



## Avaliação do potencial antioxidante pelo método ABTS dos extratos de *trub* quente e avaliação da atividade fotoprotetora

### Evaluation of the antioxidant potential by the ABTS method of hot *trub* extracts and evaluation of the photoprotective activity

Eduarda de Oliveira Ponce Salles<sup>1</sup>, Lilian Tatiani Dusman Tonin<sup>2</sup>

#### RESUMO

Este trabalho otimizou a extração dos compostos antioxidantes do coproduto *trub* quente, proveniente da produção de cerveja artesanal e avaliou sua atividade fotoprotetora. Os extratos foram obtidos por extração por maceração dinâmica em shaker, solvente etanol/água 70/30 (v/v), utilizando-se um planejamento experimental 2<sup>2</sup>, utilizando como variáveis independentes tempo e temperatura e variável dependente a porcentagem de atividade antioxidante pelo método ABTS. A superfície de resposta demonstrou a influência das duas variáveis no processo de extração, sendo possível observar duas faixas de alta atividade antioxidante, em temperaturas mais altas (50 a 70 °C) e tempos de até 12 h, ou em temperaturas mais baixas (20 a 40 °C) e tempos mais longos, entre 20-26 h. Através da análise dos dados, a condição de extração de 4 h a 60 °C foi escolhida para ser avaliada sua atividade fotoprotetora. O extrato na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup> apresentou fator de proteção solar de 13,84 ± 0,93, demonstrando alta atividade fotoprotetora. O extrato otimizado possui potencial para aplicação nas indústrias cosméticas, alimentícias e farmacêuticas.

**PALAVRAS-CHAVE:** antioxidantes; coproduto; extração; atividade fotoprotetora.

#### ABSTRACT

This work optimized the extraction of antioxidant compounds from the hot *trub* co-product, originating from the production of craft beer, and evaluated its photoprotective activity. The extracts were obtained by extraction by dynamic maceration in a shaker, solvent ethanol/water 70/30 (v/v), using an experimental design 2<sup>2</sup>, using time and temperature as independent variables and the dependent variable the percentage of antioxidant activity by the method ABTS. The response surface demonstrated the influence of the two variables on the extraction process, making it possible to observe two bands of high antioxidant activity, at higher temperatures (50 to 70 °C) and times of up to 12 h, or at lower temperatures (20 at 40 °C) and longer times, between 20-26 h. Through data analysis, the extraction condition of 4 h at 60 °C was chosen to evaluate its photoprotective activity. The extract at a concentration of 1000 µg mL<sup>-1</sup> presented a sun protection factor of 13.84 ± 0.93, demonstrating high photoprotective activity. The optimized extract has potential for application in the cosmetic, food and pharmaceutical industries.

**KEYWORDS:** antioxidants; coproduct; extraction; photoprotective activity.

#### INTRODUÇÃO

A produção de cerveja pode ser avaliada como um processo produtivo gerador de muitos coprodutos, podendo citar o bagaço de malte, levedura de cerveja e *trub* quente, que possuem características que possibilitam, em muitos casos, serem reutilizados em outros processos industriais. O mercado brasileiro de cerveja apresenta um volume anual de 14 bilhões de litros/ano. Este valor representa cerca de 1,6% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil e faturamento anual na ordem de R\$ 77 bilhões (CERVBRASIL, 2016).

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) pertence à família Cannabaceae, é um dos principais constituintes do *trub*, é constituído de α- e β-ácidos (humulonas e lupulonas,

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: esalles@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 7069951495476981.

<sup>2</sup>Docente no Curso Licenciatura em Química/COLIQ/Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: liliandusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5182710800072951.



respectivamente), ácidos fenólicos e flavonoides, sendo o constituinte principal o xanthohumol (BOCQUET *et al.*, 2018) Os flavonoides presentes no lúpulo apresentam diversas atividades biológicas como antitumoral (PAN; BECKER; GERHÄUSER, 2005), antioxidante e antiviral (DI SOTTO *et al.*, 2005).

