



Otimização da extração de flavonoides do coproduto cervejeiro *trub* quente

Optimization of flavonoid extraction from hot *trub* brewing co-product

Bruna Santos Soares da Costa¹, Lilian Tatiani Dusman Tonin²

RESUMO

Este trabalho otimizou a extração dos flavonoides do coproduto cervejeiro *trub* quente, utilizando um delineamento composto central rotacional 2² 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 quantificação de flavonoides utilizando cloreto de alumínio. A superfície de resposta demonstrou a influência das duas variáveis no processo de extração. As melhores respostas foram obtidas nas condições: 0,69h/45,0 °C, 4h/60,0 °C, 12h/45,0 °C, 12h/66,2 °C, 20h/30,0 °C e 23,3h/45,0 °C. não apresentando diferença significativa entre seus valores. O gráfico de superfície de resposta indica que para extrair o máximo de flavonoides o extrato deve ser preparado em temperaturas entre 45-60 °C e tempos de até 4 h. As condições testadas 0,69h/45,0 °C e 4h/60,0 °C, estão dentro desta faixa. O extrato demonstrou alta fonte de flavonoides, com potencial para aplicação nas indústrias cosméticas, alimentícias e farmacêuticas, como fonte de antioxidantes naturais.

PALAVRAS-CHAVE: antioxidantes; extração, resíduos.

ABSTRACT

This work optimized the extraction of flavonoids from the hot *trub* brewing co-product, using a 2² 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 quantification of flavonoids using aluminum chloride as independent variables. The response surface demonstrated the influence of the two variables on the extraction process. The best responses were obtained under the conditions: 0.69h/45.0 °C, 4h/60.0 °C, 12h/45.0 °C, 12h/66.2 °C, 20h/30.0 °C and 23.3h/45,0 °C. showing no significant difference between their values. The response surface graph indicates that to extract the maximum amount of flavonoids, the extract must be prepared at temperatures between 45-60 °C and times of up to 4 h. The conditions tested 0.69h/45.0 °C and 4h/60.0 °C are within this range. The extract demonstrated a high source of flavonoids, with potential for application in the cosmetic, food and pharmaceutical industries, as a source of natural antioxidants.

KEYWORDS: antioxidants; extraction; waste.

INTRODUÇÃO

A produção de cerveja é 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 (CERVBASIL, 2016).

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

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: costab@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes: 5631567092200040.

²Docente 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.



prenilflavonoides, sendo o principal o xanthohumol e outras 13 chalconas relacionadas (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).

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). Estudos comprovam que os antioxidantes, provenientes de produtos naturais e seus coprodutos podem ser usados também na preservação de alimentos, em cosméticos e para fins medicinais (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001).

Esse estudo objetivou otimizar a extração dos flavonoides do coproduto da cerveja, o *trub* quente, utilizando um delineamento composto central rotacional 2^2 com triplicata no ponto central, variando tempo e temperatura.

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:H₂O 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⁻¹). 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 DE FLAVONOIDES TOTAIS PELO MÉTODO DE AlCl₃

Os flavonoides totais foram quantificados segundo a adaptação da metodologia descrita por Woisky; Salatino (1998), com modificações de dos Santos *et al.*, (2022). A um



tubo de ensaio com tampa rosqueável foram adicionados 500,0 µL do extrato, 250,0 µL de uma solução metanólica de cloreto de alumínio 5% e 4,25 mL de metanol. A mistura foi agitada e permaneceu à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo realizou-se a leitura em espectrofotômetro de absorção UV-Vis (Cary 60, Agilent) no comprimento de onda de 420 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão de Rutina nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 100 e 200 mg L⁻¹ foi construída ($y = 0,005x - 0,021$; $R^2 = 0,995$) e os resultados foram expressos em mg de rutina 100 g⁻¹ de amostra (mg RU 100 g⁻¹).

