



## Otimização do processo de extração de compostos com habilidade quelante de Fe (II) do coproduto cervejeiro *trub* quente

### Optimization of the extraction process of compounds with Fe (II) chelating ability from hot *trub* brewing co-product

Maísa Saldanho Pinheiro<sup>1</sup>, Lilian Tatiani Dusman Tonin<sup>2</sup>

#### RESUMO

Este trabalho otimizou a extração dos compostos antioxidantes do coproduto cervejeiro *trub* quente, utilizando um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central, variando tempo e temperatura. Após secagem do resíduo, os extratos foram obtidos por extração por maceração dinâmica em shaker, utilizando como variáveis independentes tempo e temperatura e variável dependente a porcentagem de habilidade quelante de Fe (II). O tempo de 20 h na temperatura de 30 °C foi a condição que forneceu a maior habilidade quelante para o coproduto estudado. A superfície de resposta demonstrou a influência das duas variáveis no processo de extração. As condições que apresentaram melhores percentuais de atividade antioxidante foram para os extratos preparados a 20h/30 °C, 12h/45 °C e 4h/60 °C, estando todos dentro da melhor faixa obtida pela análise da superfície de resposta. O extrato demonstrou alta fonte de compostos com habilidade quelante, com potencial para aplicação nas indústrias cosméticas, alimentícias e farmacêuticas.

**PALAVRAS-CHAVE:** antioxidantes; extração, resíduos.

#### ABSTRACT

This work optimized the extraction of antioxidant compounds from the hot *trub* brewing co-product, using a 2<sup>2</sup> rotational central composite design with triplicate at the central point, varying time and temperature. After drying the residue, the extracts were obtained by extraction by dynamic maceration in a shaker, using time and temperature as independent variables and the dependent variable as the percentage of Fe (II) chelating ability. The time of 20 h at a temperature of 30 °C was the condition that provided the greatest chelating ability for the studied coproduct. The response surface demonstrated the influence of the two variables on the extraction process. The conditions that showed the best percentages of antioxidant activity were for the extracts prepared at 20h/30 °C, 12h/45 °C and 4h/60 °C, all of which were within the best range obtained by response surface analysis. The extract demonstrated a high source of compounds with chelating ability, with potential for application in the cosmetic, food and pharmaceutical industries.

**KEYWORDS:** antioxidants; extraction; waste.

#### INTRODUÇÃO

O coproduto *trub* quente é gerado a partir da produção de cerveja, após a adição do lúpulo ao mosto. No Brasil o mercado cervejeiro apresenta um volume anual de 14 bilhões de litros/ano, resultando em uma enorme quantidade de resíduo (CERVBRASIL, 2016).

Os principais constituintes do *trub* são provenientes do lúpulo. Pertencente à família Cannabaceae, espécie *Humulus lupulus* L., o lúpulo é constituído de  $\alpha$ - e  $\beta$ -ácidos, ácidos fenólicos, flavonoides e prenilflavonoides, sendo o principal o xanthohumol (BOCQUET *et al.*, 2018). Os flavonoides presentes no lúpulo apresentam diversas atividades biológicas como antitumoral (PAN; BECKER; GERHÄUSER, 2005) e antioxidante (DI SOTTO *et al.*, 2018).

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: maisapinheiro@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 4429021844600941

<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.



Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que atrasa ou inibi a oxidação de um substrato oxidável, diminuindo a concentração dos radicais livres no organismo. Os radicais livres atacam moléculas biológicas, levando a doenças degenerativas, câncer, inflamação, aterosclerose e envelhecimento precoce (LABUZA, 1971).

A extração é um dos processos de obtenção de compostos bioativos, na qual um solvente age na estrutura celular do vegetal, retirando os compostos de interesse. Há diversos fatores que influenciam o resultado final da extração, como por exemplo, o tipo e polaridade do solvente, o método de extração, tempo e temperatura. De acordo com Kowalczyk *et al.* (2013) o emprego de solventes hidroalcoólicos favorece a extração de compostos fenólicos, o que justifica a escolha do solvente utilizado.

Esse estudo objetivou otimizar a extração dos compostos antioxidantes do coproduto da cerveja, o *trub* quente, avaliando a habilidade quelante do íon Fe (II) dos extratos, utilizando um delineamento composto central rotacional  $2^2$  com triplicata no ponto central, variando tempo e temperatura.

## MATERIAIS E MÉTODOS

## 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. A secagem do coproduto foi realizada em estufa de circulação de ar (marca SOLAB, modelo 102/480) na temperatura de 40 °C até seu peso permanecer constante. Após a secagem, o produto desidratado foi triturado e armazenado em geladeira para a realização das análises.