Os antioxidantes são substâncias que reduzem o dano oxidativo das células, atrasando ou inibindo a oxidação do substrato, bloqueando os radicais livres e prevenindo a formação de algumas doenças, tais como o câncer, aterosclerose, artrite e catarata (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As radiações solares podem gerar radicais livres na pele, os quais podem desencadear uma série de reações dermatológicas com consequências irreversíveis, até o desenvolvimento de câncer de pele (WEBBER; RIBEIRO; VELÁSQUEZ, 2005). Para prevenir e minimizar os efeitos maléficos induzidos pelas radiações solares deve-se fazer o uso de fotoprotetores, que são encontrados com diferentes fatores de proteção solar (FPS). O FPS é definido pela capacidade de um produto fotoprotetor de absorver, refletir e espalhar cerca de 95% das radiações incidentes sobre a pele (DOMIOGE *et al.*, 2002).

Esse estudo objetivou otimizar a extração dos compostos antioxidantes do coproduto da cerveja, o *trub* quente, utilizando um delineamento composto central rotacional  $2^2$  com triplicata no ponto central, variando tempo e temperatura, tendo como variável dependente a porcentagem de atividade antioxidante pelo método ABTS. O extrato otimizado foi avaliado quanto a sua atividade fotoprotetora.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### AMOSTRAS

A cerveja artesanal foi preparada no período de maio a agosto de 2019, em duplicata. Os maltes utilizados foram: 5,0 Kg Malte Pilsen e 0,86 g Malte Munich; e o lúpulo Bobek (20,0 g no tempo 60 min e 40,6 g no tempo 0,0 min). O coproduto *trub* quente foi filtrado e seco em estufa de circulação de ar (marca SOLAB, modelo 102/480) a 40 °C.

### PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos foram preparados em duplicata, pesando-se 1,0000 g do coproduto desidratado com 50,0 mL de solvente EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) (TONIN *et al.*, 2021), agitação em shaker, a 150 rpm, conforme o planejamento experimental apresentado na Tabela 1, ao abrigo da luz (C = 20 g L<sup>-1</sup>). Foram filtrados a partir da filtração simples, armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz.

### PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi conduzido um estudo de otimização do tempo e temperatura, a partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$  com triplicata no ponto central, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1 - Delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$  para otimização do tempo e temperatura de extração.**

Variáveis/Níveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Tempo (h)	0,69	4	12	20	23,3
Temperatura (°C)	23,8	30	45	60	66,2

Fonte: Autoria própria (2023).



O desenho experimental foi adequado ao seguinte modelo polinomial de segunda ordem apresentado na Equação 1.

$$y_i = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2 + \beta_4x_2^2 + \beta_5x_1x_2 \quad (1)$$

onde,  $X_1$  é o tempo de extração,  $X_2$  é a temperatura de extração e  $\beta_0$ ,  $\beta_{(1 \text{ e } 2)}$ ,  $\beta_{(3 \text{ e } 4)}$ , e  $\beta_5$  são os coeficientes de regressão para o intercepto, comportamento linear, comportamento quadrático e para o comportamento de interação entre os termos, respectivamente.

A variável dependente para o experimento foi a resposta para porcentagem de atividade antioxidante (%AA) pelo método ABTS.

#### DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS<sup>+</sup>

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi determinada segundo a metodologia adaptada de Rufino *et al.* (2007). Após 6 minutos de reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 734 nm. A atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição em relação ao controle, de acordo com a Equação 2. As análises foram realizadas em triplicata.

$$\%AA = [Ac(Aa - Ab)] \cdot Ac^{-1} \quad (2)$$

#### DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA

A atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato otimizado do *trub* quente (EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 - 4h - 60 °C) na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>, foi obtida pela determinação do fator de proteção solar (FPS), segundo metodologia descrita por Mansur *et al.* (1986) [12].

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados foram obtidos através da média das repetições ± desvio padrão e foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), com comparações múltiplas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se software Stat Soft. Inc. (2007).

#### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A proporção etanol-água utilizada na extração foi escolhida baseada em estudos recentes de Tonin *et al.* (2021), que apresentou melhores resultados de atividade antioxidante na proporção EtOH: H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v).

Os resultados de atividade antioxidante experimental e predito pelo modelo obtidos pelo método de sequestro do radical livre ABTS para os extratos do coproduto estudado estão apresentados na Tabela 2.

