto (scale-up).

Passos/ Condições	Adsorção (com RO)	Dessorção com água	Dessorção com mistura de solventes biocompatíveis
Razão mássica Resina/ RO ou solvente	1:1	1:1	1:1
Tempo (horas)	Overnight (~16 h)	3 h	Overnight (~16 h)
Temperatura (°C)	Ambiente		

Na figura 3.6, apresenta-se um exemplo da montagem utilizada neste tipo de processo, o *scale-up*.



Figura 3.6 - Montagem do processo batch em escala alargada (*scale up*).

Na tabela 3.3, podem ver-se os valores calculados da massa de hidroxitirosol presente em cada um dos efluentes no *scale up*.

Tabela 3.3 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo.

	Alimentação (RO 164)	Não adsorvido	Dessorvido com H₂O	Dessorvido com mistura de solventes biocompatíveis	Dessorvido desodorizado
Volume (L)	5,5	5,5	5	5	0,33
[Hidroxitirosol] (g/L)	9,8	1	0,5	1,7	29
Hidroxitirosol (g)	53,9	5,4	2,6	8,4	9,4

De seguida, na figura 3.7, apresenta-se o esquema do balanço de massas (em g) do hidroxitirosol ao longo do processo.

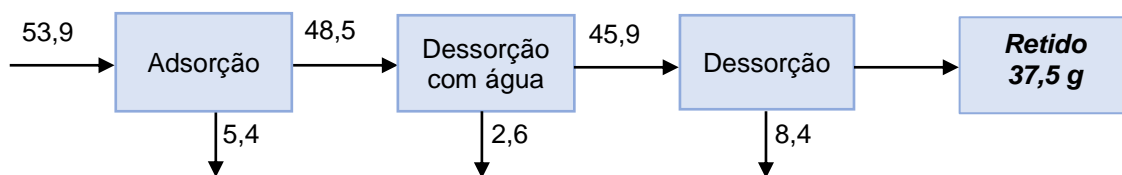


Figura 3.7 - Representação esquemática do balanço mássico ao hidroxitirosol no ensaio realizado à escala piloto.

Como é possível verificar, tanto no passo de adsorção como no de dessorção com água, as perdas de hidroxitirosol não são muito significativas. A quantidade de hidroxitirosol que ficou retido na resina XAD4 é a maior causa para a baixa recuperação de hidroxitirosol.

A partir do balanço de massas, apresentado anteriormente, é possível calcular a percentagem mássica de hidroxitirosol de cada um dos passos do processo. Esses resultados estão apresentados na figura 3.8.

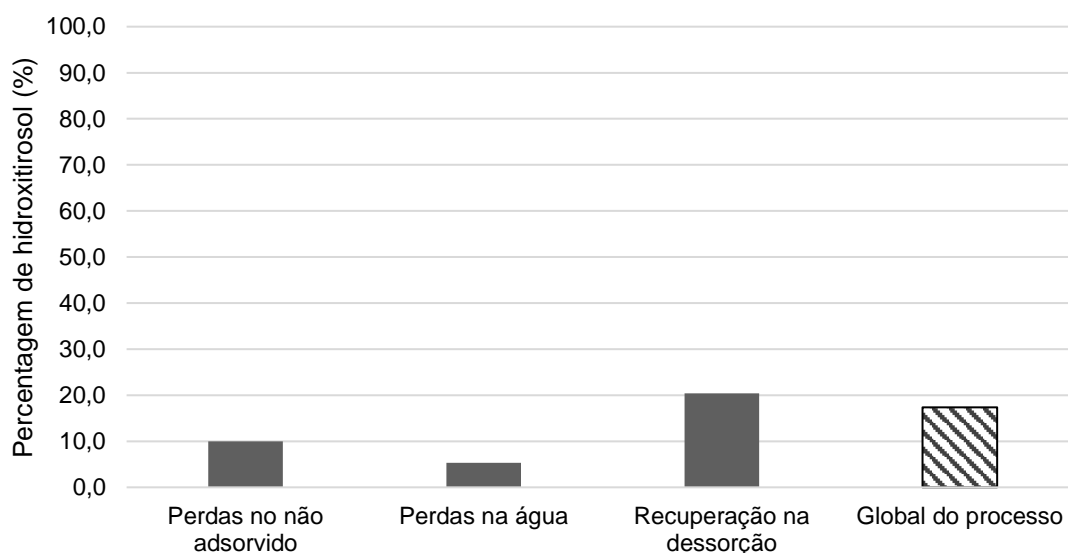


Figura 3.8 - Percentagem (%) de hidroxitirosol obtidas ao longo do processo e a % global do processo.

Como se pode observar, no efluente “não adsorvido” são perdidos apenas 10% do hidroxitirosol presente no concentrado de osmose inversa, ou seja, a percentagem adsorvida de hidroxitirosol é cerca de 90%. No passo de dessorção com água, são perdidos apenas 5% do hidroxitirosol, o que mostra que a maioria do hidroxitirosol continua adsorvido na resina, para ser dessorvido no passo seguinte.

A percentagem de hidroxitirosol obtida no passo de dessorção foi de apenas 21% da quantidade adsorvido na resina, ou seja, a maior parte do hidroxitirosol continuou adsorvido na resina. Os resultados obtidos mostram que é este último passo que necessita de ser otimizado para que se possa aumentar a recuperação de HT.

3.2.2. Passo de adsorção

Os vários processos *batch* foram realizados em diferentes escalas: laboratoriais (30 g), laboratoriais alargadas (300-500 g) e piloto (6000 g). Os ensaios efetuados estão apresentados na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Percentagem de hidroxitirosol adsorvido.

Escala (g)	Tempo	Razão resina/ RO	% HT Adsorvida	
			Agitação mag.	Orbital Shaker
30	8 h	1:1	86%	-
30	16 h		88%	-
250		1:2	69%	-
300		1:1	75%; 84%	91%
500			84%	-
6000			-	90%

As condições estudadas no passo de adsorção foram: escala (massa de resina utilizada), tempo de adsorção, razão resina/ RO e tipo de agitação. Através dos resultados apresentados na tabela, é possível concluir que o aumento de escala não tem influência significativa na adsorção do hidroxitirosol, com agitação magnética. O mesmo se verifica na utilização do *orbital shaker*.

Na escala de 30 g de resina, com a utilização de agitação magnética em ambos os ensaios, variando o parâmetro de tempo (8h e 16h), verifica-se que a percentagem adsorvida é praticamente semelhante. Neste caso, pode concluir-se que as 8 horas de adsorção são suficientes.

Para verificar se era possível obter uma maior percentagem de adsorção foi realizada uma adsorção com uma à razão resina/ RO de 1:2. Verificou-se uma diminuição da percentagem adsorvida, cerca de 69%. Uma explicação para a menor percentagem obtida na adsorção, pode ser uma regeneração menos eficiente da resina.

Por fim, pode ser feita uma comparação entre os dois tipos de agitação. Na escala 300 g de resina, verifica-se que neste passo o *orbital shaker* obteve melhores percentagens de hidroxitirosol adsorvido, 91%. Para além das menores percentagens obtidas através da agitação magnética, esta possui a desvantagem da utilização do agitador, uma barra magnética que garante a agitação através de um campo magnético rotativo, em contacto direto com a resina o que, a longo prazo, provoca a degradação da resina.

3.2.3. Passo de dessorção com água

Na tabela 3.5, tem-se a percentagem (%) de perdas de hidroxitirosol no efluente “dessorvido com água”.

Tabela 3.5 - Percentagens de perdas do hidroxitirosol no dessorvido com água.

Razão Resina/H ₂ O	Escala (g)						
	30	300			500	6000	
1:1	-	-	-	-	-	-	5.4%*
1:3	22%	12%*	18%	17%	18%	24%	-
1:5	22%	-	-	-	-	-	-

*realizados em *orbital shaker*

No passo de dessorção com água, apenas foram variadas as razões resina/água e escalas utilizadas.

É possível verificar que não existe qualquer vantagem quando se aumenta a quantidade de água, ou seja, quando se aumenta a razão resina/ água para 1:5. As quantidades de hidroxitirosol dessorvidas pela água em ambas as razões utilizadas é idêntica, tendo as duas uma percentagem de 22%. Neste caso, decidi continuar-se o estudo apenas com a razão de 1:3.

Mais uma vez, o aumento de escala, ou seja, o aumento da quantidade de resina utilizada, não influencia significativamente as perdas de hidroxitirosol, nos processos que utilizam a agitação magnética. Para além disto, é possível concluir que a utilização do *orbital shaker* diminui as perdas de hidroxitirosol na água.

3.2.4. Passo de dessorção com mistura de solventes biocompatíveis

Na tabela 3.6, apresenta-se a percentagem (%) calculada de hidroxitirosol no efluente “dessorvido não evaporado”, ou seja, no produto.

Tabela 3.6 - Percentagem de hidroxitirosol recuperado.

Escala (g de resina)	Razão Resina/ mistura solventes biocompatíveis			
	1:1	1:3		1:5
30	-	-		71%
300	-	69%*	80%	75%
500	-	80%		-
6000	20%*	-		-

* realizados em *orbital shaker*

Finalmente, no passo de dessorção do produto, variou-se a razão resina/ mistura de solventes biocompatíveis à base de água, mantendo todos os outros parâmetros nas mesmas condições.

Neste caso fez-se uma comparação entre processos de diferentes escalas, uma vez que anteriormente se concluiu que o aumento de escala não tem influência no processo. Deste modo, é possível verificar que há uma grande diferença nas percentagens de hidroxitirosol dessorvido, quando são utilizadas as razões 1:1 e 1:3. Fazendo a comparação entre os processos realizados com agitação em *orbital shaker*, verifica-se um grande aumento da percentagem de hidroxitirosol dessorvido com o aumento da quantidade da razão resina/ mistura de solventes biocompatíveis à base de água. Com uma razão de 1:1 obteve-se apenas 20% de hidroxitirosol no efluente, ao passo que com uma razão de 1:3, aumentou-se a percentagem de recuperação para 69%.

Ainda em relação à razão, não há qualquer vantagem em continuar a aumentar a quantidade de solvente, uma vez que com razão 1:5, se obteve percentagens da mesma ordem da razão 1:3.

Neste passo de dessorção, e ao contrário do concluído nos outros dois passos, a agitação magnética mostra-se mais eficaz na dessorção comparativamente com o *orbital shaker*.

Em relação ao estudo das diferentes razões razão resina/ mistura de solventes biocompatíveis à base de água, verifica-se que a mais vantajosa é a razão 1:3.

Tendo em conta esta última conclusão, o estudo apresentado na tabela 3.7, foi executado para dessorções com razão 1:3, em que se estudou a influência do tempo.

Tabela 3.7 - Percentagem de hidroxitirosol recuperado utilizando a razão 1:3 para diferentes tempos.

Razão 1:3	Tempo			
	8 horas	Overnight (~16h)		48 h
Escala (g)				
30	89%	-		-
300	-	69%*	80%	75%
500	-	77%		67%

* realizado em *orbital shaker*

Através dos resultados obtidos é possível afirmar que para os três tempos estudados se obtiveram percentagens de hidroxitirosol dessorvido muito semelhantes (os erros de análises de HPLC podem justificar a pequena variação observada nas percentagens calculadas).

No artigo *Zagklis et al. (2015)*^[3], um dos objetivos do uso da resina polimérica XAD4 foi também separar os hidratos de carbono do extrato. De modo a determinar a quantidade de hidratos de carbono (HC) presentes no RO (utilizado neste trabalho) e consequente produto, foi essencial encontrar um método de quantificação de hidratos de carbono.

O método utilizado foi o método Fenol-sulfúrico, que está descrito em pormenor na secção 2.2.4..

Na figura 3.9, estão apresentadas as concentrações de HC em vários produtos desodorizados (dessorvidos evaporados).

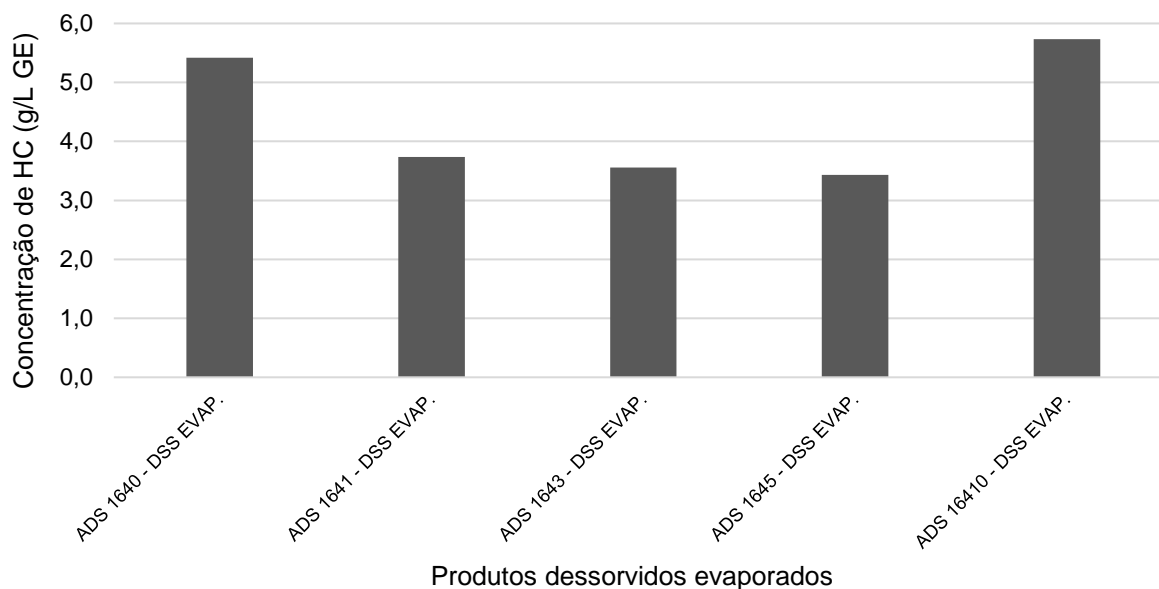


Figura 3.9 - Concentração de hidratos de carbono em produtos desodorizados.

De forma a perceber se as mudanças nos parâmetros operacionais influenciavam a quantidade de hidratos de carbono obtida no produto, foram comparadas as concentrações de vários produtos desodorizados.

Como se pode observar na figura anterior, as desodorizações que apresentam uma menor quantidade de hidratos de carbono no produto são a “ADS 1643” e a “ADS 1645”. Como as suas condições de operação são muito diferentes não é possível retirar uma conclusão plausível.

Comparando dois processos, “ADS 1640” e “ADS 1645”, onde o tipo de agitação é o único parâmetro diferente, observa-se que a concentração de hidratos de carbono presente nos dois produtos é ligeiramente diferente.

O processo “ADS 1645” foi realizado com agitação magnética, enquanto que no “ADS 1640” foi utilizado o *orbital shaker*. Neste caso, pode afirmar-se que a agitação pode influenciar, por exemplo, na dessorção dos hidratos de carbono com água.

A agitação magnética sendo mais “turbulenta”, pode ter provocado a dessorção dos hidratos de carbono para o efluente “dessorvido com água”. De modo a perceber o comportamento dos hidratos de carbono ao longo de um processo, esse estudo será apresentado na secção 3.4..

De todos os processos presentes no gráfico, o “ADS 1643” é aquele que teve um menor tempo de adsorção e dessorção, ao contrário do “ADS 16410” (que teve maiores tempos). Comparando um com outro, verifica-se que o tempo de adsorção e dessorção, influenciam a quantidade de hidratos de carbono presentes no final do processo, isto é, no produto final.

Também no Anexo E, tabela 5.25, estão apresentadas as concentrações de hidratos de carbono calculadas de várias amostras obtidas ao longo deste trabalho.

3.2.5. Condições otimizadas

Por fim, e de modo a dar um exemplo de um processo otimizado, apresentam-se os resultados obtidos do processo “ADS 1644”. As suas condições de operação estão apresentadas no Anexo D1, nas tabelas 5.9, 5.10 e 5.11.

Na tabela 3.8., estão apresentados os valores calculados da massa de hidroxitirosol presente em cada um dos efluentes no processo “ADS 1644”.

Tabela 3.8 - Massa de hidroxitirosol calculada para todos os efluentes do processo ADS1644.

	Alimentação (RO 164)	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido com mistura de solventes biocompatíveis
Volume (mL)	300	-	900	900
[Hidroxitirosol] (mg/L)	12000	2950	550	2000
Hidroxitirosol (mg)	3600	900	500	1800
% Hidroxitirosol	-	25%	19%	82%

De seguida, na figura 3.10. está representado o balanço de massas (em mg) do hidroxitirosol ao longo do processo e respetivas percentagens calculadas.

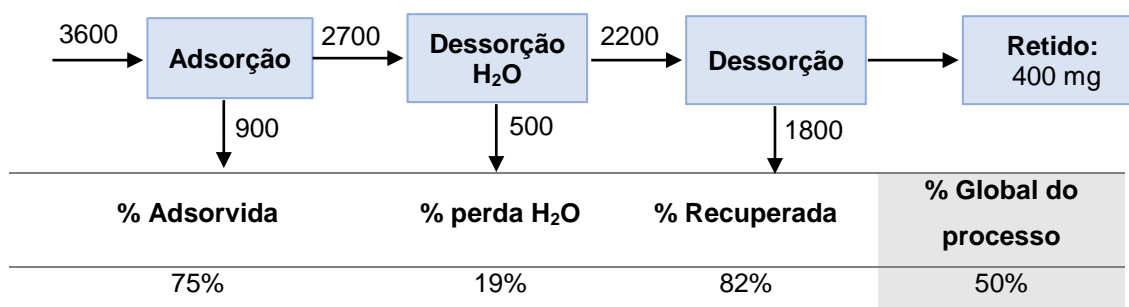


Figura 3.10 - Balanço mássico ao hidroxitirosol nos efluentes do processo.

Como é possível observar, apesar da recuperação de 80% do hidroxitirosol no produto, efluente “dessorvido não evaporado”, a percentagem global do processo é de apenas 50%. Este facto explica-se pelas perdas ao longo do processo, que apesar de serem pequenas em cada um dos passos, acabam por ter um impacto significativo no cálculo da percentagem global. Deste modo, pode pôr-se a hipótese da realização de uma segunda dessorção da resina.

Na figura 3.11, pode ser observado o aspeto visual dos três efluentes resultantes do processo de adsorção/dessorção e o produto desodorizado.

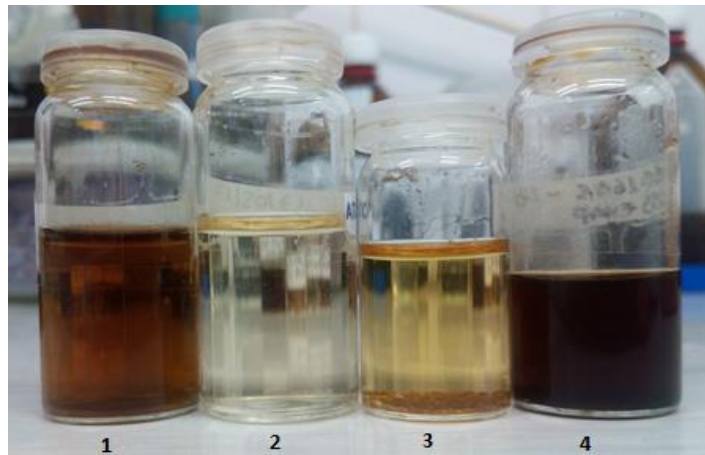


Figura 3.11 - Efluentes do processo: 1- não adsorvido; 2-dessorvido com água; 3- dessorvido não evaporado; 4- dessorvido evaporado.

