

Otimização do processo de extração de compostos com atividade antioxidante do talo de beterraba (*Beta vulgaris* L.)

Extraction process optimization of compounds with antioxidant activity of beet stems (*Beta vulgaris* L.)

RESUMO

A beterraba é frequentemente estudada e reportada como fonte de diversos compostos bioativos, porém, em atividades de processamento e comercialização, tem suas folhas e talos descartados. A otimização do processo de extração de compostos com atividade antioxidante do talo da beterraba foi realizada por Metodologia de Superfície de Resposta utilizando três variáveis independentes (tempo, temperatura e concentração de solvente extrator). O efeito combinado das variáveis selecionadas foi estudado com um Delineamento Composto Central Rotacional. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos Folin-Ciocalteu, DPPH e ABTS. As condições ótimas globais de extração determinadas foram 5 min, 80°C e 50% de etanol, que produziram valores de: 13,157 mg AG/g (EAG), 21,539 µmol Trolox/g (ET-DPPH) e 250,190 µmol Trolox/g (ET-ABTS). O talo de beterraba mostrou-se uma alternativa viável de recuperação de compostos com atividade antioxidante.

PALAVRAS-CHAVE: Resíduo. Valorização. Metodologia de Superfície de Resposta.

ABSTRACT

Beet is commonly studied and reported as a source of several bioactive compounds, but it has its leaves and stems discarded in processing and marketing activities. The extraction process optimization of compounds with antioxidant activity of beet stems was performed by Response Surface Methodology using three independent variables (time, temperature and extraction solvent concentration). The combined effect of the selected variables was studied with a Central Rotational Composite Design. The antioxidant activity was evaluated by the folin-ciocalteu, dpph and abts methods. The overall optimum extraction conditions determined were 5 min, 80°C and 50% ethanol, which yielded values of: 13,157 mg AG/g (EAG), 21,539 µmol Trolox/g (ET-DPPH) e 250,190 µmol Trolox/g (ET-ABTS). Beet stems was shown to be a viable alternative of antioxidant activity compounds recovery.

KEYWORDS: Residue. Valorization. Response Surface Methodology.

Emanuelli Backes
emanuelib@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Aziza Kamal Genena
azizakg@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Muito comuns em sistemas biológicos e em alimentos, as reações de oxidação são responsáveis por diversos efeitos deletérios à saúde e qualidade de alimentos. A utilização de antioxidantes faz-se eficaz nestas situações, visto que atuam em processos mediados por radicais livres, ou seja, compostos quimicamente instáveis e responsáveis pela origem do processo oxidativo. Os produtos antioxidantes naturais são preferidos em comparação aos sintéticos, uma vez que são mais seguros, não são associados a nenhum efeito deletério e podem apresentar, simultaneamente, vários outros benefícios para a saúde humana (TRAN et al., 2017).

A atividade industrial gera diariamente milhares de toneladas de resíduos sem aproveitamento ou com baixo valor agregado. Este material tem sido reconhecido como uma fonte natural de diversos compostos bioativos associados a vários efeitos benéficos à saúde, o que torna os resíduos da indústria de alimentos um alvo para obtenção de ingredientes com alto valor nutricional e comercial agregado (COSTA et al., 2017).

A beterraba (*Beta vulgaris* L.), tradicional raiz consumida por todo o mundo, possui características bioativas e funcionais devido à presença de compostos como, por exemplo, carotenoides, polifenóis e flavonoides, além do conteúdo de fibras (NISTOR et al., 2017). Vários dos compostos presentes em alta concentração na beterraba possuem atividade antioxidante reconhecida. No processamento e comercialização as beterrabas são separadas dos talos e folhas, que são descartados. Diversos compostos fenólicos são encontrados em grande quantidade no resíduo de beterraba, entretanto, a falta de conhecimento relacionado ao valor biológico destes resíduos leva ao não aproveitamento desta abundante fonte de antioxidantes naturais (BIONDO et al., 2014).

A etapa de extração de compostos bioativos de matrizes naturais requer atenção, visto que os compostos químicos de interesse serão extraídos dos materiais vegetais para posterior separação e caracterização. Inúmeras são as variáveis associadas a um processo de extração, porém, a recuperação máxima dos compostos de interesse é sempre desejada, visando o bom aproveitamento da fonte natural, bem como economia de recursos (ALTEMIMI et al., 2017).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas empregadas para otimização de processos e modelagem. Esta ferramenta é muito útil em diversos ramos da pesquisa, visto que permite determinar as condições que levem à uma resposta máxima (BACKES et al., 2018).