### 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), 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).



## DETERMINAÇÃO DA HABILIDADE QUELANTE DO ÍON FERRO (II)

Para a determinação da habilidade quelante, foram adicionados a um tubo de ensaio, 3,7 mL do extrato ( $C = 20 \text{ g L}^{-1}$ ) e 0,1 mL de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,004 g em 10 mL água deionizada). Foi preparado um controle negativo ( $A_c$ ) substituindo-se o extrato por EtOH. A primeira leitura ( $A_0$ ) foi realizada em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 562 nm. Adicionou-se então a esta mistura, 0,2 mL de ferrozina (0,025 g em 10 mL de água deionizada) e depois de 10 minutos a leitura foi realizada novamente no mesmo comprimento de onda ( $A_1$ ). As análises foram realizadas em triplicata. O cálculo da porcentagem da habilidade quelante do extrato foi realizado a partir da Equação 1 (HABEYCH *et al.*, 2016).

$$\%HQ = [A_c - (A_1 - A_0)]. A_c^{-1} \quad (1)$$

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados foram obtidos através da média das repetições  $\pm$  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 de solvente etanol-água 70:30 (v/v) utilizada na extração foi escolhida baseada em estudos recentes de Tonin *et al.*, (2021) com o *trub* quente.

Os resultados de atividade antioxidante pelo método da habilidade quelante do íon Ferro (II) para os extratos do coproduto estudado estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Resultados das porcentagens de habilidade quelante (%HQ) do extrato EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 do *trub* quente.**

Tempo (h)	Temperatura (°C)	%HQ
0,69	45,0	94,99 $\pm$ 0,40 <sup>c</sup>
4,0	30,0	87,08 $\pm$ 0,67 <sup>d</sup>
4,0	60,0	96,33 $\pm$ 0,48 <sup>b, c</sup>
12,0	23,8	96,93 $\pm$ 0,76 <sup>b, c</sup>
12,0	45,0	96,77 $\pm$ 0,23 <sup>b, c</sup>
12,0	45,0	95,96 $\pm$ 0,50 <sup>b, c</sup>
12,0	45,0	96,49 $\pm$ 0,18 <sup>b, c</sup>
12,0	66,2	82,98 $\pm$ 0,60 <sup>e</sup>
<b>20,0</b>	<b>30,0</b>	<b>98,14 <math>\pm</math> 0,23<sup>a</sup></b>
20,0	60,0	72,88 $\pm$ 0,31 <sup>f</sup>
23,3	45,0	86,09 $\pm$ 1,45 <sup>d</sup>

Fonte: Autoria própria (2023).

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



O método de habilidade quelante do íon  $Fe^{+2}$  baseia-se na reação destes íons com a ferrozina. Quanto mais os compostos antioxidantes quelarem os íons, menos estarão disponíveis para reagir com a ferrozina e menor será a absorvância a 562 nm (HABEYCH *et al.*, 2016). Analisando os dados, pode-se observar que o tempo de 20 h na temperatura de 30 °C (Tabela 2) foi a condição que forneceu a maior habilidade quelante para o coproduto estudado. A alta habilidade quelante do coproduto pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos e humulonas presentes.

O modelo proposto se ajustou ao ensaio de habilidade quelante com  $R^2$  de 0,9564. Os dados de ANOVA indicam que todas as variáveis, tempo (L e Q), temperatura (L e Q) e a interação entre as duas variáveis foram significativas no intervalo de confiança de 95%. (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância para o DCCR para o método de habilidade quelante.

Fonte de variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	QM <sup>c</sup>	Valor F	F (Pr)	Significância
Tempo (Q)	1	376.94	376.94	128.70	0.0000	***
Tempo (L)	1	468.46	468.46	159.94	0.0000	***
Temperatura(L)	1	967.81	967.81	330.43	0.0000	***
Temperatura (Q)	1	451.18	451.18	154.04	0.0000	***
Tempo*Temperatura	1	1785.84	1785.84	609.72	0.0000	***
Resíduo	60	4027.60	2.93			

Fonte: Autoria própria (2023).

L: linear; Q: quadratico <sup>a</sup> graus de liberdade <sup>b</sup> soma dos quadrados; <sup>c</sup> quadrado médio; Pr (F) valor teste t (< 0,05 diferença significativa).