Neste processo de adsorção/dessorção “ADS 1644”, após a evaporação do efluente 3, obteve-se um produto desodorizado (efluente 4) com uma concentração de 28783 mg/L.

Na tabela 3.9 apresentam-se as concentrações dos efluentes “dessorvidos não evaporados” após serem evaporados de diversos processos.

Tabela 3.9 – Concentração do hidroxitirosol nos dessorvidos evaporados de vários processos.

	[Hidroxitirosol] (mg/L)
ADS 1640 DSS EVAP	19999
ADS 1641 DSS EVAP	20575
ADS 1642 DSS EVAP	32150
ADS 1643 DSS EVAP	22146
ADS 1644 DSS EVAP	28783
ADS 1645 DSS EVAP	26502
ADS 16410 48 h DSS EVAP	40015

No anexo D2, apresentam-se os balanços mássicos (tabelas 5.12-5.18) e respectivos esquemas (5.7- 5.13) de todos outros processos realizados ao longo deste trabalho.

Em particular, no processo “ADS16410” foram efetuadas três dessorções do produto, utilizando sempre solvente “limpo”. A percentagem global calculada do processo foi de 68%, tendo ficado retido na resina apenas cerca de 3% do hidroxitirosol, ou seja, a restante percentagem é relativa às perdas nos efluentes “não adsorvido” e “dessorvido com água”.

Se apenas tivesse sido realizada uma dessorção, a percentagem global seria de apenas 48%, ou seja, com mais duas dessorções houve um aumento de 20% na quantidade de

hidroxitirosol recuperado. Uma vez que a realização de mais duas dessorções, para o aumento do rendimento do processo, acarreta custos, é necessário perceber se é viável ou não a realização destes novos passos de dessorção.

3.2.6. Eficácia da desodorização

Depois do processo completamente finalizado, é importante perceber se se alcançou o objetivo pretendido: a eliminação dos compostos voláteis no produto desodorizado. Para este efeito, recorreu-se à cromatografia gasosa, descrita em pormenor na secção 2.2.2..

Todos os produtos desodorizados foram enviados para cromatografia gasosa, de onde resultaram muitos cromatogramas; de seguida apresentam-se apenas, a título de exemplo, as percentagens de eliminação e cromatogramas do processo "ADS1644".

É de notar que os tempos de retenção dos compostos voláteis em estudo são:

- Ácido acético – 37 minutos;
- Ácido butanóico – 42/43 minutos;
- Creosol – 52 minutos;
- 4-Etilfenol – 58 minutos.

Na figura 3.12, apresenta-se o cromatograma da alimentação do processo, o concentrado de osmose inversa RO 164.

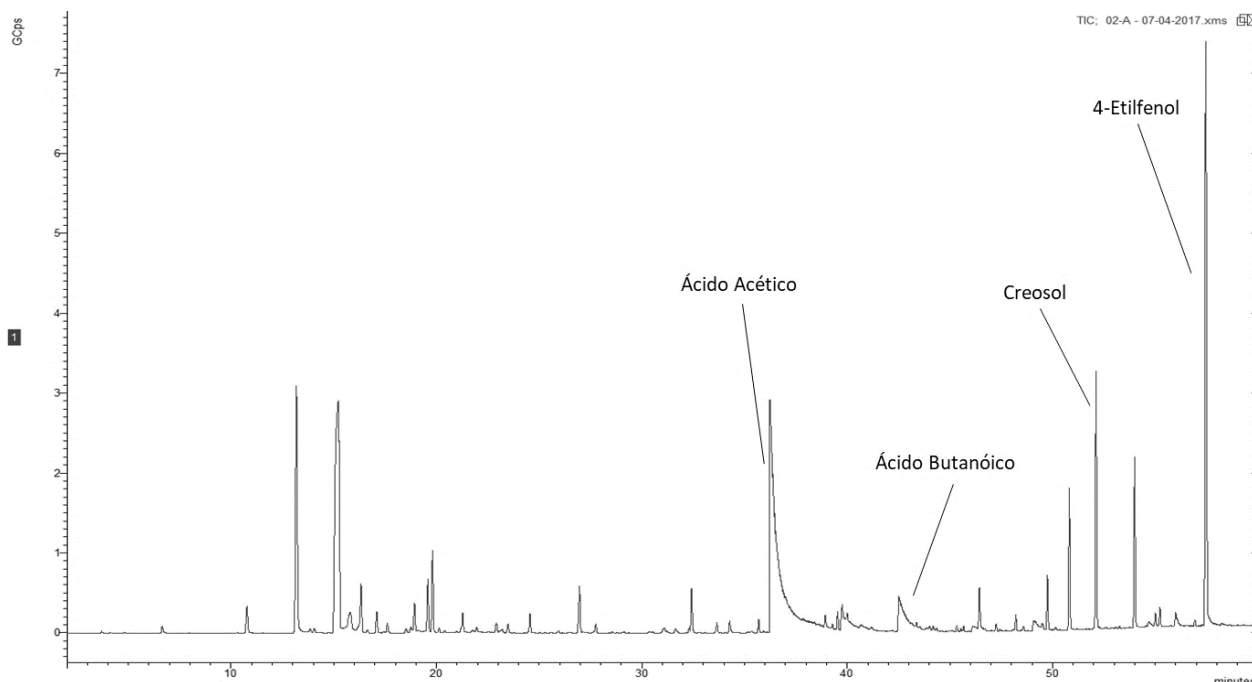


Figura 3.12 - Cromatograma do RO 164.

Como se pode verificar, os picos mais intensos (ácido acético e 4-etilfenol) correspondem exatamente aos compostos que conferem o defeito ao produto. Também o creosol apresenta um

pico intenso, responsável por um odor a alcatrão, mas que não foi detetado nos testes organoléticos.

Nas figuras 3.13 e 3.14 apresentam-se os cromatogramas dos efluentes “não adsorvido” (NADS) e “dessorvido com água” (DSS H₂O), respetivamente.

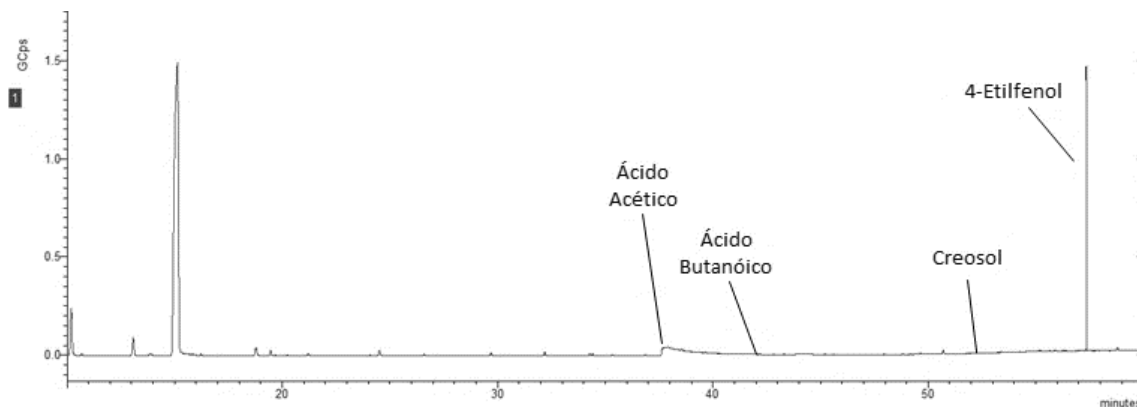


Figura 3.13 - Cromatograma do efluente NADS.

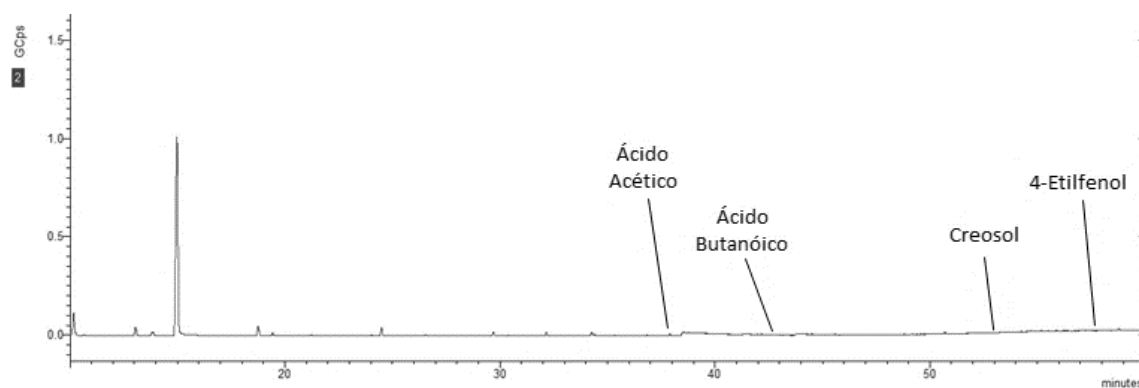


Figura 3.14 - Cromatograma do efluente DSS H₂O.

Como é possível verificar, em nenhum dos efluentes está presente o ácido acético. Seria expectável a presença de ácido acético no efluente “dessorvido com água” devido à sua solubilidade em água.

Por outro lado, o 4-etilfenol encontra-se presente no efluente “não adsorvido”. No entanto, comparando a solubilidade do hidroxitirosol (5 mg/100 mL) com o 4-etilfenol (0.5 mg/100 mL) e, uma vez que a quantidade de hidroxitirosol presente no efluente não é significativa, seria de esperar que não houvesse também a presença de 4-etilfenol.

Na figura 3.15, apresenta-se o cromatograma do produto desodorizado, ou seja, do produto dessorvido já evaporado.

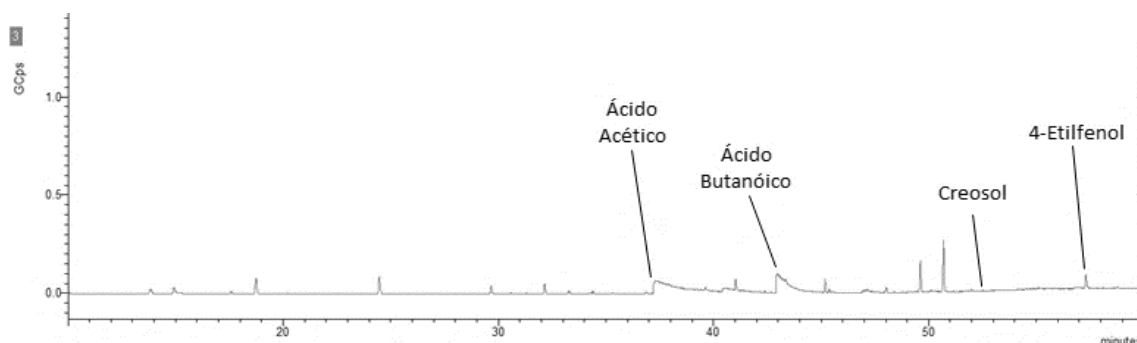


Figura 3.15 - Cromatograma do produto desodorizado (DSS evap).

Comparando a figura 3.12 e a figura 3.15, pode observar-se que houve uma diminuição bastante significativa da intensidade dos picos dos compostos voláteis em questão, no dessorvido evaporado/ produto desodorizado.

Na tabela 3.10., apresentam-se as percentagens de eliminação dos compostos voláteis no produto desodorizado. As percentagens (%) de eliminação foram calculadas através dos valores das áreas dos picos de cada um dos compostos voláteis (apresentadas no anexo F, na tabela 5.27).

Tabela 3.10 – Percentagens de eliminação dos compostos voláteis no produto desodorizado.

	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
% eliminação no produto desodorizado	98,9%	98,0%	100,0%	99,9%

As percentagens de eliminação (%) foram calculadas através dos valores das áreas dos picos de cada um dos compostos voláteis. Como se pode verificar pelas percentagens de eliminação calculadas, todos os compostos voláteis foram eliminados com sucesso. De facto, e novamente através de testes organolépticos, este produto foi considerado um “produto sem defeito” e pronto para a sua utilização na aditivção de azeites.

No anexo F, apresentam-se os cromatogramas de várias amostras (figuras 5.19-5.33), obtidas ao longo do trabalho e a tabela com áreas dos picos (tabela 5.27).

Na tabela 3.11, apresentam-se as percentagens de eliminação das restantes amostras produzidas ao longo deste trabalho.

Tabela 3.11 – Percentagens de eliminação nos produtos desodorizados (e um não evaporado) de diversos processos.

	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
ADS 1640 DSS EVAP	99,7%	97,7%	99,9%	99,9%
ADS 1641 DSS EVAP	97,8%	84,6%	99,4%	99,0%
ADS 1642 DSS EVAP	98,0%	88,3%	99,7%	99,5%
ADS 1643 DSS EVAP	98,4%	86,3%	99,7%	99,0%
ADS 1645 DSS EVAP	99,9%	98,0%	100,0%	99,9%
ADS 16410 DSS EVAP 48 h	98,3%	97,5%	99,7%	99,1%
ADS 16410 NÃO EVAP 48 h	99,8%	-	99,6%	99,6%

Pela tabela é possível verificar que, em todos os produtos desodorizados, tanto o ácido acético como o 4-etilfenol, foram eliminados com sucesso; também a presença do creosol foi eliminada quase por completo.

Em relação a outro composto volátil, o ácido butanóico, pode ser observado que a sua eliminação foi concretizada com êxito em alguns dos produtos desodorizados. Nos produtos evaporados dos processos “ADS 1641”, “ADS 1642” e “ADS 1643”, notam-se percentagens de eliminação mais baixas, onde a única condição de operação em comum entre elas é a escala (30 g de resina);

Na figura 3.16, apresenta-se o gráfico com as áreas dos picos dos compostos voláteis em várias amostras de efluente “não adsorvido”.

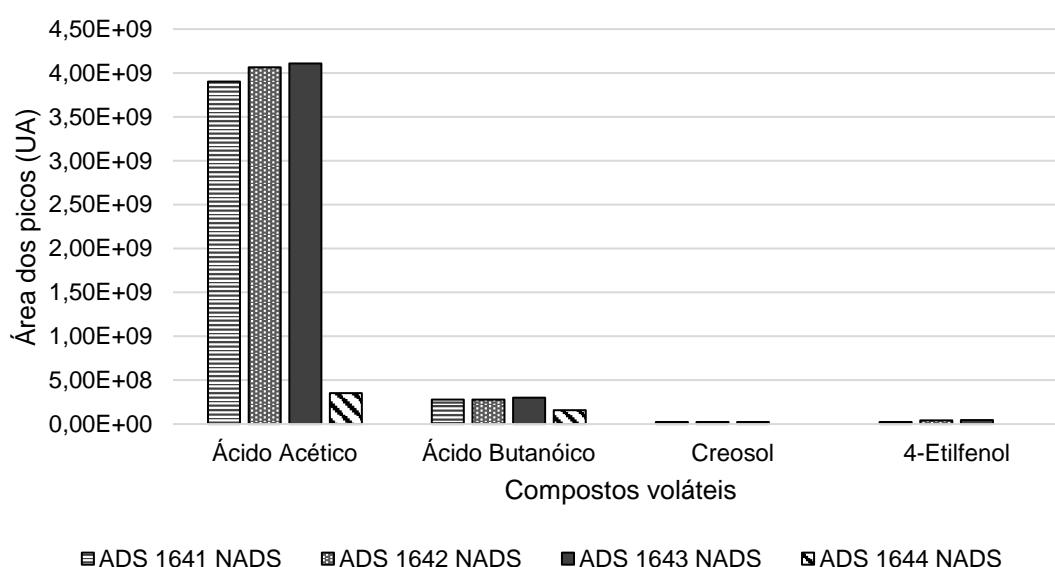


Figura 3.16 – Gráfico com as áreas de picos dos compostos voláteis em várias amostras de efluentes “não adsorvidos”.

Como é possível observar, apesar das diferentes condições de operação no passo de adsorção, as áreas são muito semelhantes. Destaca-se apenas a diferença da quantidade de ácido acético no efluente do processo ADS “1644” em relação aos outros.

Na figura 3.17, está representado o gráfico das áreas dos picos dos vários compostos voláteis no efluente “dessorvido com água”, resultantes de processos diferentes.

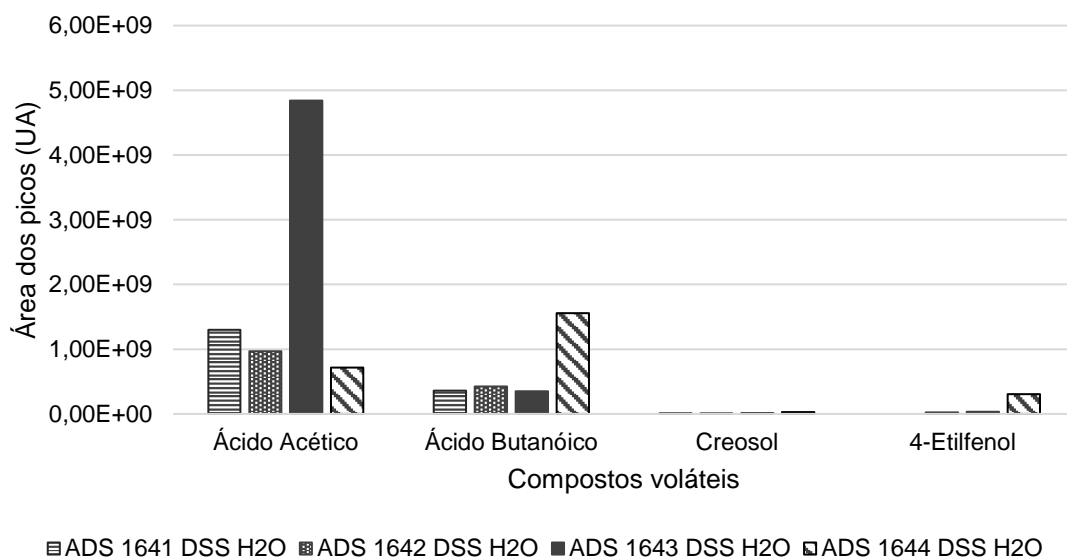


Figura 3.17 - Gráfico com as áreas de picos dos compostos voláteis em várias amostras de efluentes “dessorvidos com água”.

Neste caso, nota-se uma maior presença de ácido acético no efluente do processo “ADS 1643”, onde a grande diferença para os outros processos é a razão resina/água utilizada (1:5).

Para fazer uma simples caracterização dos efluentes do processo foi feita a medição do pH. Na tabela 3.12, apresentam-se os pH dos efluentes de um processo de desodorização.

Tabela 3.12 – pH dos efluentes do processo “ADS 1644”.

Amostra	Processo “ADS 1644”
RO 164	4,84
Não adsorvido	5,05
Dessorvido com água	4,23
Dessorvido evaporado (Produto)	4,34

3.2.7. Eliminação de hidratos de carbono para a aplicação do produto em *spray-drying*

Surgiu também a necessidade de produzir um “dessorvido não evaporado” com aplicação na dissertação “Desenvolvimento de novos produtos à base de hidroxitirosol para aplicação na indústria alimentar/farmacêutica” realizada por Ana Catarina Costa Araújo (2017).