Este trabalho utilizou um planejamento experimental associado à MSR e objetivou determinar as condições ótimas de extração de compostos com atividade antioxidante do talo de beterraba.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os talos de beterraba (TB) foram higienizados, separados das folhas, secos à $40 \pm 1^\circ\text{C}$ (Estufa Incubadora, NI-1705) até peso constante e, em seguida, triturados em moinho de facas (SOLAB, SL31) com peneira de 30 *mesh*. A amostra foi submetida a processo de extração assistida por calor (EAC), também conhecida como maceração. As variáveis independentes relevantes no processo foram: tempo (*t*), temperatura de extração (*T*) e concentração do solvente extrator (*S*).

Amostras de TB seco foram extraídas com solvente (álcool etílico) em banho termostático (TECNAL, TE-184) à 100 mg/mL. O extrato foi mantido sob agitação e ao abrigo da luz. As variáveis e intervalos estudados foram *t* (X1; 5 a 85 min), *T* (X2; 20 a 80°C) e *S* (X3; 0 a 100%). Os valores codificados das variáveis independentes são apresentados na Tabela 1 no Apêndice. O efeito combinado das três variáveis selecionadas

para análise foi estudado utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três repetições no ponto central.

O ajuste dos dados obtidos na Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para geração de um modelo matemático foi realizado por meio do cálculo dos mínimos quadrados, a partir da equação polinomial de segunda ordem, como ilustrado na Eq. (1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

onde Y é a variável dependente (variável de resposta; varia em cada método de análise da atividade antioxidante) a ser modelada, X_i e X_j definem as variáveis independentes, β_0 é um coeficiente constante (média), β_i o coeficiente de efeito linear, β_{ij} o coeficiente do efeito de interação, β_{ii} o coeficiente do efeito quadrático e n o número de variáveis.

O tratamento dos dados obtidos e gráficos de superfície 3D foram realizados com auxílio do *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). O teste F de Fisher ($\alpha = 0,05$) foi utilizado para a avaliação da adequação dos modelos para descrever os dados observados.

Os extratos resultantes foram centrifugados (centrífuga refrigerada CT 5000-R; 600 rpm; 15 min) e filtrados através de papel filtro (Whatman nº 4) para remoção dos sólidos suspensos. Em seguida foram realizados métodos para análise da atividade antioxidante dos extratos de forma a determinar as condições de extração que maximizem tal.

A determinação do teor de fenólicos totais (TFT) dos extratos foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu (AINSWORTH e GILLESPIE, 2007) e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG), mg AG/g. A atividade antioxidante dos extratos pelo método DPPH• foi realizado de acordo com descrito por Mensor et al. (2001) e os resultados foram expressos como equivalente de Trolox (ET-DPPH), $\mu\text{mol Trolox/g}$. A avaliação da atividade antioxidante dos extratos pelo do método ABTS•⁺ foi conduzida de acordo com metodologia descrita por Re et al. (1999) e os resultados foram expressos como equivalente de Trolox (ET-ABTS), $\mu\text{mol Trolox/g}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A boa repetibilidade dos dados experimentais nos três métodos antioxidantes avaliados pode ser verificada por meio da obtenção de valores bastante semelhantes nos ensaios das repetições dos pontos centrais do desenho experimental (ensaios 15, 16 e 17 na Tabela 2 do Apêndice).

De forma geral, observou-se que as diferentes condições de extração impostas foram capazes de gerar variação elevada nos resultados de TFT e ET-ABTS, que assumiram valores de 3,088 à 13,377 mg AG/g e 77,838 à 250,551 $\mu\text{mol Trolox/g}$, respectivamente. Entretanto, para o método DPPH•, os distintos extratos não influenciaram nas respostas obtidas, visto que os valores de ET-DPPH apresentaram baixa variabilidade, com valores de 21,610 à 22,460 $\mu\text{mol Trolox/g}$, apenas. Os resultados obtidos nos métodos TFT e ABTS apresentaram uma correlação positiva, já observada em outros trabalhos (SOARES et al., 2008). Já para o método DPPH, pode-se inferir que os compostos antioxidantes presentes na amostra não são específicos para o sequestro do radical livre DPPH, visto que podem responder de formas distintas à diferentes radicais ou fontes oxidantes. Nenhum ensaio único é capaz de refletir precisamente todas as fontes radicais ou todos os antioxidantes em uma mistura ou sistema complexo (SOARES et al., 2008).