Os extratos que apresentaram os melhores resultados foram preparados a partir das condições 0,69 h a 45 °C, 4 h a 60 °C e 12 h a 60 °C, não apresentando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



O modelo proposto se ajustou ao ensaio de atividade antioxidante com R<sup>2</sup> de 0,7646. Os dados de ANOVA indicam que as variáveis tempo (Q), temperatura (L e Q) e a interação entre as variáveis tempo\*temperatura foram significativas no intervalo de confiança de 95% (Tabela 3).

**Tabela 2 - Resultados experimentais e preditos pelo modelo, das porcentagens de atividade antioxidante (%AA) do extrato EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 do *trub* quente.**

Tempo (h)	Temperatura (°C)	%AA ABTS	%AA ABTS
		Experimental	Predito
<b>0,69</b>	<b>45,0</b>	<b>99,42 ± 0,08<sup>a, b</sup></b>	<b>95.91</b>
4,0	30,0	89,20 ± 0,11 <sup>d, e</sup>	86.94
<b>4,0</b>	<b>60,0</b>	<b>99,74 ± 0,09<sup>a</sup></b>	<b>100.00</b>
12,0	23,8	82,97 ± 0,67 <sup>f</sup>	87.86
12,0	45,0	88,34 ± 0,24 <sup>e</sup>	87.65
12,0	45,0	83,85 ± 0,21 <sup>f</sup>	87.65
12,0	45,0	88,10 ± 0,23 <sup>e</sup>	87.65
<b>12,0</b>	<b>66,2</b>	<b>99,43 ± 0,17<sup>a, b</sup></b>	<b>99.27</b>
20,0	30,0	97,41 ± 0,52 <sup>c</sup>	93.64
20,0	60,0	97,95 ± 0,34 <sup>b, c</sup>	93.99
23,3	45,0	90,23 ± 0,43 <sup>d</sup>	94.29

Fonte: Autoria própria (2023).

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey.

A modelagem dos dados experimentais foi realizada com base no modelo representado na Equação 3:

$$\%AA \text{ ABTS} = 104.43 - 0.9169t - 0.7886T - 0.0211tT + 0.0736t^2 + 0.0146T^2 \quad (3)$$

Negligenciando-se os termos não significativos, foi obtida a Equação 4:

$$\%AA \text{ ABTS} = 93.97 - 0.5347T - 0.0327tT + 0.0583t^2 + 0.0133T^2 \quad (4)$$

**Tabela 3 - Análise de Variância (ANOVA) para a atividade antioxidante pelo método ABTS.**

Fonte de Variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	QM <sup>c</sup>	F <sup>d</sup>	Pr (F)	Significância
<b>Tempo (Q)</b>	1	751.93	751.93	78.7026	0.0000	***
<b>Tempo (L)</b>	1	30.74	30.74	3.2175	0.0779	
<b>Temperatura(L)</b>	1	801.49	801.49	83.8897	0.0000	***
<b>Temperatura (Q)</b>	1	360.58	360.58	37.7410	0.0000	***
<b>Tempo*Temperatura</b>	1	154.16	154.16	16.1350	0.0002	***
<b>Resíduo</b>	60	2435.20	9.55			

Fonte: Autoria própria (2023).

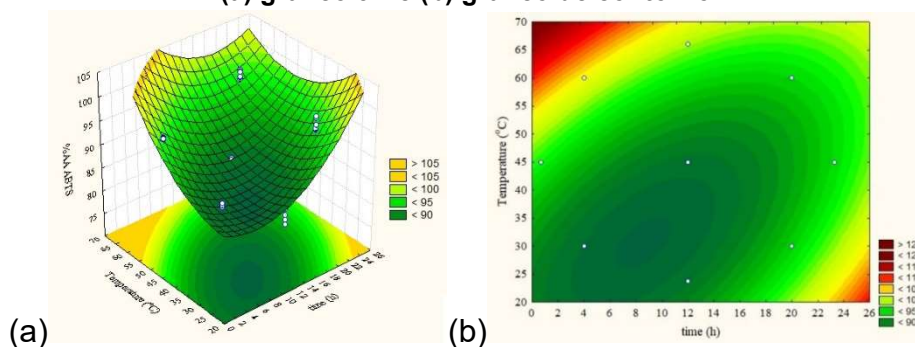
<sup>a</sup> graus de liberdade; <sup>b</sup> soma dos quadrados; <sup>c</sup> quadrados médios; <sup>d</sup> coeficiente F calculado; Pr (F) Valor do teste T (< 0,05 houve diferença significativa).