No anexo D1, tabelas 5.9 - 5.11, estão apresentadas as condições dos processos realizados nesta secção (com os códigos ADS1646, ADS1647, ADS1648 e ADS 1649).

Numa tentativa de simplificar o processo de adsorção/ dessorção, uma vez que neste caso o objetivo não é a eliminação dos voláteis, mas sim a eliminação dos hidratos de carbono, tentou reduzir-se os tempos de adsorção e dessorção.

Na tabela 3.13, estão representadas a percentagem de hidroxitirosol adsorvidas, no passo de adsorção, e a percentagem de hidroxitirosol dessorvido, no passo de dessorção.

Tabela 3.13 – Percentagens de hidroxitirosol adsorvidas e dessorvidas em diferentes processos.

	Tempo	Adsorção	Dessorção
ADS 1649	3 h	82%	50%
ADS 1647; ADS 1648	4 h	86%, 79%	60%, 66%
ADS 1646	6 h	82%	63%

Pela tabela anterior, pode verificar-se que a variação do tempo em ambos os passos do processo, não influenciam significativamente as percentagens calculadas.

Uma vez que anteriormente se chegou à conclusão de que 3 horas de dessorção com água eram suficientes para os resultados desejados, decidiu manter-se esse tempo neste novo processo; neste caso, obtiveram-se percentagens de 13-16% de perdas de hidroxitirosol no efluente dessorvido com água.

Através do método de *Folin-Ciocalteu* e das correlações desenvolvidas na secção 3.1, calcularam-se as concentrações de hidroxitirosol e tirosol nos efluentes dos processos anteriormente estudados. No anexo D4, encontram-se as absorvâncias medidas e a quantidade de fenóis totais calculada para cada uma das amostras.

Na tabela 3.14, apresentam-se as concentrações calculadas para os processos com aplicação em *spray-drying*.

Tabela 3.14 – Concentrações de HT e TY calculadas através do método de Folin-Ciocalteu para os processos com aplicação em *spray-drying*.

Processo	Efluente	[Hidroxitirosol] (mg/L GAE)	[Tirosol] (mg /L GAE)
ADS 1646	NADS	2010	617
	DSS H ₂ O	459	351
	DSS não evap.	1780	304
ADS 1647	NADS	1696	550
	DSS H ₂ O	544	364
	DSS não evap.	1744	298
ADS 1648	NADS	2512	682
	DSS H ₂ O	499	357
	DSS não evap.	1758	300
ADS 1649	NADS	2150	624
	DSS H ₂ O	573	369
	DSS não evap.	1363	236

Como se pode observar todos os produtos “DSS não evap.” possuem concentrações muito semelhantes; sendo que, o processo “ADS 1649”, com o menor tempo de dessorção é aquele que possui concentrações de hidroxitirosol e tirosol mais baixas.

Ainda em anexo, anexo D3, estão apresentadas as tabelas da massa de hidroxitirosol calculada (tabelas 5.19 – 5.22) e os esquemas dos balanços mássicos (figuras 5.14 – 5.17), de cada um dos processos de adsorção.

Realizou-se um aumento de escala (*scale-up*), a que se deu o código de “*Scale-Up SD1*”, para a obtenção de extratos dessorvidos suficiente para a aplicação em *spray-drying*.

Na tabela 3.15, apresentam-se os valores de concentrações dos efluentes do processo e a massa de hidroxitirosol calculada.

Tabela 3.15 – Massa e percentagens de hidroxitirosol obtidas nos efluentes do processo *Scale-up SD1*.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido com mistura de solventes biocompatíveis
Volume recuperado (L)	-	1,5	4,5	4,5
[Hidroxitirosol] (g/L)	12	2,8	0,8	1,6
Hidroxitirosol (g)	18	4,2	3,4	7,2
% Hidroxitirosol	-	23%	25%	69%

Neste ensaio foram utilizados 1,5 kg de resina XAD4 e a agitação foi realizada no *orbital shaker*. Na figura 3.18, observa-se o balanço mássico ao processo e percentagens de hidroxitirosol nos efluentes.

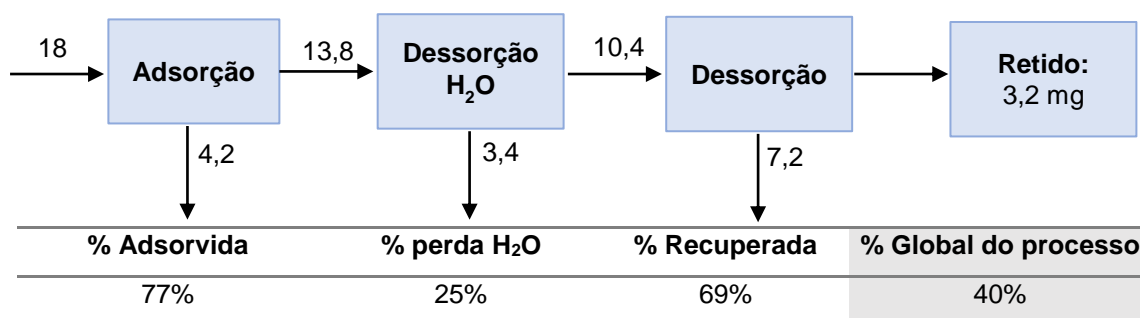


Figura 3.18 – Balanço mássico e percentagens de hidroxitirosol nos efluentes do processo.

As condições utilizadas nos passos de adsorção e dessorção com água são iguais às utilizadas no processo “ADS 1649”. Por essa razão, é possível verificar que as percentagens obtidas são também semelhantes.

Em relação ao passo de dessorção, com a mistura de solventes biocompatíveis à base de água, aumentou-se o tempo para 16h e, desta forma, obteve-se uma percentagem de recuperação maior que a obtida no processo “ADS 1649”.

Assim como determinado na secção 3.2.4., também para os processos *batch* com aplicação em *spray-drying* foram determinadas as quantidades de hidratos de carbono presentes no produto desodorizado.

No Anexo E, tabela 5.25, encontram-se calculadas as concentrações de hidratos de carbono para os quatro produtos dessorvidos, resultantes dos processos discutidos nesta secção.

Na figura 3.19, apresenta-se o gráfico das concentrações de hidratos de carbono.

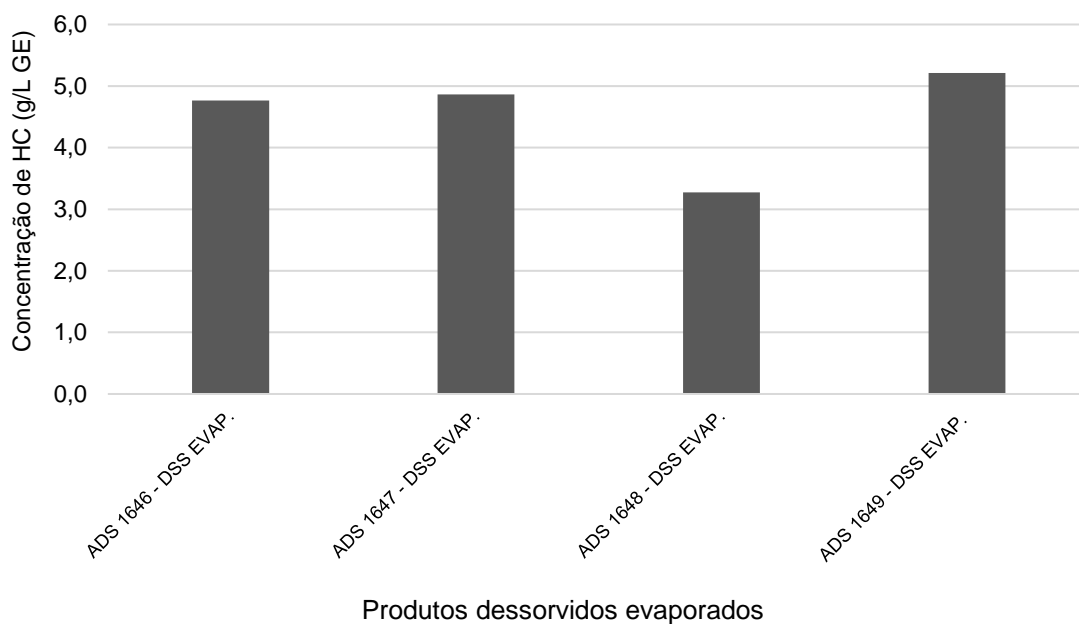


Figura 3.19 – Gráfico com as concentrações de hidratos de carbono nos processos com aplicação em spray-drying.

Para ser possível quantificar a quantidade de hidratos de carbono, utilizando a reta de calibração desenvolvida anteriormente, foi necessário evaporar uma pequena parte do produto “dessorvido não evaporado”.

O produto “ADS 1648 – DSS EVAP.” foi aquele que apresentou uma concentração em hidratos de carbono mais baixa. Apesar disto, o mais expectável seria que o produto “ADS 1649 – DSS EVAP.” possuiu-se a concentração mais baixa, uma vez que foi neste processo que o RO esteve menos tempo em contacto com a resina XAD4, ou seja, onde houve menos tempo para a possível adsorção dos hidratos de carbono.

Por outro lado, pode dizer-se que os resultados obtidos no gráfico anterior são inconclusivos, uma vez que a “ADS 1648” foi realizada nas mesmas condições que a “ADS 1647”. Por essa razão, deveriam possuir concentrações em hidratos de carbono semelhantes, o que não acontece.

3.3. Estudo de adsorção e dessorção de hidroxitirosol ao longo do tempo

Para estudar a adsorção de hidroxitirosol ao longo do tempo efetuou-se o processo “ADS 16410”. O processo está descrito em pormenor na secção 2.2.5. e as suas condições de operação estão descritas no anexo D, na tabela 5.9.

Na figura seguinte, figura 3.20, está apresentado a variação da concentração do hidroxitirosol ao longo do tempo no efluente “não adsorvido”.

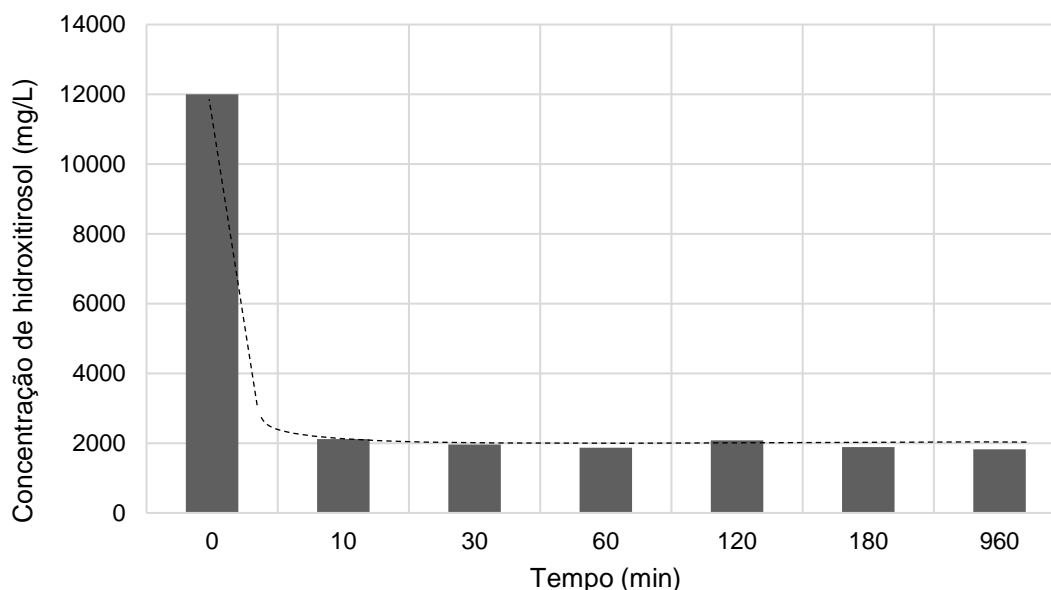


Figura 3.20 – Comportamento do hidroxitirosol ao longo do tempo no efluente “não adsorvido”. As concentrações foram determinadas pela correlação para RO.

Durante o passo de adsorção foram retiradas amostras ao longo de 16 horas (aos 10 min, 30 min, 1 h, 2h, 3h e 16h). As concentrações foram calculadas através da correlação desenvolvida anteriormente, pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

No instante $t=0$ min, a concentração de 12000 mg/L corresponde ao instante em que se põe em contacto o concentrado de osmose inversa com a resina XAD4.

Através da figura anterior observa-se que entre os 0 e 10 minutos ocorre uma queda praticamente vertical da concentração de hidroxitirosol no efluente “não adsorvido”, o que quer dizer que nestes 10 minutos uma grande parte do hidroxitirosol é adsorvido na resina. A partir dos 10 minutos, e até à ultima amostra retirada, pode observar-se que a concentração de hidroxitirosol estabilizou nos 2000 mg/L GAE. As oscilações das concentrações que se verificam neste intervalo, podem ser resultado de pequenos erros inerentes ao método utilizado para o cálculo destas mesmas concentrações.

Na figura 3.21, está representado um gráfico semelhante ao anterior, mas neste caso para a concentração de tirosol.

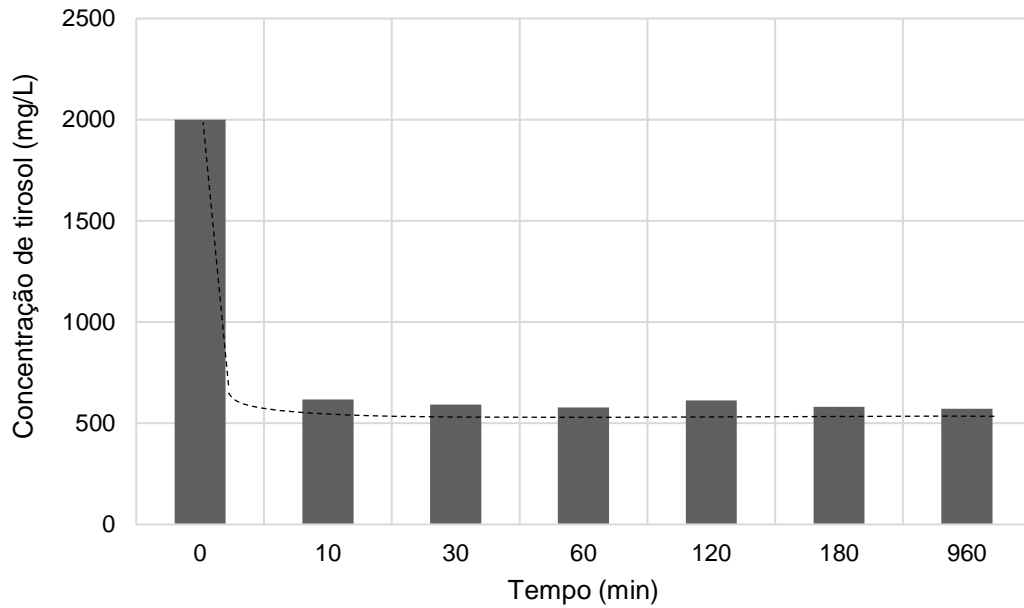


Figura 3.21 - Comportamento do tirosol ao longo do tempo no efluente “não adsorvido”. As concentrações foram determinadas pela correlação dos RO.

Assim como o que acontece com hidroxitirosol, aos 10 minutos de adsorção, a resina atinge a quantidade máxima de tirosol que pode adsorver.

Desde os 10 minutos até ao final das 16h de adsorção, também a quantidade não adsorvida de tirosol se mantém, com uma concentração de aproximadamente 500 mg/L GAE.

Para o passo de dessorção com água, as concentrações calculadas de hidroxitirosol e tirosol do efluente “dessorvido com água”, ao longo do tempo, estão apresentadas na figura 3.22.

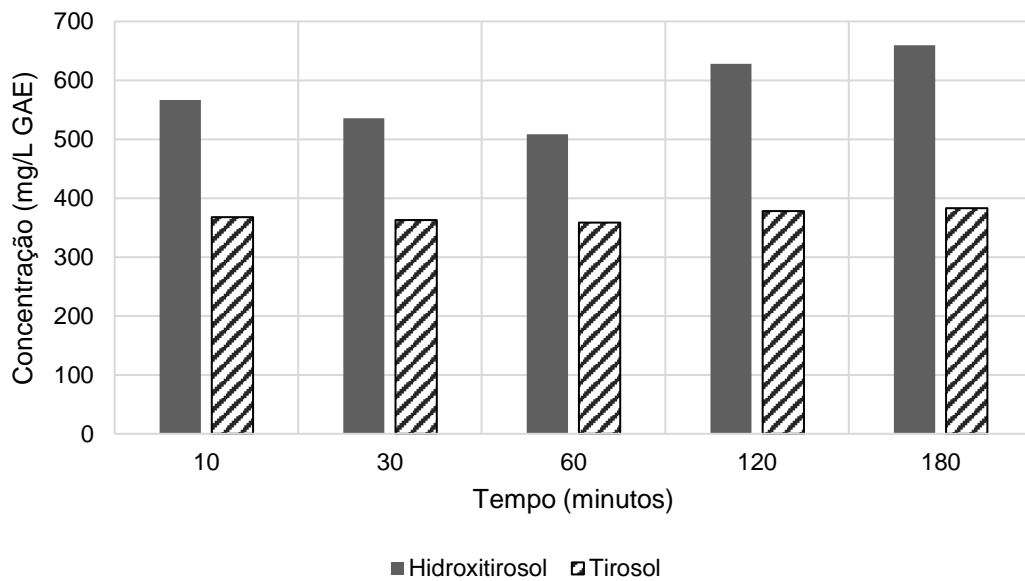


Figura 3.22 – Concentrações de hidroxitirosol e tirosol do efluente “dessorvido com água” ao longo do tempo, calculadas utilizando a correlação dos RO.

O objetivo deste estudo foi tentar perceber se haveria um tempo “ótimo” onde se perderia a menor quantidade possível de hidroxitirosol e tirosol, no passo de dessorção com água. Este passo durou 3 horas, onde se retiraram amostras aos: 10 min, 30 min, 1 h, 2h e 3 h.

Através da figura, pode observar-se que na primeira hora de dessorção com água se perde cerca de 500 mg/L da quantidade de HT. Já no caso do tirosol, qualquer que seja o tempo de dessorção, apenas cerca de 400 mg/L GAE são dessorvidos com a água.

Tendo em conta estes resultados, seria vantajoso encurtar o tempo de dessorção com água para apenas 1 hora. Apesar disto, com a diminuição do tempo iria correr-se o risco de não eliminar os compostos voláteis.

Deste modo, decidi manter-se o tempo de dessorção nas 3 horas uma vez que quantidade de HT e TY que se perde nas amostras de 1 h e 3 h é muito semelhante.

Desta vez, as concentrações do efluente “dessorvido não evaporado” ao longo do tempo foram obtidas através análises de HPLC. Esses resultados estão apresentados no gráfico da 3.23.