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 temperatura de secagem é um fator importante, principalmente quando se visa manter os componentes bioativos dos produtos naturais (da SILVA *et al.*, 2017). Neste sentido, o *trub* quente foi seco a 40 °C a fim de não degradar seus compostos. A secagem durou em torno de 48 h, com um rendimento de aproximadamente 24%.

A extração é uma operação unitária que envolve transferência de massa. Neste processo o solvente age na estrutura celular do vegetal, extraindo 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 SANTANA *et al.*, 2017; TZIA, C.; LIADAKIS, 2003). 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. A proporção etanol-água foi escolhida baseada em estudos recentes, de acordo com Tonin *et al.*, (2021), que apresentou melhores resultados de atividade antioxidante na proporção EtOH: H₂O 70:30 (v/v).

Os resultados de quantificação de flavonoides para os extratos do coproduto estudado estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da quantificação de flavonoides totais do extrato EtOH:H₂O 70:30 do *trub* quente.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	FLV (mg RU 100 g ⁻¹)
0,69	45,0	298,65 ± 3,10^{a, b, c}
4,0	30,0	290,26 ± 5,56 ^{b, c}
4,0	60,0	314,49 ± 5,27^{a, b}
12,0	23,8	257,556 ± 1,60 ^d
12,0	45,0	318,49 ± 3,69^a
12,0	45,0	290,43 ± 2,74 ^{b, c}
12,0	45,0	292,77 ± 3,07 ^{b, c}
12,0	66,2	297,28 ± 7,57^{a, b, c}
20,0	30,0	295,06 ± 2,94^{a, b, c}
20,0	60,0	283,80 ± 8,72 ^c
23,3	45,0	298,12 ± 7,13^{a, b, c}

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.

Através da análise dos dados de quantificação de flavonoides da Tabela 2, pode-se observar que as condições que apresentaram as melhores respostas, sem apresentar diferença significativa entre seus valores ($p < 0,05$) foram: 0,69h/45,0 °C, 4h/60,0 °C, 12h/45,0 °C, 12h/66,2 °C, 20h/30,0 °C e 23,3h/45,0 °C.

O modelo proposto não se ajustou ao ensaio de quantificação de flavonoides com R^2 de 0,4013. Os dados de ANOVA indicam que as variáveis 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 a quantificação de flavonoides.

Fonte de variação	GL ^a	SQ ^b	QM ^c	Valor F	F (Pr)	Significância
Tempo (Q)	1	28.98	28.98	0.1210	0.1414	
Tempo (L)	1	531.96	531.96	2.2209	0.7292	
Temperatura(L)	1	3526.43	3526.43	14.7225	0.0003	***
Temperatura (Q)	1	3103.31	3103.31	12.9560	0.0006	***
Tempo*Temperatura	1	1889.04	1889.04	7.8866	0.0067	***
Resíduo	60	24004.05	239.53			

Fonte: Autoria própria (2023).

L: linear; Q: quadratico^a graus de liberdade^b soma dos quadrados; ^c 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