A relação entre as variáveis dependentes e independentes está representada tri- e bidimensionalmente pela superfície de resposta (Figura 1) gerada pelo modelo (Equação 4).

Pelo gráfico de superfície de resposta (Figuras 1a e 1b), pode-se observar que para a obtenção do percentual máximo de redução do radical, o extrato deve ser preparado em temperaturas mais altas (50 a 70 °C) e tempos de até 12 h, ou em temperaturas mais baixas (20 a 40 °C) e tempos mais longos, entre 20-26 h.

A atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato otimizado do *trub* quente (EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 - 4h – 60 °C) foi obtida pela determinação do fator de proteção solar (FPS) (MANSUR *et al.*, 1986). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária considera o uso adequado para produtos cosméticos com FPS  $\geq 6$  (BRASIL, 2012). O extrato apresentou FPS de  $13,84 \pm 0,93$ , demonstrando alta atividade fotoprotetora.

Figura 1 - Superfície de resposta para o teste ABTS em relação a temperatura (°C) e tempo (horas):  
(a) gráfico 3D e (b) gráfico de contorno.



Fonte: Autoria própria (2023).

A presença de diferentes componentes do extrato, principalmente compostos fenólicos e flavonoides, poderia afetar sinergicamente a fotoproteção (SEREGHETI *et al.*, 2020) Os resultados de FPS obtidos com o extrato de *trub* quente fornecem um importante ponto de partida para o desenvolvimento de formulações para preparação e/ou aprimoramento de protetores solares.

## CONCLUSÕES

A condição que apresentou excelente atividade antioxidante foi a preparada durante 4 h a 60 °C, sendo de 99,74% de captura do radical ABTS. Este extrato, na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentou alta atividade fotoprotetora com FPS de 13,84. Os resultados demonstraram o potencial antioxidante do coproduto agroindustrial, podendo ser utilizado como fonte de antioxidantes naturais para aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas.

## Agradecimentos

Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR – Campus Apucarana (LAMAP).

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.



## REFERÊNCIAS

BRASIL, 2012. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 30, de 01 de junho de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

CERVBRASIL - Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Anuário 2016. São Paulo. Disponível em <<https://bit.ly/2JK9rC0>>, acesso em 05 set. 2023.

BOCQUET, L.; et al. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, v. 17, p. 1047-1090, 2018.

DI SOTTO, A.; et al. Antiviral and Antioxidant Activity of a Hydroalcoholic Extract from *Humulus lupulus* L. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, v. 2018, p. 1-14, 2018.

DOMIOGE, N.; et al. Extrato de artêmia: em busca de proteção solar mais ampla. *Cosmetics & Toiletries*, v. 14, p. 60, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, p. 61-68, 1997.

MANSUR, J.D.S.; et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 61, p. 121-124, 1986.

PAN, L.; BECKER, H.; GERHÄUSER, C. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor and mitochondrial pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 49, p. 837-843, 2005.

RUFINO, M.S.M; et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>+</sup>. *Comunicado Técnico Embrapa*, v. 128, p. 1-4, 2007.

TONIN, L.T.D.; et al. Valorização de resíduos da produção de cerveja como fonte de compostos bioativos antioxidantes. *Exatas Online*, v. 12, p. 38-51, 2021.

WEBBER, C.; RIBEIRO, M.C.; VELÁSQUEZ, C.J.A. Nova abordagem contra os efeitos UV. *Cosmetics & Toiletries*, v.17, p.76-80, 2005.

SEREGHETI, T.M.Q.; et al. Antiproliferative and photoprotective activities of the extracts and compounds from *Calea fruticosa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 53:e9375, p. 1-8, 2020.