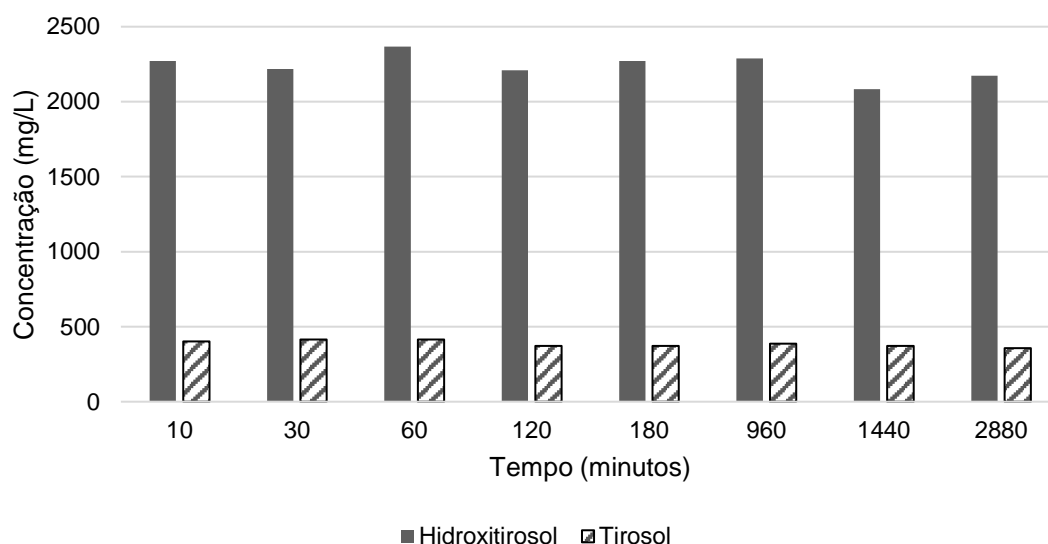


Figura 3.23 - Concentrações do efluente “dessorvido não evaporado” ao longo do tempo (determinadas a partir de análises de HPLC).

Finalmente, no passo de dessorção do produto foram retiradas amostras desde os 10 minutos até às 48 horas, com um objetivo similar ao dos passos anteriores. Primeiramente, verificar se é possível diminuir o tempo de dessorção e obter resultados semelhantes, ou por outro lado, se aumentando o tempo de dessorção se obtém melhores resultados.

Mais uma vez, por análise da figura, pode verificar-se que não há grande oscilação da concentração, tanto do hidroxitirosol como do tirosol, ao longo do tempo. Assim como no passo de adsorção, apenas são necessários 10 minutos para dessorver uma grande quantidade de HT e TY e atingir a sua estabilização no efluente “dessorvido não evaporado”. Uma possível explicação para não se conseguir dessorver mais quantidade de hidroxitirosol é por haver um problema de transferência de massa ou um equilíbrio de dessorção.

No final do passo de dessorção, ficaram ainda adsorvidas na resina cerca de 1390 mg de hidroxitirosol. Deste modo, foram realizadas mais duas dessorções para verificar a quantidade de hidroxitirosol e tirosol seria possível dessorver.

O balanço e respetiva tabela de massas de hidroxitirosol estão apresentados no Anexo D2, na tabela 5.17.

Na figura 3.24, apresentam-se os resultados das 2ª e 3ª dessorções ao longo do tempo.

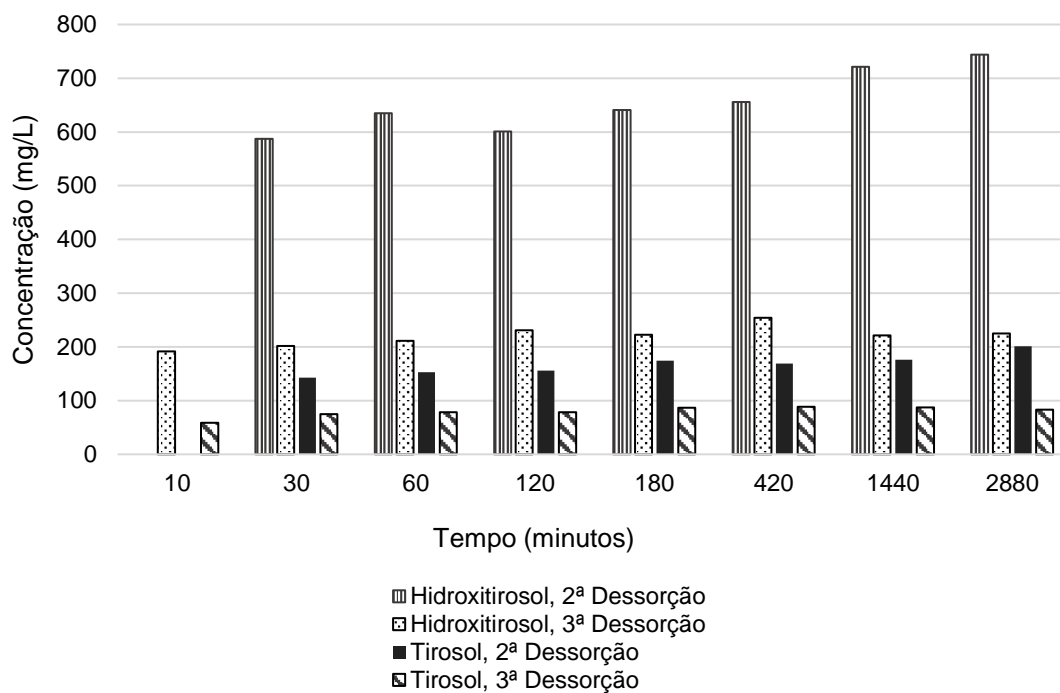


Figura 3.24 – Concentrações de hidroxitirosol e tirosol na 2ª e 3ª dessorção ao longo do tempo (determinadas a partir de análises de HPLC).

Como é possível observar, tanto o hidroxitirosol como o tirosol, são dessorvidos logo no início das 2ª e 3ª dessorções. No caso de hidroxitirosol, existe uma grande diferença da concentração dessorvida da 2ª para a 3ª dessorção.

Foi realizado ainda um último processo de adsorção, com o código ADS 16411, onde apenas se realizaram os passos de adsorção e dessorção com água, apresentada na figura 3.25.

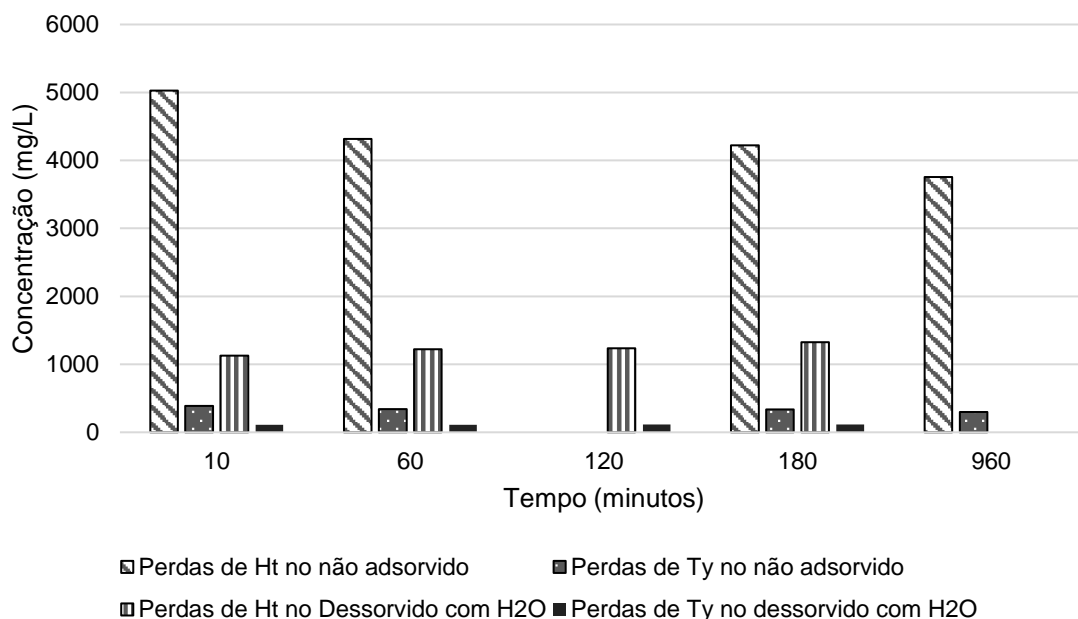


Figura 3.25 - Concentrações de HT e TY presentes nos efluentes NADS e DSS H₂O.

Neste caso, no passo de adsorção, alterou-se a razão da resina/ RO para 1:2, com o principal objetivo de estudar o comportamento da adsorção com uma maior quantidade de RO. Apesar desta mudança, apenas se recuperou 69% do hidroxitirosol, o que quer dizer que a resina pode ter chegado à sua “saturação”. Por exemplo, a regeneração da resina pode não ter sido eficaz, o que pode ter dificultado esta a adsorção.

Em relação ao passo de dessorção com água, foram perdidos 24% do hidroxitirosol, o que não é muito diferente dos resultados obtidos em processos discutidos anteriormente.

É de notar que algumas das concentrações apresentadas neste subcapítulo têm unidades de “mg/L GAE”, o que quer dizer que em vez de serem resultantes de análises de HPLC foram calculadas através do método de *Folin-Ciocalteu*, descrito em pormenor na secção 2.2.3.. Os resultados calculados pelo método anteriormente referido estão apresentados no anexo D4, na tabela 5.23.

3.4. Estudo da variação da concentração dos hidratos de carbono ao longo do processo de adsorção/ dessorção para a desodorização do extrato

Utilizando o método de fenol-sulfúrico, foi feito um balanço de massas aos hidratos de carbono de um dos processos realizados, para perceber seu o comportamento ao longo do processo. Em especial, o objetivo foi perceber qual dos passos se mostrava ser o mais importante para a eliminação dos hidratos de carbono.

A adsorção foi efetuada utilizando uma razão resina/RO de 1:1, durante aproximadamente 16 horas (*overnight*), a dessorção com água foi feita com uma razão resina/H₂O de 1:3 durante 3 horas. Finalmente, o produto não evaporado foi obtido utilizando uma mistura de solventes biocompatíveis, com uma razão resina/solvente de 1:3 durante 16 horas (*overnight*). Na tabela 3.16 encontram-se os resultados calculados da massa de hidratos de carbono em cada um dos efluentes.

Tabela 3.16 – Resultados obtidos para os hidratos de carbono em cada um dos efluentes do processo “ADS 1645”. As concentrações foram calculadas através do método de fenol-sulfúrico.

	Alimentação	Efluente "não adsorvido"	Efluente "dessorvido com H ₂ O"	Produto	Produto evaporado
Volume (L)	0,3	0,3	0,9	0,9	0,05
[Hidratos de carbono] (mg/L GE)	4100	2700	360	10	3500
Hidratos de carbono (mg)	1250	800	330	10	180
% hidratos de carbono	-	64%	73%	8%	-

Como exemplo, foi estudado o comportamento dos hidratos de carbono ao longo de um processo. O processo de desodorização escolhido foi o processo com o código “ADS 1645”, onde foi retirada uma amostra de cada um dos efluentes e aplicado o método de fenol-sulfúrico. No anexo E, na tabela 5.25, estão apresentadas as concentrações de hidratos de carbono calculadas.

Pela tabela, é de fácil percepção que mais de metade da massa de hidratos de carbono, alimentada ao passo de adsorção, não chega a ficar adsorvida à resina. Cerca de 64% dos HC ficaram retido no efluente “não adsorvido”.

No passo de dessorção com água, 73% dos hidratos de carbono são dessorvidos neste efluente. Seguindo o mesmo raciocínio, no passo final de dessorção, apenas cerca de 10% dos hidratos de carbono estão presentes na composição do produto desodorizado.

Na figura 3.26, está apresentado o esquema do balanço mássico ao processo e respetivas percentagens (calculadas em relação à alimentação do processo).

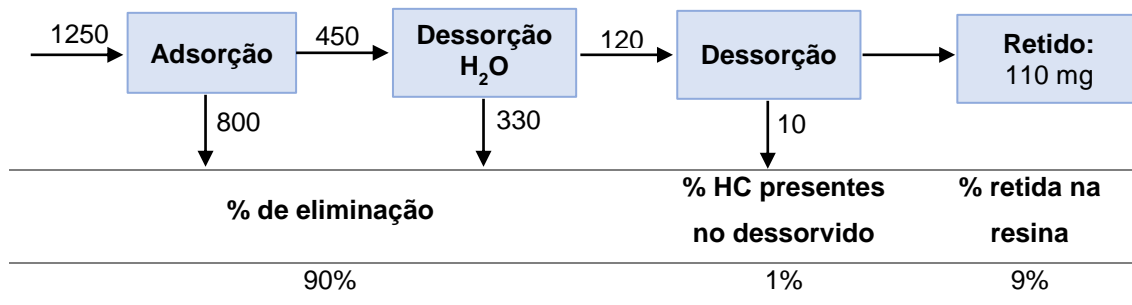


Figura 3.26 - Balanço mássico e percentagens calculadas de hidratos de carbono nos efluentes do processo "ADS 1645"

Em relação à quantidade inicial de hidratos de carbono alimentados ao processo, apenas 1% "chegam" ao produto desodorizado no final da sua produção.

No produto desodorizado, pode ser encontrada uma concentração em hidratos de carbono de 3,4 g/L GE.

Para além deste estudo, no anexo E, tabela 5.26, apresenta-se a concentração dos hidratos de carbono dos efluentes "não adsorvido" e "dessorvido com água" do processo "ADS 16410" ao longo do tempo.

Uma vez que a literatura^[3] afirma que a resina é seletiva em relação aos hidratos de carbono, seria de esperar que a sua concentração no efluente "não adsorvido" fosse constante, isso não se observa no estudo efetuado. A agitação utilizada pode explicar a oscilação da concentração de hidratos de carbono ao longo do tempo. Já, em relação ao "dessorvido com água", observa-se que em apenas 10 minutos se dessorvem os hidratos de carbono (0,44 g/L GE).

3.5. Estudo da variação dos hidratos de carbono ao longo do processo de adsorção/dessorção para aplicação em *spray-drying*

Da mesma forma, foi feito um estudo para um dos processos com aplicação em *spray-drying*, neste caso, o processo "ADS 1647".

A adsorção foi efetuada utilizando uma razão resina/ RO de 1:1, durante 4 h, a dessorção com água foi feita com uma razão resina/H₂O de 1:3 durante 3 h. Finalmente, o produto não evaporado foi obtido utilizando uma mistura de solventes biocompatíveis, com uma razão resina/solvente de 1:3 durante 4 h. Na tabela 3.17 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 3.17 – Resultados obtidos para os hidratos de carbono em cada um dos efluentes do processo “ADS 1647”

	Alimentação	Efluente "não adsorvido"	Efluente "dessorvido com H ₂ O"	Produto	Produto evaporado
Volume (L)	0,3	0,3	0,9	0,9	0,05
[Hidratos de carbono] (mg/L GE)	4100	620	380	17	4900
Hidratos de carbono (mg)	1250	190	340	15	260
% hidratos de carbono	-	15%	32%	2%	-

Neste caso, verifica-se uma grande diferença, em relação ao processo estudado anteriormente. No passo de adsorção, apenas 15% dos hidratos de carbono permanecem no efluente “não adsorvido”. Esta situação não é de todo expectável devido à seletividade da resina em relação aos hidratos de carbono, o que devia fazer com que a percentagem de HC presentes no “não adsorvido” fosse muito maior. Por último, na figura 3.27, apresenta-se o esquema do balanço mássico.

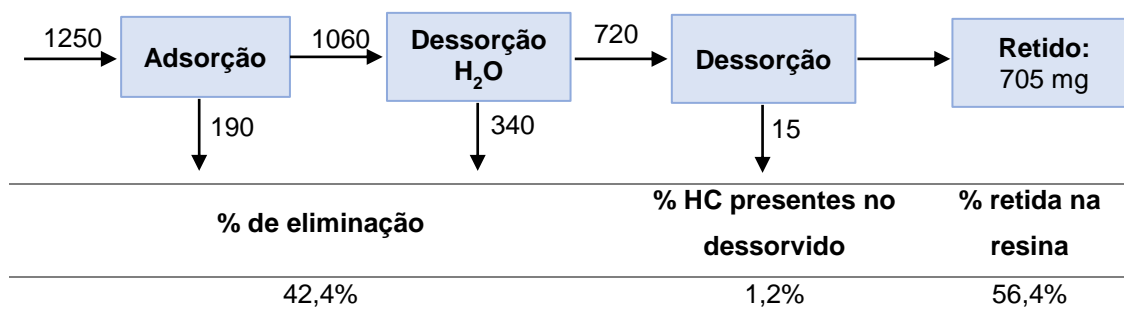


Figura 3.27 - Balanço mássico e percentagens calculadas de hidratos de carbono nos efluentes do processo “ADS 1647”

É possível verificar que uma parte dos hidratos de carbono são eliminados nos passos iniciais do processo. Em relação ao processo estudado na secção 3.4., observa-se que a quantidade de HC retidos na resina é muito maior, o que mais uma vez, não seria expectável tendo em conta o que é referido na literatura^[3].

3.6. Estudo do passo de regeneração da resina

Para além do estudo de otimização do processo de desodorização, também foi necessário perceber qual o solvente, tempo e razões resina/solvente que permitia a limpeza mais eficiente da resina.

Começou por se estudar a regeneração utilizando vários solventes diferentes. Na figura 3.28 estão os solventes utilizados e a respetiva concentração presente no efluente de limpeza.

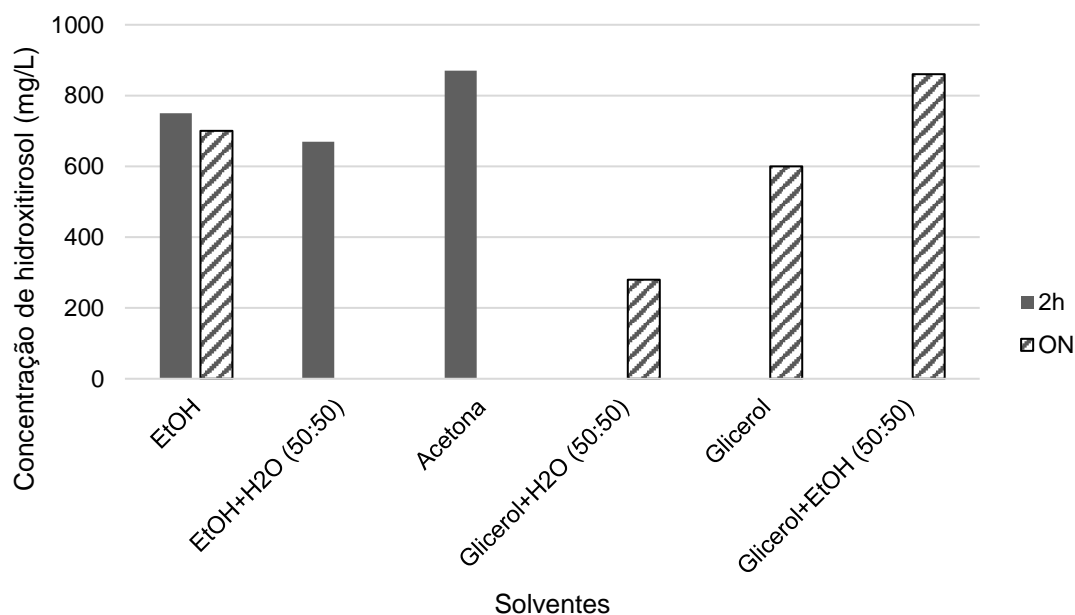


Figura 3.28 – Solventes utilizados na regeneração da resina

Analisando o gráfico, verificam-se que os melhores solventes de limpeza são a acetona e glicerol/etanol (50:50). Apesar deste resultado, nenhum dos dois se mostra realmente vantajoso.