A modelagem dos dados experimentais foi realizada baseada no modelo representado na Equação 2, onde: t: tempo e T: Temperatura

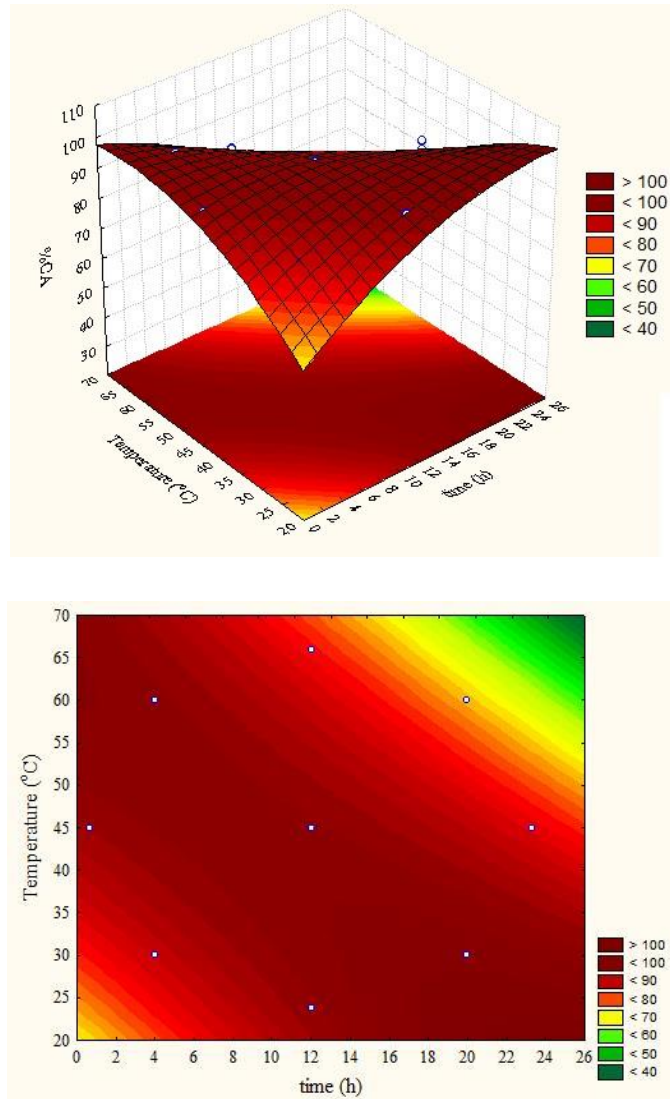
$$\%HQ = 35,1814 + 4,0954 t + 2,0336 T - 0,0719 t.T - 0,0521 t^2 - 0,0164 T^2 \quad (2)$$

A superfície de resposta bi- e tridimensional (Figuras 1a e 1b) demonstram que o máximo de habilidade quelante pode ser obtido em toda a faixa de tempo, sendo inversamente proporcional à temperatura, ou seja, o aumento do tempo de extração requer temperaturas mais baixas.

Analisando os valores de habilidade quelante da Tabela 2, pode-se observar que as condições que apresentaram maiores percentuais, 20h/30 °C, 12h/45 °C e 4h/60 °C, estão dentro da faixa proposta pelo modelo (Figura 1b). Buscando-se menor consumo energético, o extrato do *trub* pode ser preparado no menor tempo, que é de 4h, na temperatura de 60 °C, garantindo assim a extração eficiente dos compostos com habilidade quelante de Fe (II).



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



Fonte: Autoria Própria (2023).

## CONCLUSÕES

A otimização da extração dos compostos antioxidantes do coproduto da produção de cerveja artesanal, o *trub* quente, preparado com o lúpulo Bobek foi otimizada através de um DCCR  $2^2$  variando tempo e temperatura. As condições que apresentaram maiores percentuais de atividade antioxidante foram para os extratos preparados a 20h/30 °C, 12h/45 °C e 4h/60 °C, estando dentro da melhor faixa obtida pela análise da superfície de resposta. 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

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.

CERVBRASIL - Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Anuário 2016. São Paulo. Disponível em <<https://bit.ly/2JK9rC0>>, acesso em 05 set. 2021.

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.

HABEYCH, E.; et al. Strategies to limit colour changes when fortifying food products with iron. **Food Research International**, v. 88, p. 122-128, 2016.

LABUZA, T.P. Kinetics of lipidoxidation in foods. **CRC Critical Reviews in Food Technology**, v. 2, p. 355-405, 1971.

KOWALCZYK, D.; et al. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 103-110, 2013.

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.

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.