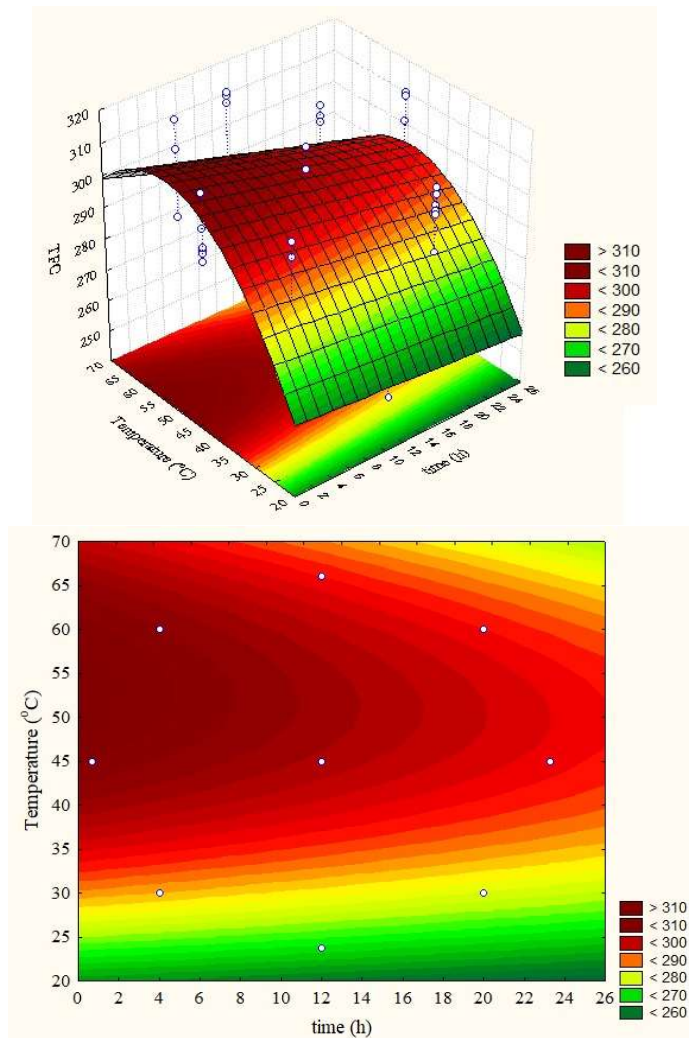
$$FLV = 155,14 + 2,5637 t + 5,3185 T - 0,0739 t.T + 0,0145 t^2 - 0,0429 T^2 \quad (2)$$

Negligenciando os termos não significativos, a Equação preditiva final 3 foi obtida e gráficos de superfície tridimensionais e bidimensionais (Figuras 1a e 1b) foram construídos:

$$FLV = 186,41 + 4,6916 T - 0,0127 t.T + - 0,0441 T^2 \quad (3)$$

O gráfico de superfície indica que para extrair o máximo de flavonoides o extrato deve ser preparado em temperaturas entre 45-60 °C e tempos de até 4 h. As condições testadas 0,69h/45,0 °C e 4h/60,0 °C, estão dentro desta faixa, e apresentaram as melhores respostas para flavonoides totais. Considerando o menor gasto energético, a melhor condição a ser empregada na extração de flavonoides do *trub*, é 0,69h a 45,0 °C.

Figura 1 - Superfície de resposta para a quantificação de flavonoides 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 flavonoides 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 melhores respostas foram para os extratos preparados em 0,69h/45,0 °C e 4h/60,0 °C, estando dentro da melhor faixa obtida pela análise da superfície de resposta. Os resultados demonstraram alto conteúdo de flavonoides neste coproduto, sugerindo sua 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.

da SILVA, C. F. G.; et al. Otimização do processo de extração de compostos fenólicos do jiló (*Solanum gilo Radl*) e aplicação na estabilidade oxidativa do óleo de soja. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 729-739, 2017.

de SANTANA, F. C.; et al. Optimization of the antioxidant polyphenolic compounds extraction of yellow passion fruit seeds (*Passiflora edulis Sims*) by response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 3552–3561, 2017.

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.

dos SANTOS, G. J.; et al. Valorization of Wastes from the Juice Passion Fruit Production Industry: Extraction of Bioactive Compounds from Seeds, Antioxidant, Photoprotective and Antiproliferative Activities. **Waste and Biomass Valorization**, 2022.

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.

KOWALCZYK, D.; SWIECA, M.; CICHOCKA, J.; GAWLIK-DZIKI, U. 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.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - Recent developments. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, p. 401–413, 2001.

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.

TZIA, C.; LIADAKIS, G. Extraction optimization in food engineering. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003.

WOISKY, R. G., SALATINO, A.: Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99–105, 1998.