O solvente glicerol/etanol foi logo descartado uma vez que depois desta limpeza, teria de se eliminar os resíduos de glicerol. Por outro lado, com este mesmo solvente, obteve-se uma concentração de ≈ 800 mg/L em 16 h (ON), enquanto que existem outros solventes onde se obtêm valores semelhantes com muito menos tempo de operação (2h).

Por outro lado, apesar da acetona ser um bom solvente de regeneração, por vezes as fábricas não estão preparadas para este tipo de solvente. Este é um solvente muito inflamável e que, por essa razão, requer uma maior segurança no seu armazenamento. Neste caso, o etanol torna-se um bom substituto. Assim sendo, escolheu-se o etanol como solvente de limpeza.

Como os resultados obtidos para os dois tempos estudados, 2h ou ON (*overnight* ≈ 16 h), foram muito semelhantes, decidiu-se rentabilizar o tempo realizando uma limpeza de apenas 2 horas.

No artigo *Zagklis et al. (2015)*^[3] é referido que não foi necessário realizar uma regeneração da resina, e que os passos de dessorção com água e dessorção com etanol

mostraram-se suficientes para essa limpeza. Apesar disto, na ficha técnica da resina XAD4 (da marca *Sigma Aldrich*)^[4] é possível ler que “este tipo de resinas pode ser regenerada utilizando metanol ou outros solventes orgânicos miscíveis em água (acetona, isopropanol, etc)”.

No início do desenvolvimento dos trabalhos preliminares, a resina foi utilizada em vários processos de adsorção sem efetuar a sua regeneração. Conseqüentemente, a resina chegou a um equilíbrio que não a permitia adsorver mais compostos, nesta altura não se obtiveram bons resultados nos produtos dessorvidos. Por essa razão, decidiu estudar-se o processo de regeneração da resina utilizando vários solventes, tempos, temperaturas.

Na figura 3.29, está apresentado um gráfico dos vários ensaios da regeneração da resina, utilizando como solvente o etanol, alterando apenas os tempos de regeneração.

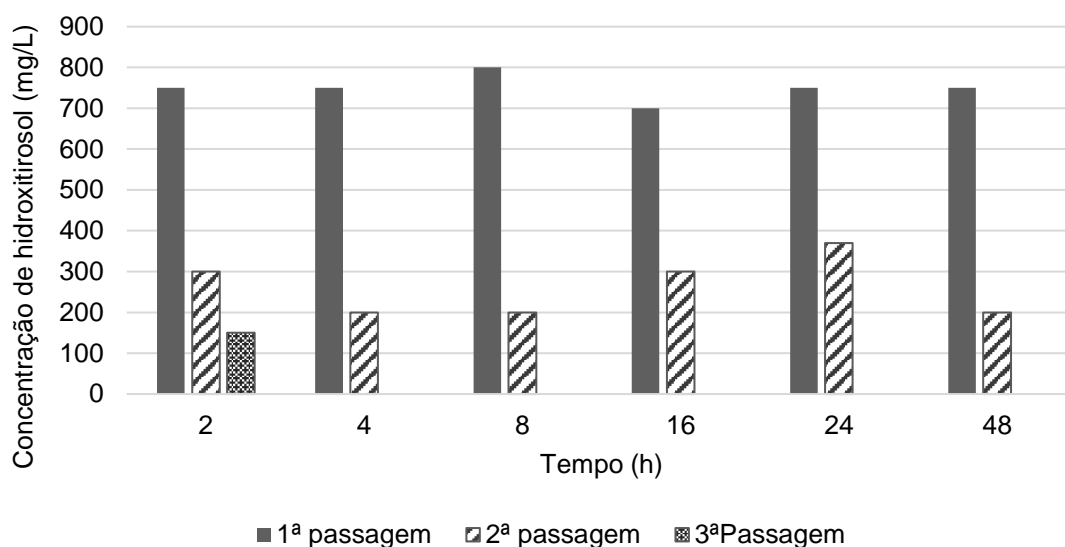


Figura 3.29 – Ensaios da regeneração, utilizando o etanol como solvente de limpeza, com vários tempos de regeneração

Analisando apenas as primeiras passagens de solvente, é possível verificar que apesar dos diferentes tempos, a quantidade de hidroxitirosol e, conseqüentemente, de outros compostos fenólicos dessorvidos na resina polimérica é praticamente igual. Desta forma, e de maneira a rentabilizar o tempo, pode escolher-se o tempo de 2 h para regenerar a resina com etanol.

De seguida, e utilizando como solvente o etanol durante 2h, variou-se a temperatura. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 3.30.

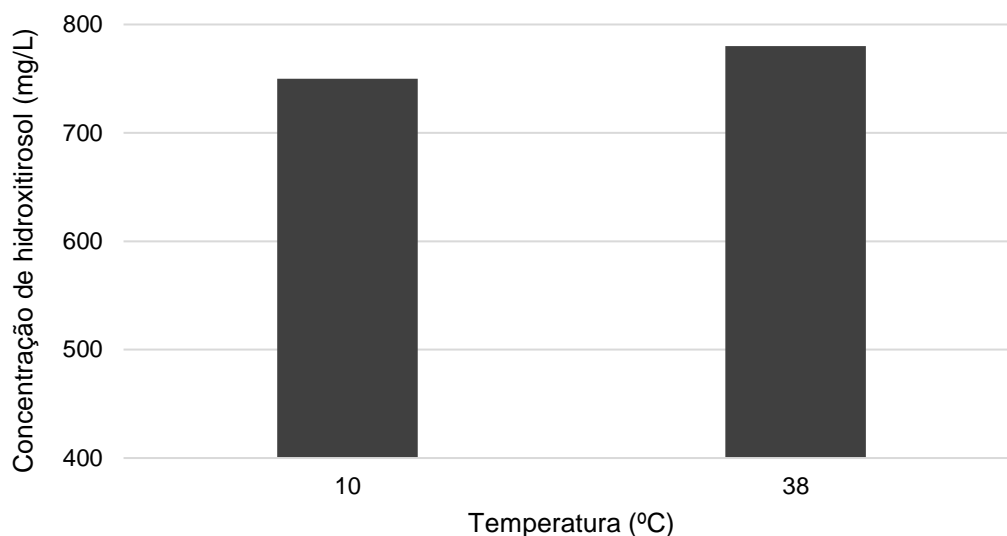


Figura 3.30 – Variação da temperatura na limpeza da resina

As temperaturas utilizadas tiveram como objetivo simular temperaturas atingidas no inverno e verão. Deste modo, é possível verificar que as temperaturas mais quentes favorecem a regeneração da resina, ao contrário das temperaturas mais baixas.

Finalmente, foi feita uma limpeza à resina, antes desta ser utilizada no processo “Scale-up SD1”. Na tabela 3.18, apresenta-se as concentrações de fenóis totais determinadas através do método de *Folin-Ciocalteu*.

Tabela 3.18 – Concentrações de fenóis totais na limpeza da resina

	Absorvância média	[Fenóis totais] (mg/L GAE)
1ª passagem (1:3)	0,0586	1611
2ª passagem (1:2)	0,0190	209

É possível observar uma grande diferença nas concentrações calculadas para a 1ª e 2ª passagens, isto é, a grande parte dos fenóis totais é eliminada na 1ª passagem.

A 2ª passagem pode ser realizada apenas para garantir que a passagem anterior teve sucesso. De modo a diminuir o volume de etanol utilizado e, conseqüentemente, os custos, foi diminuída a razão resina/ etanol da 2ª passagem para 1:2. Com os resultados obtidos, pode afirmar-se que a decisão da diminuição do volume de etanol na 2ª passagem foi acertada.

Em jeito de conclusão, pode afirmar-se que a regeneração da resina pode ser realizada com etanol a temperatura controlada (25-30°C), durante 1/2 h. Para maximizar a limpeza, pode ser feita mais do que uma passagem de solvente. Para finalizar, é feita uma limpeza com água durante 1 h para eliminar hidratos de carbono e resíduos de etanol.

Bibliografia

- [1] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent," *Methods Enzymol.*, vol. 299, no. 1974, pp. 152–178, 1999.
- [2] A. L. Waterhouse, "Determination of Total Phenolics," *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*, p. I1.1.1.-I1.1.8, 2002.
- [3] D. P. Zagklis, A. I. Vavouraki, M. E. Kornaros, and C. A. Paraskeva, "Purification of olive mill wastewater phenols through membrane filtration and resin adsorption/desorption," *J. Hazard. Mater.*, vol. 285, pp. 69–76, 2015.
- [4] Sigma-Aldrich, "Resina XAD4," *Product information*. [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/xad4pis.pdf. [Accessed: 10-Sep-2017].

4. Conclusões

A principal conclusão alcançada após o desenvolvimento deste trabalho foi a obtenção de uma melhoria significativa na percentagem de recuperação de hidroxitirosol (70-80%) no processo, mantendo o mesmo nível de eliminação de compostos voláteis. Concluiu-se que os parâmetros que mais afetam o rendimento do processo é a razão resina/solvente no passo de dessorção. O estudo da concentração do hidroxitirosol e tirosol ao longo do tempo mostrou ser ainda possível diminuir mais o tempo de adsorção e dessorção.

Aplicou-se com sucesso uma forma simplificada do processo a um extrato cujo objetivo não era a eliminação de compostos voláteis, mas sim a eliminação de hidratos de carbono para posterior secagem por *spray-drying*. Atingiu-se uma eliminação de aproximadamente 85%.

Foi pela primeira vez desenvolvida uma correlação entre a concentração de fenóis totais e a concentração de hidroxitirosol/ tirosol, que permite a obtenção de resultados mais rápidos.

Como trabalhos futuros sugere-se a continuação da otimização da regeneração da resina e a passagem do processo de adsorção/ dessorção *batch* a semi-contínuo, para uma mais fácil implementação industrial do processo.

5. Anexos

A. Cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 5.1 - Áreas dos picos correspondentes a concentrações de hidroxitirosol padrão.

Concentração de hidroxitirosol (mg/L)	Área dos picos(UA)
9,3	103
23,25	263
46,5	518
69,75	786
93	1045

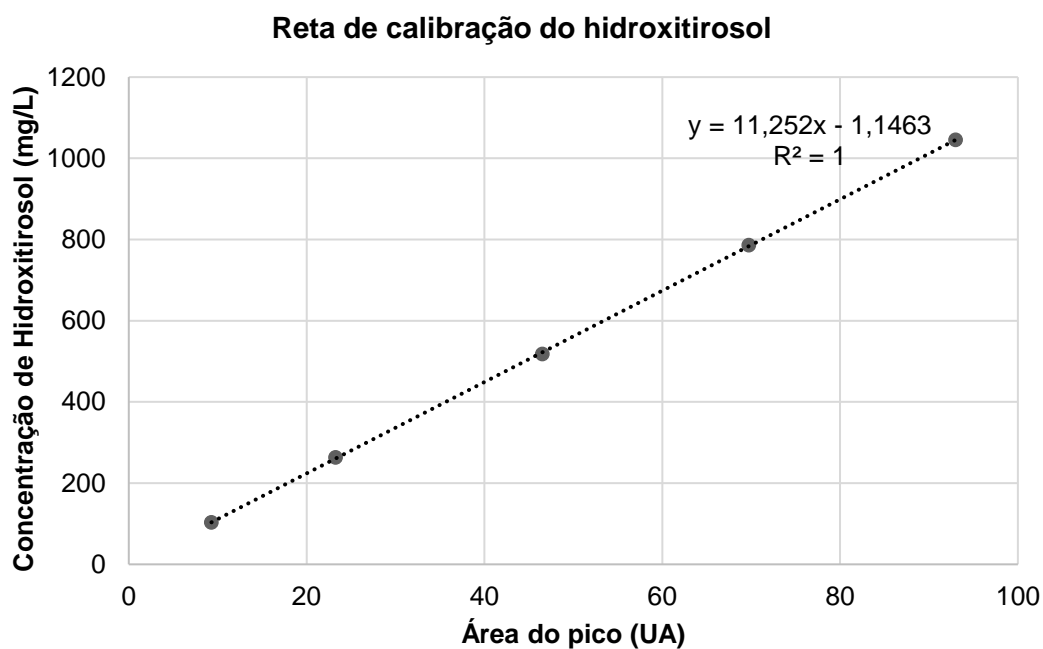


Figura 5.1 - Reta de calibração do hidroxitirosol padrão.

Tabela 5.2 - Áreas dos picos correspondentes a concentrações de tirosol padrão.

Concentração de Tirosol (mg/L)	Área dos picos (UA)
0	0
10	75
20	145
40	289
60	428
80	563
100	712

Reta de calibração do tirosol

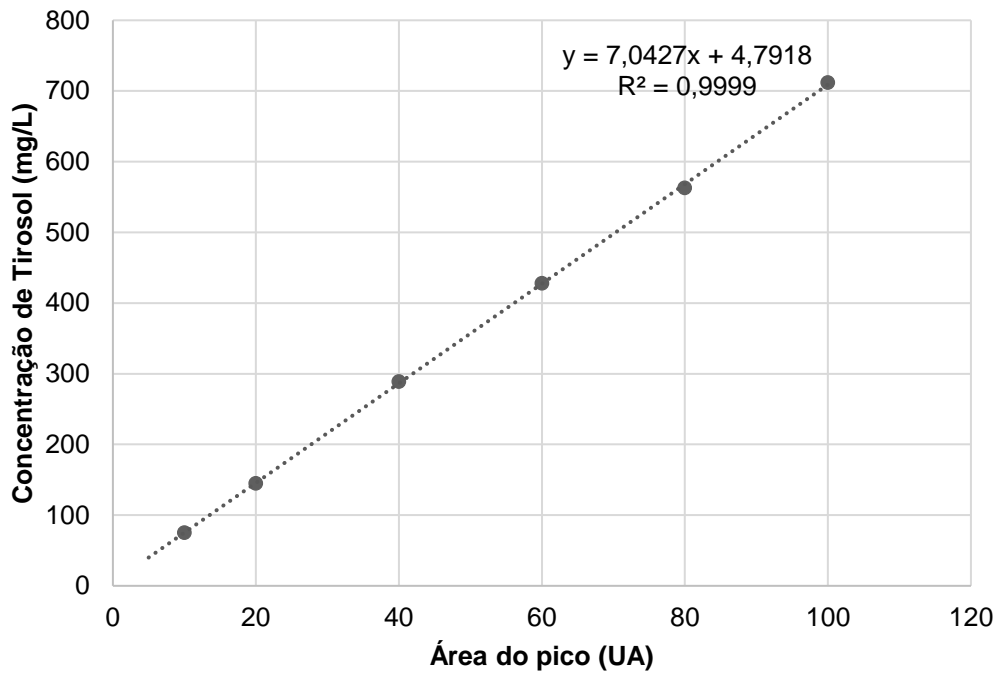


Figura 5.2 - Reta de calibração do tirosol padrão.

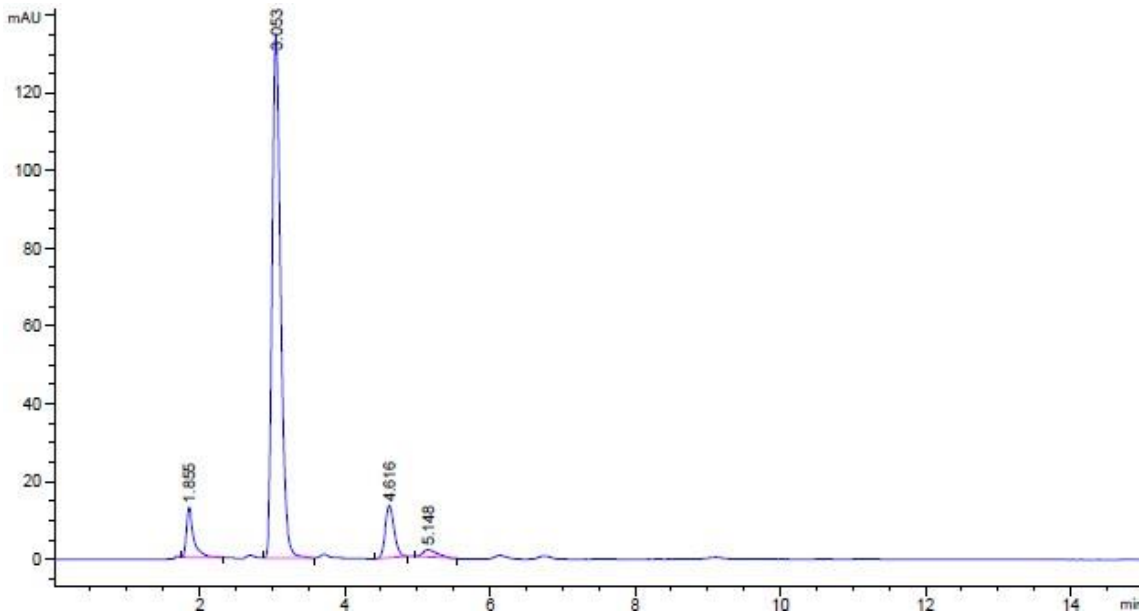


Figura 5.3 - Cromatograma de uma amostra de concentrado de osmose inversa (RO164).

B. Estabilidade do concentrado de osmose inversa

Tabela 5.3 - Concentrações de HT e TY no RO 164 ao longo do tempo.

Data	Meses	[Hidroxitirosol] (mg/L)	[Tirosol] (mg/L)
15/07/2016	0,03	13233	2028
26/07/2016	0,39	14323	2568
26/10/2017	3,35	11988	2222
31/01/2017	6,48	10655	2140
13/02/2017	7,64	10640	2265
21/02/2017	7,93	9821	1906
10/03/2017	7,71	11683	1957
21/03/2017	8,06	12963	1959
27/03/2017	8,26	11779	1864
06/04/2017	8,87	12875	1071
11/04/2017	9,03	11413	2170
11/05/2017	10,03	12449	2107
18/05/2017	10,26	11312	1969
23/05/2017	10,42	11170	1993
30/05/2017	10,65	10810	1971
07/06/2017	11,23	11910	1948
14/06/2017	11,47	11698	1795
28/06/2017	11,93	12241	2107
13/07/2017	12,03	12882	2184

C. Método de Folin-Ciocalteu - Retas de calibração e correlações

Tabela 5.4 - Absorvâncias medidas para concentrações de ácido gálico conhecidas preparadas em água.

Concentração de ácido gálico (mg/L GAE)	Absorvância (a 750 nm)			Absorvância média
50	0,0578	0,0574	0,0573	0,0575
100	0,1045	0,1044	0,1053	0,1047
150	0,1812	0,1809	0,1807	0,1809
250	0,2628	0,2632	0,2634	0,2631
350	0,3642	0,3648	0,3642	0,3644
500	0,5497	0,5493	0,5508	0,5499
650	0,7616	0,7615	0,7611	0,7614
800	0,8942	0,8943	0,838	0,8755

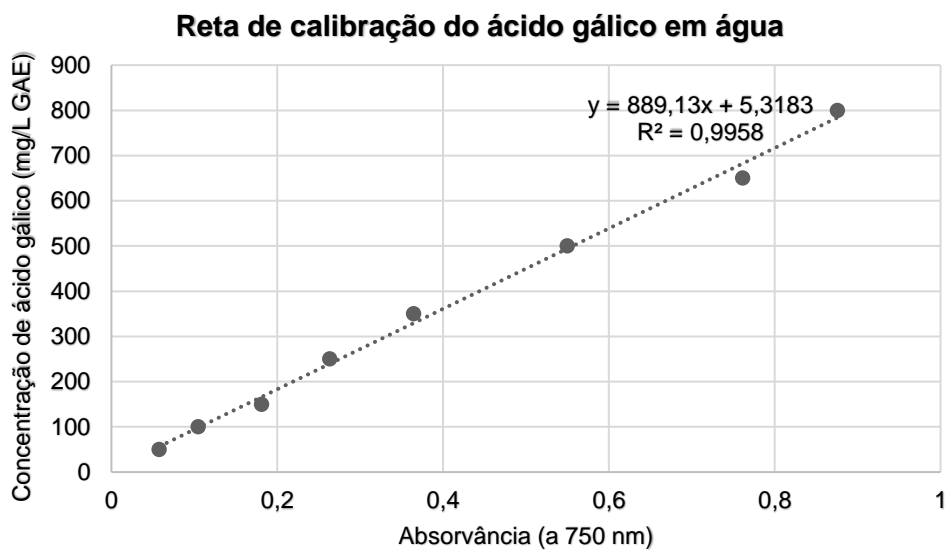


Figura 5.4 - Reta de calibração do ácido gálico em água.

Tabela 5.5 - Absorvâncias medidas para concentrações de ácido gálico conhecidas preparadas numa mistura de solventes biocompatíveis à base de água.

Concentração ácido gálico (mg/L GAE) com uma mistura de solventes biocompatíveis à base de água	Absorvância (a 750 nm)			Absorvância média
50	0,0413	0,0414	0,0410	0,0412
100	0,0528	0,0521	0,0524	0,0524
150	0,1179	0,1176	0,1177	0,1177
250	0,2037	0,2041	0,204	0,2039
500	0,4277	0,4267	0,4271	0,4272
650	0,6662	0,6668	0,6664	0,6665
800	0,7745	0,7749	0,7744	0,7746

Reta de Calibração do ácido gálico em mistura de solventes biocompatíveis à base de água

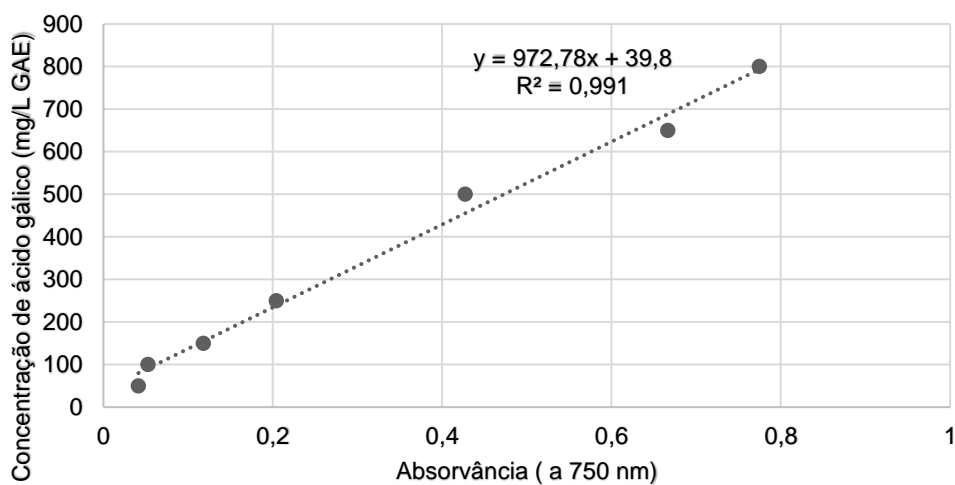


Figura 5.5 - Reta de calibração do ácido gálico em mistura de solventes biocompatíveis à base de água.

Tabela 5.6 - Absorvâncias medidas para concentrações de ácido gálico conhecidas preparadas em etanol.

Concentração de ácido gálico com etanol (mg/L GAE)	Absorvância (a 750 nm)			Absorvância média
50	0,055	0,0556	0,0552	0,0553
100	0,1002	0,1022	0,1007	0,1010
150	0,1588	0,1584	0,1585	0,1586
250	0,2785	0,2774	0,2771	0,2777
350	0,2435	0,2442	0,2438	0,2438*
500	0,4762	0,4764	0,4764	0,4763
650	0,5806	0,5807	0,5819	0,5811
800	0,6913	0,6924	0,6924	0,6920

* resultado ignorado para a reta de calibração.

Reta de Calibração do ácido gálico em etanol

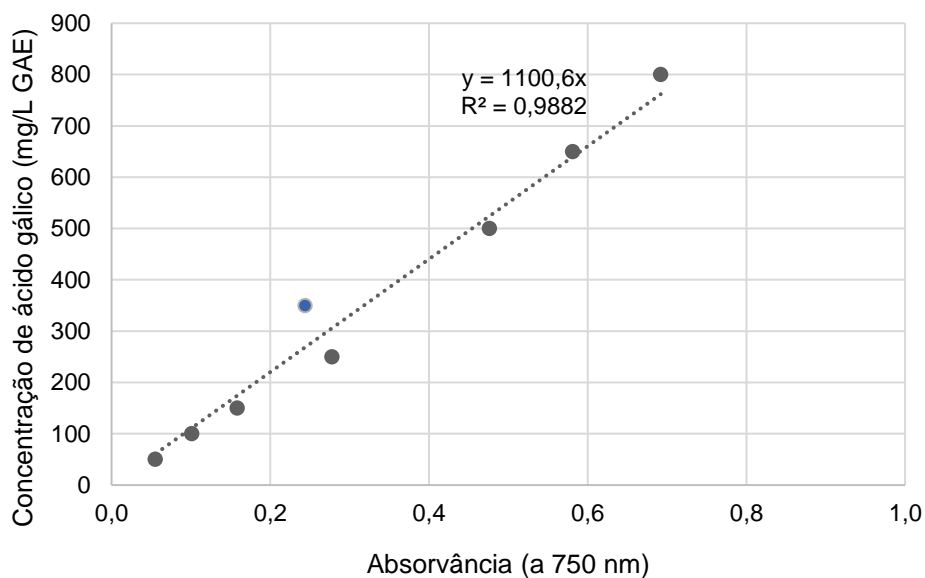


Figura 5.6 - Reta de calibração do ácido gálico em etanol.

Tabela 5.7 - Medições de absorvâncias, fenóis totais e hidroxitirosol e tirosol (HPLC) de concentrados de osmose inversa.

Amostra	Método <i>Folin-Ciocalteu</i>		HPLC	
	Absorvância média	[Fenóis totais] (mg/L GAE)	[Hidroxitirosol] (mg/L)	[Tirosol] (mg/L)
RO 6 + H ₂ O (1:20)	0,4070	367	212	48
RO 6	0,4070	7131	4300	1100
RO 8	0,5601	4927	2200	550
RO 161	0,7907	13955	9800	2200
RO 162	0,5751	10120	6000	1250
RO 164	0,7187	19010	12000	2000
RO 166	0,7514	33139	16000	3000
RO 168	0,6536	23031	15000	2500
RO 164 100 - 80 mL	0,5689	25556	15500	2500
RO 164 100 - 50 mL	0,3966	53692	21500	4000
RO 164 100 - 45 mL	0,3323	45112	27206	4420
RO 164 100 - 40 mL	0,3832	51900	30848	5395
RO 164 100 - 35 mL	0,3313	59971	33803	5895
RO 164 100 - 30 mL	0,3752	67778	38500	6500

Tabela 5.8 - Medições de absorvâncias, concentração de fenóis totais e hidroxitiroso e tiroso (HPLC) de "dessorvidos não evaporados".

Amostras	Método de <i>Folin-Ciocalteu</i>		HPLC	
	Absorvância média	[Fenóis totais] (mg/L GAE)	[Hidroxitiroso] (mg/L)	[Tiroso] (mg/L)
ADS 1642 - DSS	0,667	3440	2400	390
ADS 1643 - DSS	0,454	2407	1459	302
ADS 1640 - 1ª DSS	0,542	2832	1977	368
ADS 1640 - 2ª DSS	0,183	1088	405	63
2ª DSS 16/11/2016	0,407	2179	1100	300

D. Adsorção/ Dessorção

D1. Condições de operação

Tabela 5.9 - Condições de operação do passo de adsorção para cada um dos processos.

Adsorção	Razão resina/ RO 164	Escala (g de resina)	Tempo (h)	Tipo de agitação		
Scale-Up	1:1	6000	16	Orbital shaker		
ADS 1640		30				
ADS 1641			300	8	Magnética	
ADS 1642		16				
ADS 1643		6				
ADS 1644		4				
ADS 1645		3				
ADS 1646		500/250		10 min – 48		
ADS 1647		1:2	250	10 min – 16		
ADS 1648						
ADS 1649		1:1	1500	3		Orbital shaker
ADS 16410						
ADS 16411	Scale-up SD1					

Tabela 5.10 - Condições de operação do passo de dessorção com água para cada um dos processos.

Dessorção com H ₂ O	Razão Resina/H ₂ O	Escala (g de resina)	Tempo (h)	Tipo de agitação
Scale-Up	1:1	6000	3 h	<i>Orbital shaker</i>
ADS 1640	1:3	300		
ADS 1641	1:5	30		Magnética
ADS 1642	1:3			
ADS 1643	1:5			
ADS 1644	1:3	300		
ADS 1645				
ADS 1646				
ADS 1647				
ADS 1648				
ADS 1649				
ADS 16410				
ADS16411	10 min- 3 h			
Scale-up SD1		1500	16 h	<i>Orbital shaker</i>

Tabela 5.11 - Condições de operação do passo de dessorção com uma mistura de solventes biocompatíveis à base de água para cada um dos processos.

Dessorção	Razão Resina/ mistura solventes biocompatíveis	Escala (g de resina)	Tempo (h)	Tipo de agitação
Scale-Up	1:1	6000	16 h	<i>Orbital shaker</i>
ADS 1640	1:3	300		
ADS 1641	1:5	30	8 h	Magnética
ADS 1642	1:3			
ADS 1643	1:5			
ADS 1644	1:3	300	16 h	
ADS 1645			6 h	
ADS 1646			4 h	
ADS 1647			3 h	
ADS 1648				
ADS 1649				
ADS 16410				
Scale-up SD1		1500	16 h	<i>Orbital shaker</i>

D2. Aplicação em azeites

Tabela 5.12 – Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1640.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	1º Dessorvido	2º Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,3	1	1	1
[Hidroxitirosol] (mg/L)	12000	1100	400	2000	400
Hidroxitirosol (mg)	3600	320	400	2000	400
% Hidroxitirosol	-	9%	12%	69%	45%

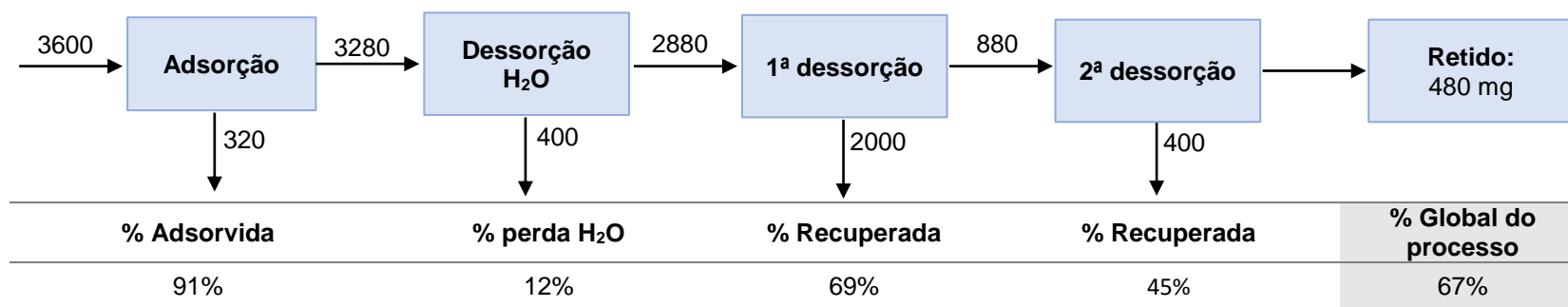


Figura 5.7 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1640.

Tabela 5.13 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1641.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,03	0,15	0,15
[Hidroxitirosol] (mg/L)	12000	1500	500	1200
Hidroxitirosol (mg)	360	50	70	180
% Hidroxitirosol	-	14%	23%	75%

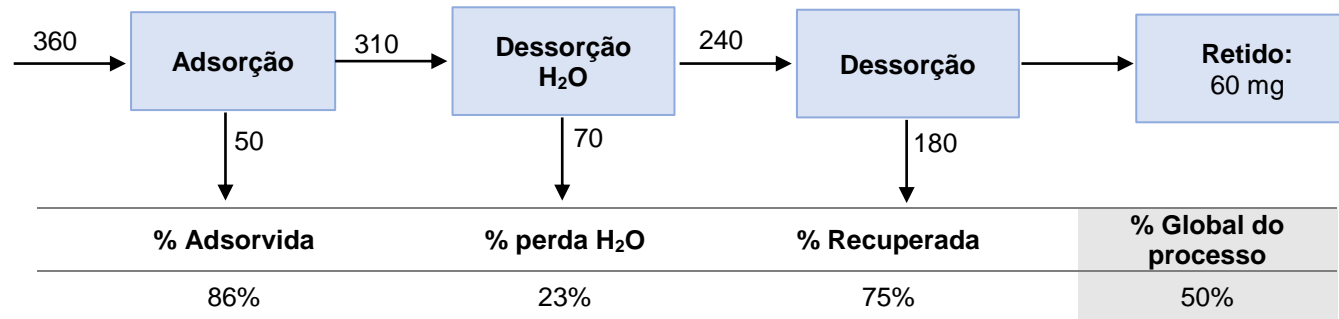


Figura 5.8 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1641.

Tabela 5.14 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1642.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,03	0,09	0,09
[Hidroxitirosol] (mg/L)	12000	1700	800	2400
Hidroxitirosol (mg)	360	50	70	220
% Hidroxitirosol	-	14%	23%	92%

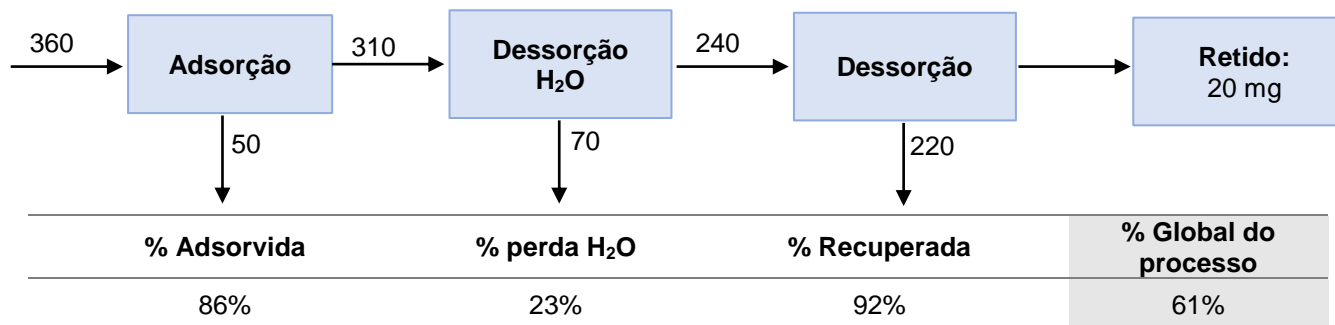


Figura 5.9 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1642.

Tabela 5.15 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1643.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,03	0,15	0,15
[Hidroxitirosol] (mg/L)	12000	1700	460	1500
Hidroxitirosol (mg)	360	50	70	220
% Hidroxitirosol	-	14%	23%	92%

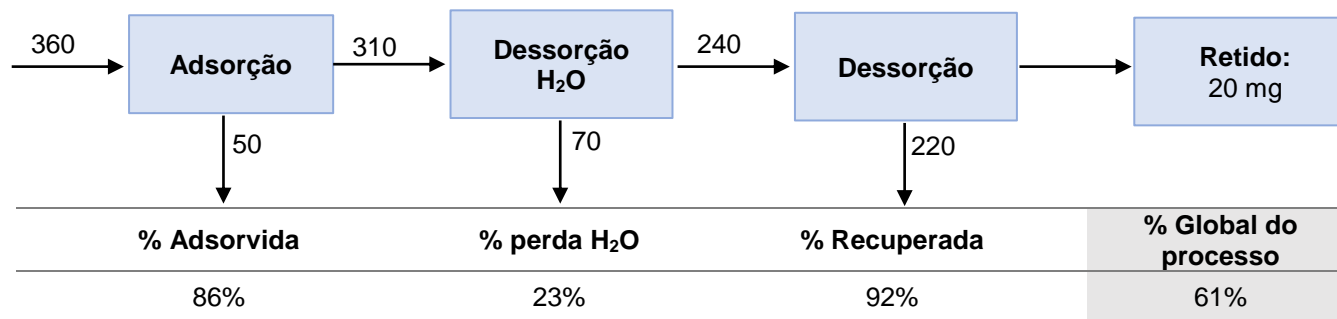


Figura 5.10 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1643.

Tabela 5.16 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1645.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,3	1	1
[Hidroxitirosol] (mg/L)	12000	1900	500	1900
Hidroxitirosol (mg)	3600	550	500	1900
% Hidroxitirosol	-	15%	16%	75%

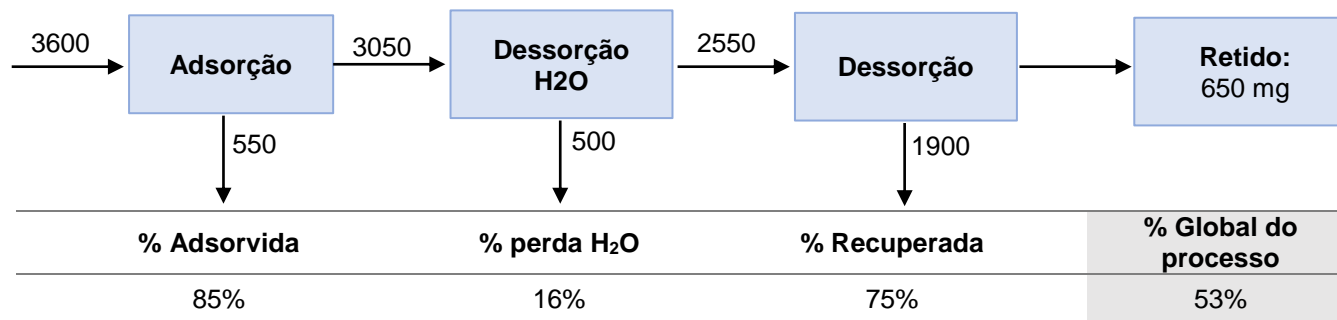


Figura 5.11 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1645.

Tabela 5.17 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 16410.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	1º Dessorvido	2º Dessorvido	2º Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,45	1,45	1,33	1,40	0,74
[Hidroxitirosol] (mg/L); (mg/L GAE)	12000	1800	700	2200	750	200
Hidroxitirosol (mg)	6000	800	1000	2900	1050	150
% Hidroxitirosol	-	13%	19%	69%	81%	60%

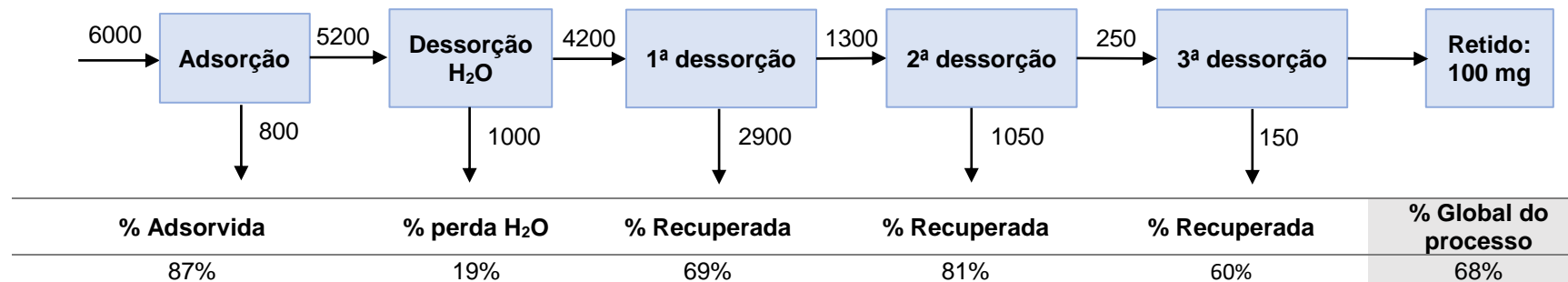


Figura 5.12 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS16410.

Tabela 5.18 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 16411.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O
Volume recuperado (L)	-	0,50	0,75
[Hidroxitirosol] (mg/L GAE)	12000	3600	1150
Hidroxitirosol (mg)	6000	1800	850
% Hidroxitirosol	-	30%	20%

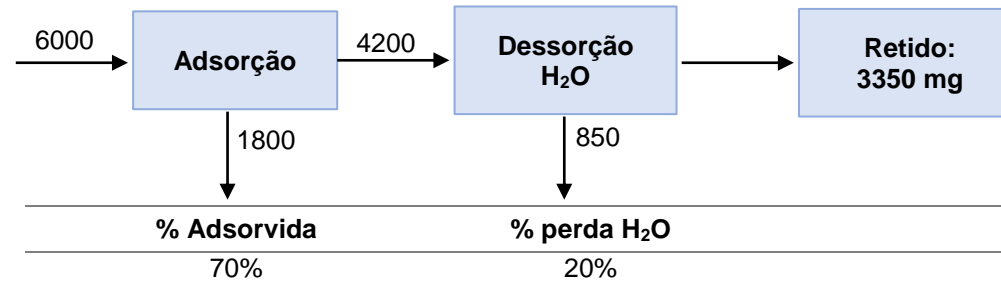


Figura 5.13 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol até ao passo de dessorção com água do processo ADS 16411.

D3. Aplicação em *spray-drying*

Tabela 5.19 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1646.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,3	0,9	0,9
[Hidroxitirosol] (mg/L GAE)	12000	2110	460	1800
Hidroxitirosol (mg)	3600	650	420	1620
% Hidroxitirosol	-	18%	14%	63%

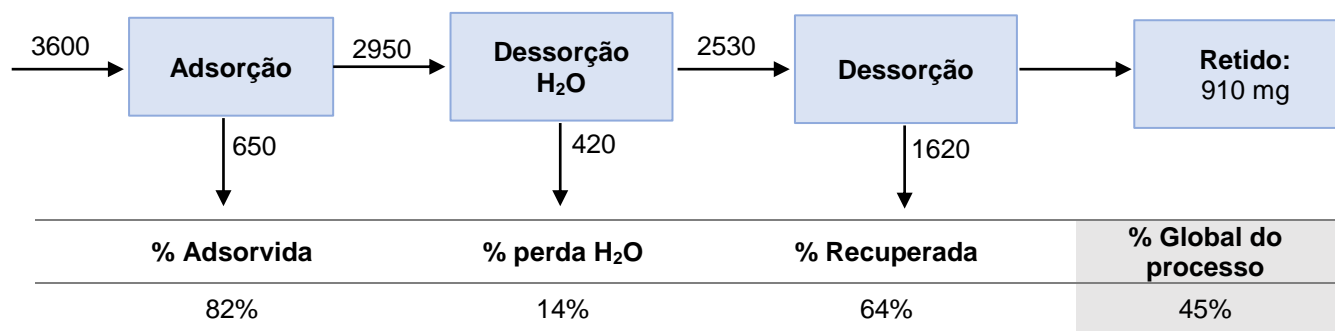


Figura 5.14 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1646.

Tabela 5.20 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1647.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,3	0,9	0,9
[Hidroxitirosol] (mg/L GAE)	12000	1700	550	1750
Hidroxitirosol (mg)	3600	510	500	1580
% Hidroxitirosol	-	14%	16%	61%

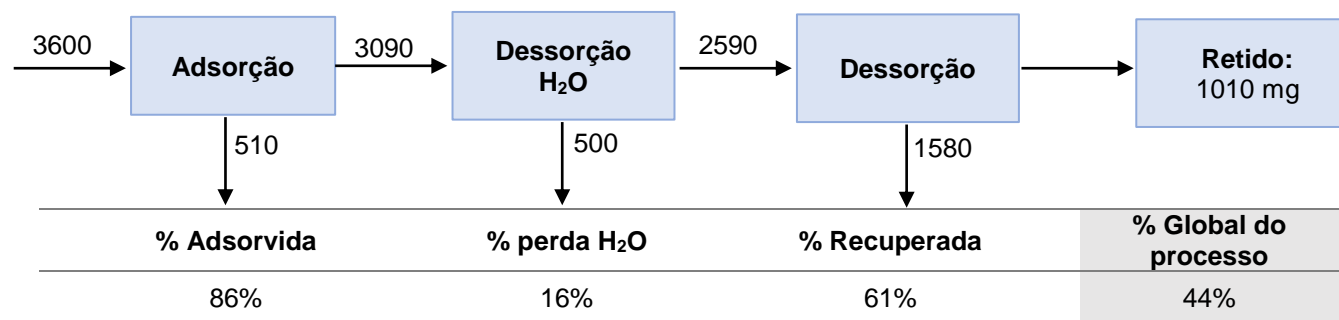


Figura 5.15 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1647.

Tabela 5.21 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1648.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,3	0,9	0,9
[Hidroxitirosol] (mg/L GAE)	12000	2500	500	1800
Hidroxitirosol (mg)	3600	750	450	1600
% Hidroxitirosol	-	21%	16%	67%

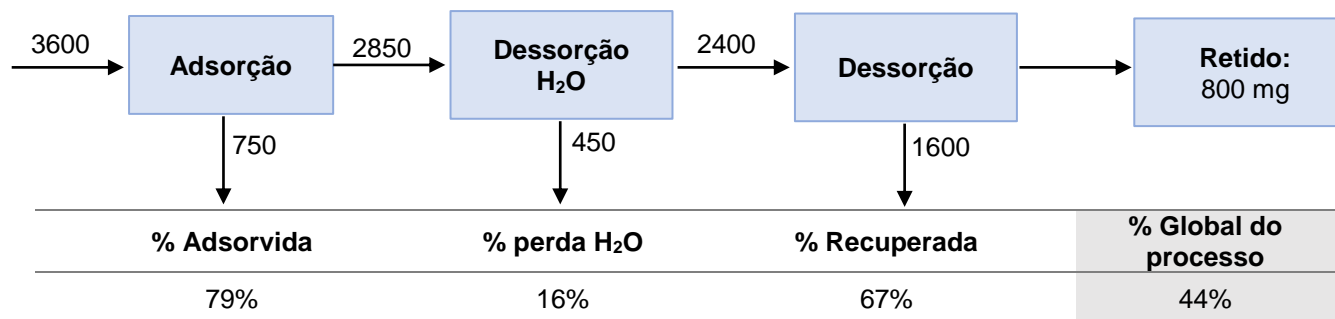


Figura 5.16 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1648.

Tabela 5.22 - Massa de hidroxitirosol obtida em cada um dos passos do processo ADS 1649.

	Alimentação	Não adsorvido	Dessorvido com H ₂ O	Dessorvido
Volume recuperado (L)	-	0,3	0,9	0,9
[Hidroxitirosol] (mg/L GAE)	12000	2200	580	1400
Hidroxitirosol (mg)	3600	660	520	1260
% Hidroxitirosol	-	18%	18%	52%

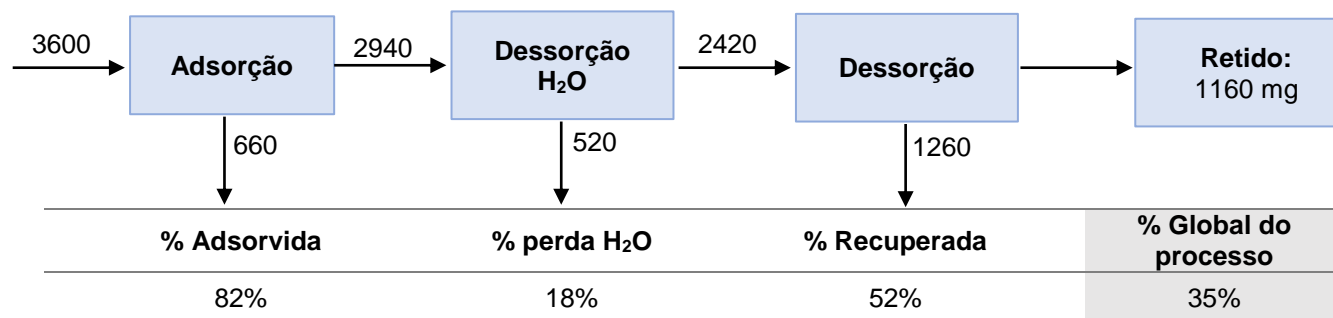


Figura 5.17 - Esquema do balanço mássico do hidroxitirosol ao longo do processo ADS1649.

D4. Quantificação de fenóis totais, hidroxitirosol e tirosol das amostras

Tabela 5.23 - Absorvâncias medidas e concentrações de hidroxitirosol e tirosol calculadas para efluentes de vários processos de adsorção/dessorção realizados ao longo do trabalho.

Processo	Efluente	Absorvância média	[fenóis totais] (mg GAE/L)	[HT] (mg GAE/L)	[TY] (mg GAE/L)
ADS 1646	NADS	0,4049	3654	2110	617
	DSS H ₂ O	0,1728	795	459	351
	DSS não evap.	-	-	1780	304
	DSS evap.	0,2887	52396	30264	5165
ADS 1647	NADS	0,3242	2936	1696	550
	DSS H ₂ O	0,2058	942	544	364
	DSS não evap.	-	-	1744	298
	DSS evap.	0,2827	51329	29648	5066
ADS 1648	NADS	0,4832	4350	2512	682
	DSS H ₂ O	0,1882	863	499	357
	DSS não evap.	-	-	1758	300
	DSS evap.	0,2849	51732	29881	5103
ADS 1649	NADS	0,4126	3722	2150	624
	DSS H ₂ O	0,2172	992	573	369
	DSS não evap.	-	-	1363	236
	DSS evap.	0,2196	40108	23167	4019
ADS 16410	NADS 10 min	0,8170	3659	2113	618
	NADS 30 min	0,7566	3390	1958	593
	NADS 1h	0,7224	3238	1870	579
	NADS 2h	0,8053	3607	2083	613
	NADS 3h	0,7287	3266	1886	581
	NADS 16h	0,7049	3160	1825	571
	DSS H ₂ O 10 min	0,5456	981	567	368
	DSS H ₂ O 30 min	0,5155	927	536	363
	DSS H ₂ O 1 h	0,4890	880	508	359
	DSS H ₂ O 2 h	0,6058	1088	628	378
	DSS H ₂ O 3 h	0,6360	1142	659	383
ADS 16411	NADS 10min	0,8071	7229	346	951
	NADS 1h	0,7020	6295	302	864
	NADS 3h	0,6650	5966	286	833
	NADS 16 h	0,6954	6236	299	858
	DSS H ₂ O 10 min	0,3705	1674	160	433
	DSS H ₂ O 1 h	0,4098	1848	177	449
	DSS H ₂ O 2 h	0,3921	1770	170	442
	DSS H ₂ O 3 h	0,4331	1952	187	459

E. Método de fenol-sulfúrico – Reta de calibração e concentração de amostras

Tabela 5.24 - Absorvâncias medidas para concentrações de glucose conhecidas.

Concentração D(+)-glucose (g/L GE)	Absorvância média
0	0,021
0,005	0,048
0,010	0,100
0,025	0,205
0,050	0,442
0,065	0,600
0,085	0,774
0,100	0,893

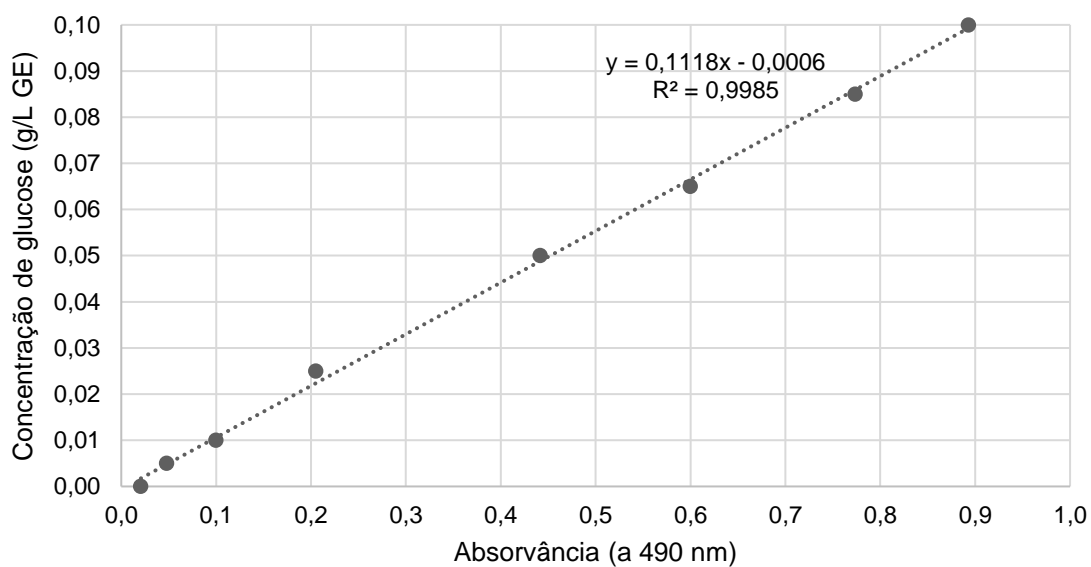


Figura 5.18 - Reta de calibração para o método fenol-sulfúrico.

Tabela 5.25 - Absorvâncias medidas e concentrações de hidratos de carbono calculadas.

Amostra	Absorvância média	[Hidratos de carbono] (g/L GE)
RO164	0,3738	4,12
NADS 1645	0,4822	2,67
NADS 1647	0,5533	1,23
DSS H2O 1645	0,3333	0,37
DSS H2O 1647	0,3399	0,37
ADS 1640 DSS EVAP	0,4900	5,42
ADS 1641 DSS EVAP	0,3397	3,74
ADS 1643 DSS EVAP	0,3235	3,56
ADS 1645 DSS EVAP	0,3125	3,43
ADS 16410 DSS EVAP	0,5183	5,73
ADS 1646 DSS EVAP	0,4318	4,77
ADS 1647 DSS EVAP	0,4405	4,87
ADS 1648 DSS EVAP	0,2984	3,28
ADS 1649 DSS EVAP	0,4714	5,21

Tabela 5.26 - Absorvâncias e concentração de hidratos de carbono calculadas para o processo ADS 16410.

Amostra	Absorvância média	[Hidratos de carbono] (g/L GE)
ADS 16410 NADS 10min	0,1187	1,27
ADS 16410 NADS 30min	0,2214	2,42
ADS 16410 NADS 1h	0,1352	1,45
ADS 16410 NADS 2h	0,2125	2,32
ADS 16410 NADS 3h	0,2003	2,18
ADS 16410 NADS 16 h	0,1418	1,53
ADS 16410 10min DSS H₂O	0,3957	0,44
ADS 16410 30min DSS H₂O	0,4309	0,48
ADS 16410 1h DSS H₂O	0,4301	0,47
ADS 16410 2h DSS H₂O	0,4312	0,48
ADS 16410 3h DSS H₂O	0,3722	0,41

F. Cromatografia gasosa

Tabela 5.27 - Áreas dos picos de cada composto volátil para várias amostras estudadas ao longo do trabalho.

Amostra	Área dos picos (UA)			
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
RO 164	5,02E+10	5,57E+09	1,31E+10	3,61E+10
ADS 1641 NADS	3,90E+09	2,77E+08	2,45E+07	2,41E+07
ADS 1642 NADS	4,06E+09	2,79E+08	2,54E+07	4,16E+07
ADS 1643 NADS	4,11E+09	3,02E+08	2,32E+07	4,60E+07
ADS 1644 NADS	3,53E+08	1,58E+08	-	-
ADS 1641 DSS H ₂ O	1,30E+09	3,59E+08	9,69E+06	1,48E+03
ADS 1642 DSS H ₂ O	9,66E+08	4,26E+08	7,35E+06	2,11E+07
ADS 1643 DSS H ₂ O	4,84E+09	3,51E+08	1,43E+07	3,50E+07
ADS 1644 DSS H ₂ O	7,18E+08	1,56E+09	2,88E+07	3,04E+08
ADS 1640 DSS EVAP	2,13E+09	1,77E+09	1,30E+08	7,17E+08
ADS 1641 DSS EVAP	1,33E+10	1,03E+10	9,07E+08	4,54E+09
ADS 1642 DSS EVAP	1,39E+10	9,16E+09	4,64E+08	2,50E+09
ADS 1643 DSS EVAP	9,64E+09	9,14E+09	5,10E+08	4,23E+09
ADS 1644 DSS EVAP	5,13E+07	1,11E+08	2,06E+06	2,17E+07
ADS 1645 DSS EVAP	6,01E+08	1,54E+09	3,42E+07	3,34E+08
RO 164	2,00E+11	2,08E+09	8,58E+10	1,49E+11
ADS 16410 DSS EVAP 48 h	4,86E+10	7,15E+08	4,18E+09	1,92E+10
ADS 16410 NÃO EVAP 48 h	1,48E+09	-	9,26E+08	1,83E+09
ADS 16410 CONDENSADO DO EVAP 48 h	-	-	8,95E+08	1,29E+09

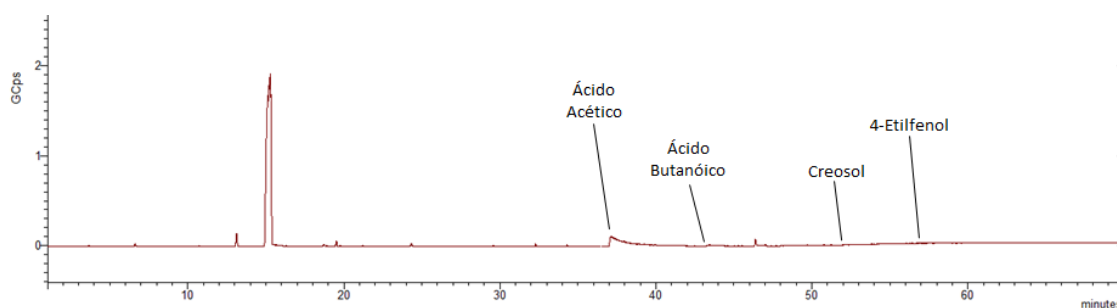


Figura 5.19 - Cromatograma da amostra "não adsorvido" do processo ADS 1641.

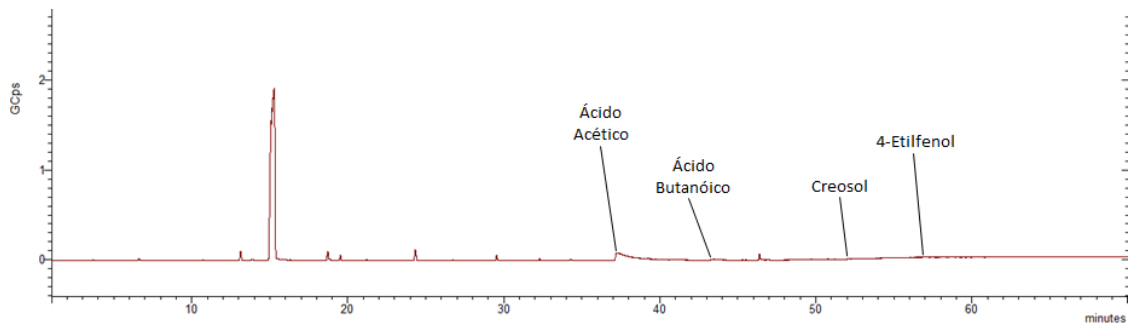


Figura 5.20 - Cromatograma da amostra "não adsorvido" do processo ADS 1642.

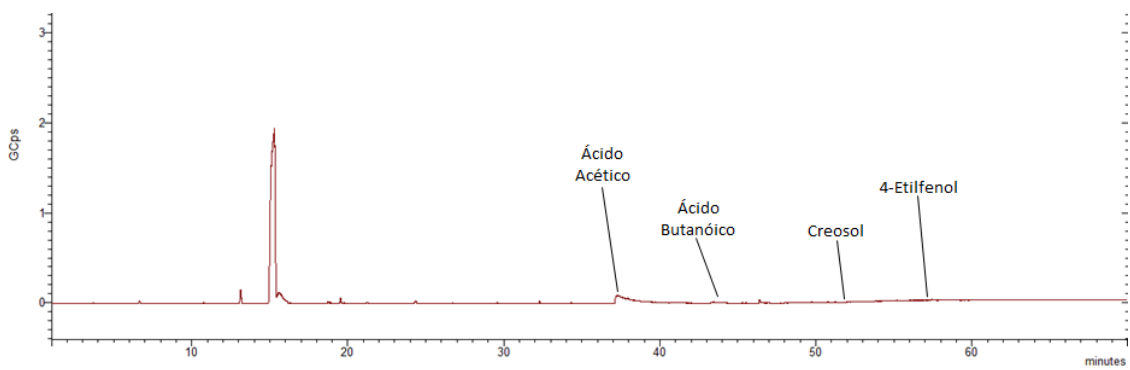


Figura 5.21 - Cromatograma da amostra "não adsorvido" do processo ADS 1643.

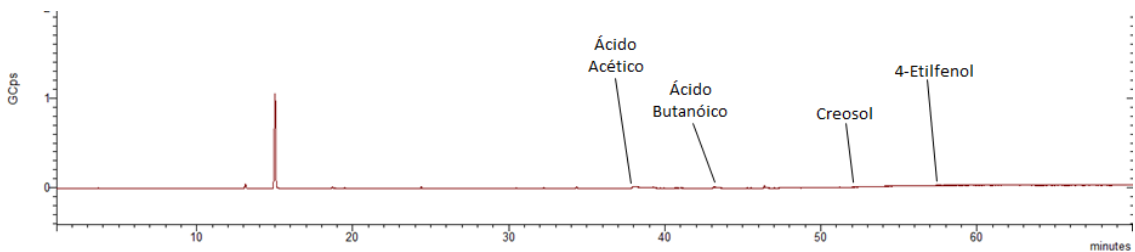


Figura 5.22 - Cromatograma da amostra "dessorvido com água" do processo ADS 1641.

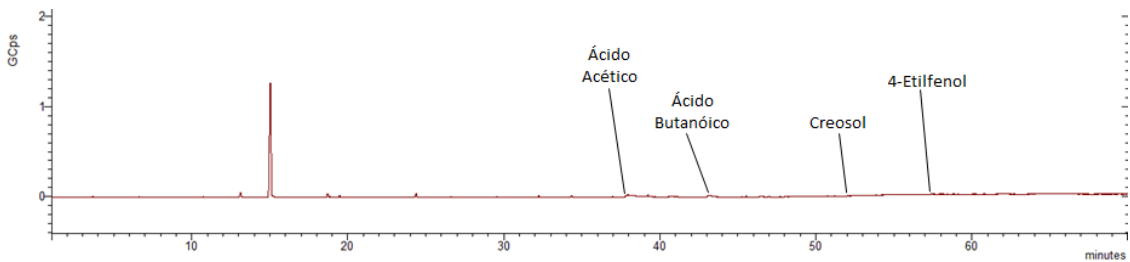


Figura 5.23 - Cromatograma da amostra "dessorvido com água" do processo ADS 1642.

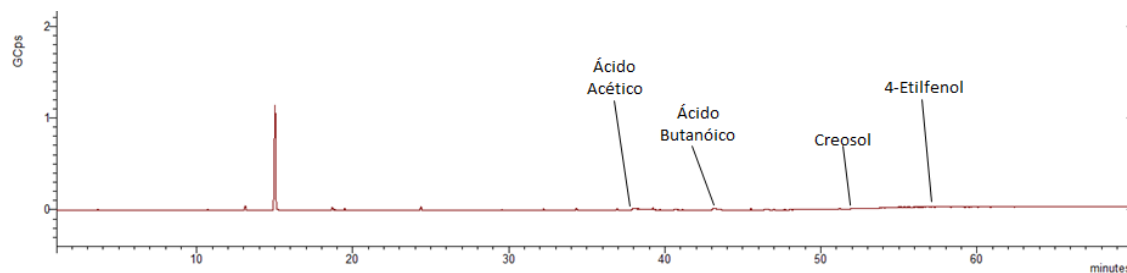


Figura 5.24 - Cromatograma da amostra "dessorvido com água" do processo ADS 1643.

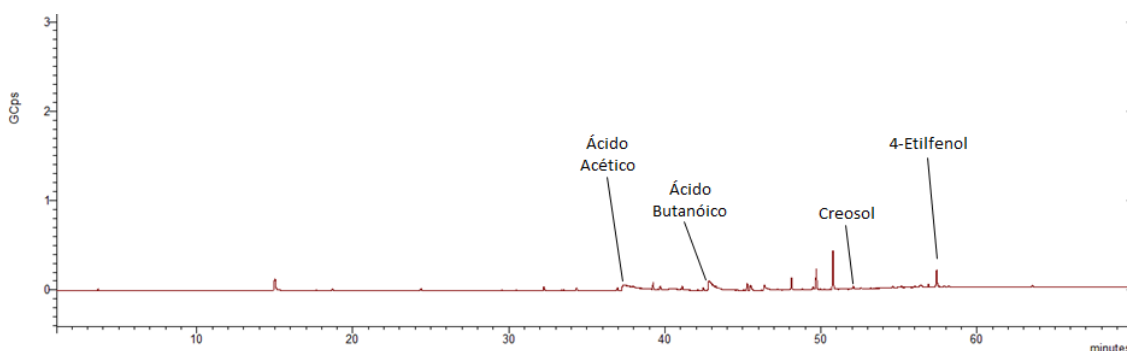


Figura 5.25 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1640.

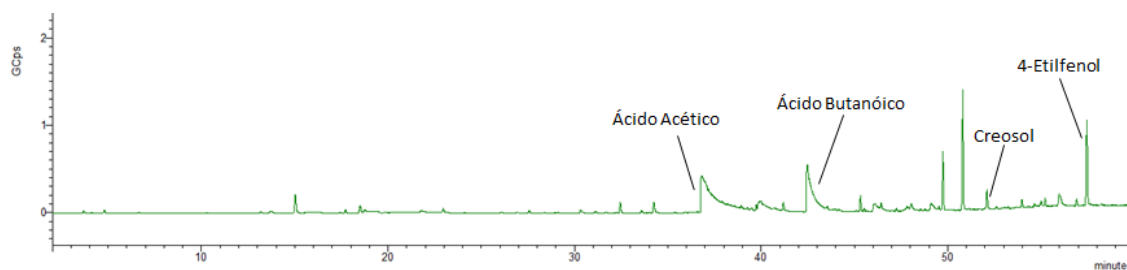


Figura 5.26 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1641.

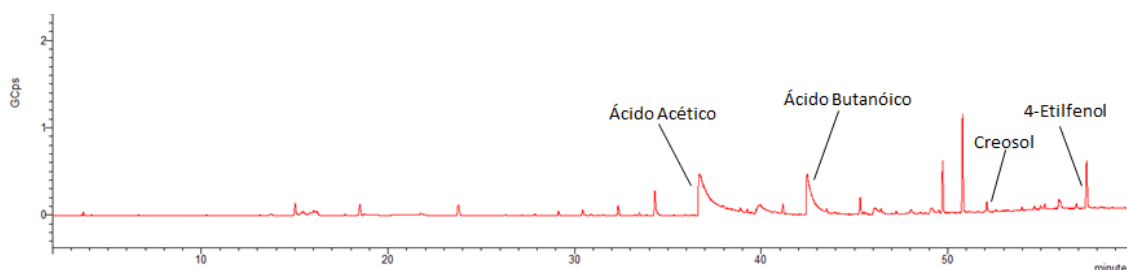


Figura 5.27 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1642.

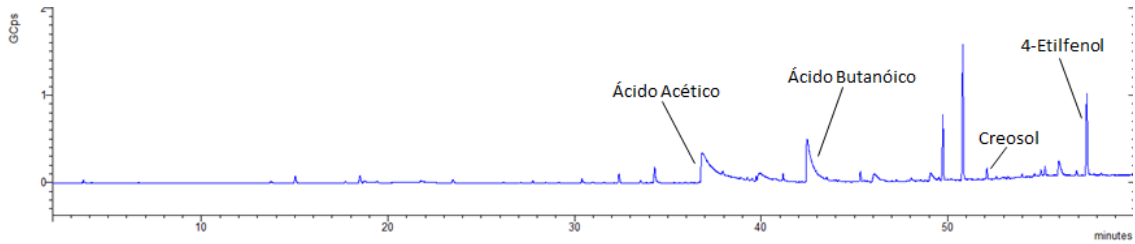


Figura 5.28 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1643.

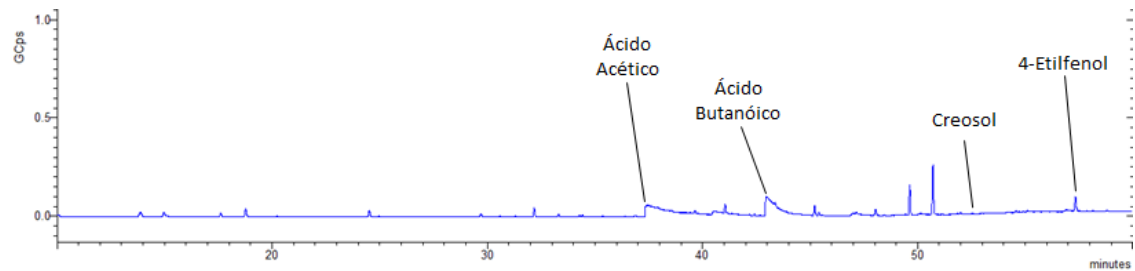


Figura 5.29 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado" do processo ADS 1645.

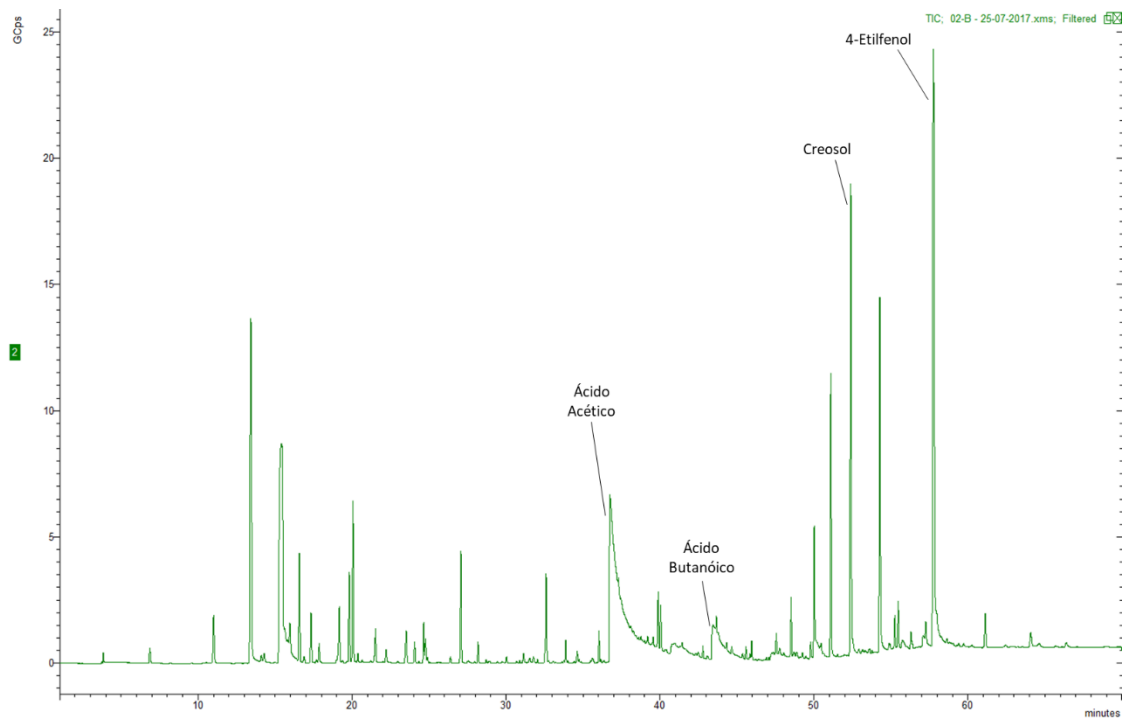


Figura 5.30 - Cromatograma da alimentação, RO 164 (após a manutenção da máquina).

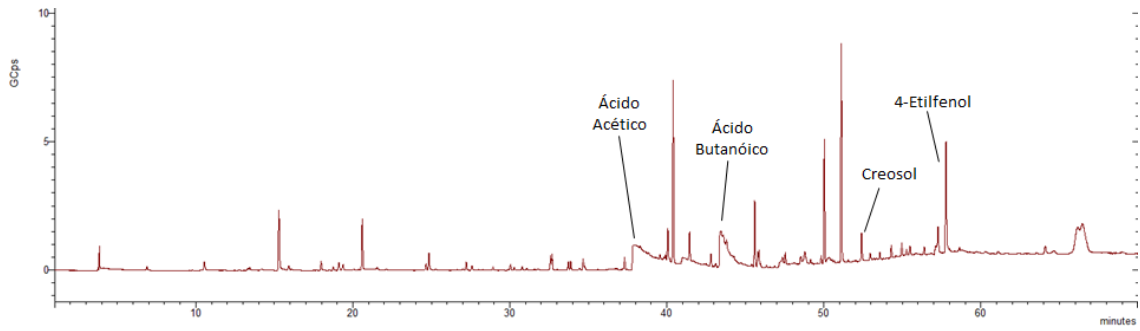


Figura 5.31 - Cromatograma da amostra "dessorvido evaporado/ desodorizado 48 h" do processo ADS 16410 (após manutenção da máquina).

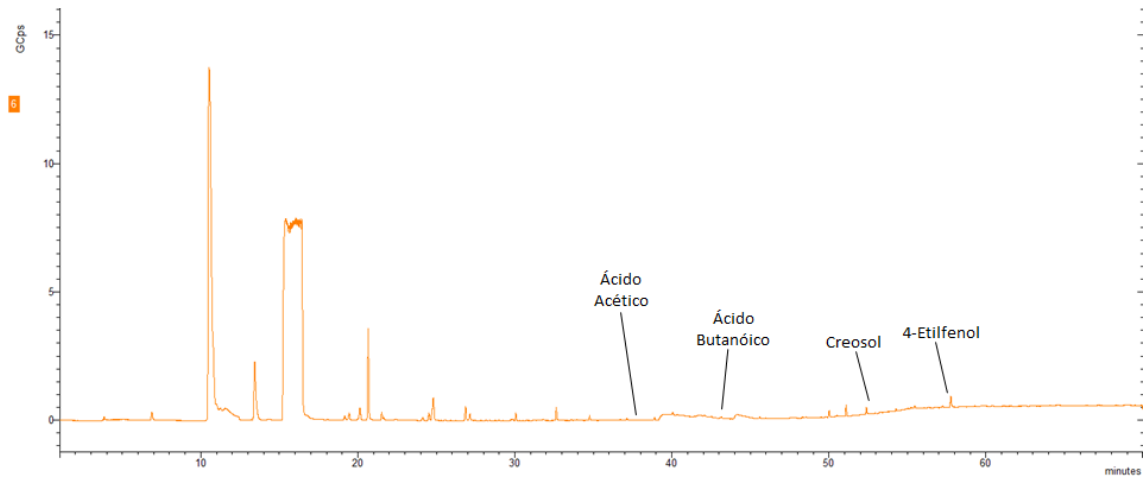


Figura 5.32 - Cromatograma da amostra "dessorvido não evaporado 48 h" do processo ADS 16410 (após manutenção da máquina).

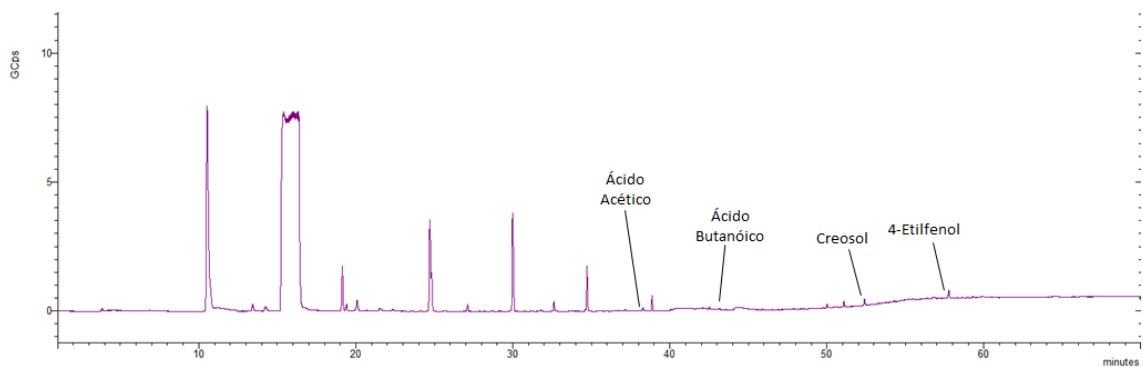


Figura 5.33 - Cromatograma da amostra "condensado do dessorvido evaporado 48 h" do processo ADS 16410 (após manutenção da máquina).