A estimativa dos efeitos (linear, interativo e quadrático) das variáveis independentes investigadas (X_1 , X_2 e X_3) nos três métodos avaliados está presente na Tabela 3 do Apêndice. A variável X_1 (tempo de extração) apresentou efeito não significativo (p -valor >

0,05) em todos os formatos de resposta. Esta informação permite operar o sistema em condições de maior eficiência energética, ou seja, trabalhar no menor tempo possível (dentro da faixa investigada) e gerar resultados estatisticamente iguais. Nenhum dos efeitos interativos entre as variáveis mostrou-se significativo (não causam influência na resposta (à um nível de confiança de 95%). Ao descartar os efeitos não significativos, a análise de regressão resultou em modelos matemáticos de segunda ordem para explicar o comportamento de cada formato de resposta nas diferentes condições de extração, os quais estão apresentados nas Eqs. (2), (3) e (4). As validações matemáticas dos modelos gerados (verificadas pelo teste *F* de Fisher - ANOVA) são apresentadas nas Tabelas 4, 5 e 6 do Apêndice.

$$\text{EAG (mg AG/g)} = 9,977 + 0,834 X_2 - 0,778 X_3 + 0,832 X_2^2 - 1,237 X_3^2 \quad (2)$$

$$\text{ET (}\mu\text{mol Trolox/g)} = 21,763 + 0,186 X_3^2 \quad (3)$$

$$\text{ET-ABTS (}\mu\text{mol Trolox/g)} = 192,90 + 29,68 X_2 - 12,01 X_3 - 24,63 X_3^2 \quad (4)$$

Considerados válidos pelo teste estatístico, os modelos matemáticos podem ser utilizados para gerar os gráficos de superfície de resposta (Figuras 4) que fornecem uma representação visual do comportamento da resposta de acordo com mudanças nas variáveis dependentes significativas.

A análise global dos resultados obtidos nos três métodos realizados (Folin-Ciocalteu, Método DPPH• e Método ABTS•+) demonstram que as condições que maximizaram a extração dos compostos de interesse foram de, aproximadamente, concentração de solvente de 50% e temperatura de 80°C, operando o sistema por tempos curtos (5 minutos). Estas conclusões foram obtidas ao considerar-se que nenhuma variável independente causou, efetivamente, interferência na resposta ET-DPPH.

Entretanto, com faixas de estudo utilizadas no DCCR, as condições otimizadas para extração de compostos com atividade antioxidante da amostra de talos de beterraba não foram totalmente obtidas. Para otimização do processo, as variáveis *X1* e *X3* foram fixadas em seus valores ótimos globais já determinados pelo planejamento, enquanto a variável *X2* teve faixa de estudo ampliada. Apenas o TFT e atividade antioxidante pelo método ABTS•+ foram analisados em temperaturas superiores à do planejamento experimental, conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Validação dos modelos matemáticos preditivos e resultados obtidos para os formatos de resposta EAG e ET-ABTS para variação da temperatura de extração quando as variáveis tempo e concentração de solvente são fixadas em seus pontos ótimos globais

Temperatura de extração (°C)	EAG (mg AG/g)	ET-DPPH (μmol Trolox/g)	ET-ABTS (μmol Trolox/g)
80	13,157 ± 0,111 ^a	21,539 ± 1,033	250,190 ± 2,278 ^a
85	12,999 ± 0,050 ^a	-	251,104 ± 7,731 ^a
90	12,131 ± 0,052 ^b	-	249,341 ± 2,967 ^a

* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 95% de confiança

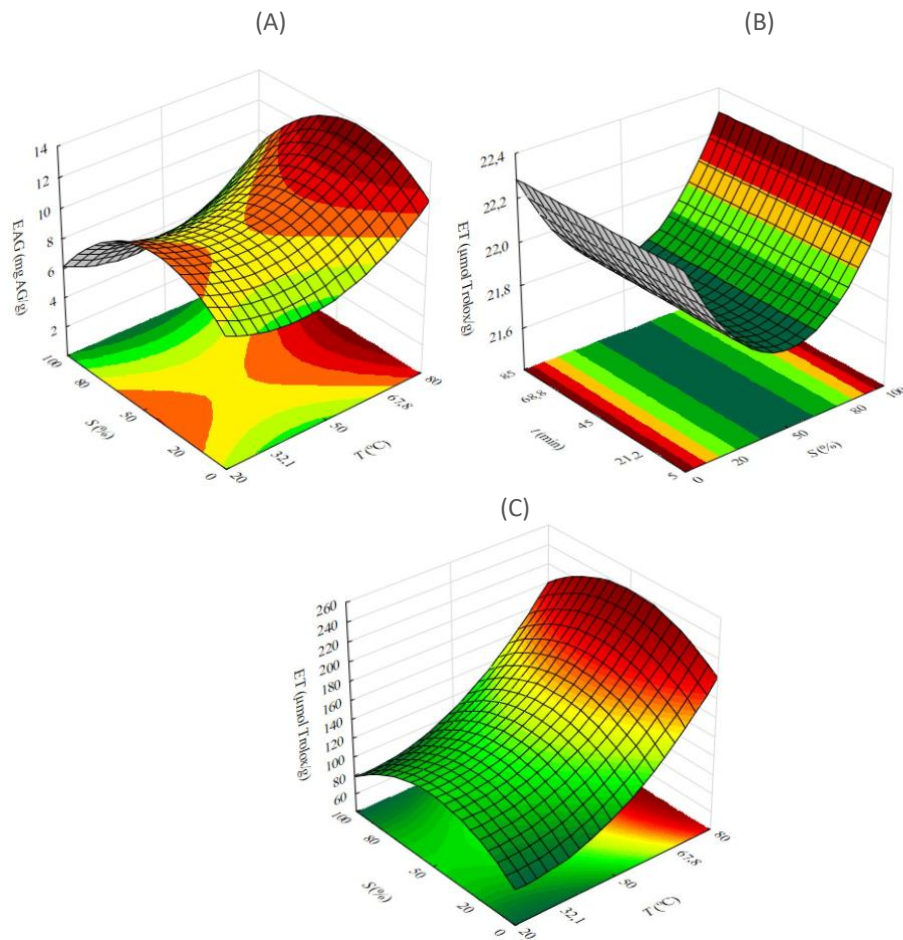
Fonte: Autoria própria (2019).

Pode-se observar que, à temperatura de 80°C, os valores dos três formatos de resposta (EAG, ET-DPPH e ET-ABTS) obtidos foram semelhantes aos preditos pelo modelo matemático gerado (13,726 mg AG/g, 21,763 μmol Trolox/g e 242,762 μmol Trolox/g, respectivamente), fator este que reforça a validação do modelo preditivo proposto.

Para o TFT, observou-se que o incremento de 5°C na máxima temperatura estudada com o planejamento (80°C) não causou diferenças significativas na resposta (EAG), enquanto o incremento de 10°C no processo de extração levou à oxidação de alguns dos compostos fenólicos presentes na amostra, visto que o EAG diminuiu significativamente. Já, ao avaliar a capacidade do extrato em sequestrar radicais ABTS, pode-se concluir que os incrementos na temperatura de extração não causaram diferenças significativas nos valores de ET-ABTS.

De maneira global, as condições ótimas de extração de compostos com atividade antioxidante da amostra de talos de beterraba foram obtidas, sendo estas: 5 minutos, 80°C e 50% de etanol.

Figura 4 - Superfície de resposta tridimensional teórica prevista com os polinômios de segunda ordem para o formato de resposta TFT (A), ET-DPPH (B) e ET-ABTS (C). A variável excluída é posicionada no ponto central



Fonte: Autoria própria (2019).

CONCLUSÃO

O talo é um resíduo direto proveniente de atividades envolvendo a beterraba, o qual, devido suas características, é uma potencial fonte de recuperação de compostos com atividade antioxidante. As condições ótimas globais obtidas para extração de compostos com atividade antioxidante do TB ao utilizar-se EAC foram: 5 min, 80°C e 50% de etanol, que se traduziram em valores de: 13,157 mg AG/g (EAG), 21,539 µmol Trolox/g (ET-DPPH)

e 250,190 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (ET-ABTS). A utilização de metodologias para identificar as condições otimizadas de um processo é fundamental para maximizar as respostas esperadas e minimizar os custos envolvidos.

REFERÊNCIAS

AINSWORTH, E.; GILLESPIE, K. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 875-877, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446889>. Acesso em: 22 jun. 2019.

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D.G.; LIGHTFOOT, D.A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **Plants**, v. 42, n. 6, p. 1-23, set. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28937585>. Acesso em: 22 jun. 2019.

BACKES, E.; PEREIRA, C.; BARROS, L.; PRIETO, M.A.; GENENA, A.Z.; BARREIRO, M.F.; FERREIRA, I.C.R.F. Recovery of bioactive anthocyanin pigments from *Ficus carica* L. peel by heat, microwave, and ultrasound based extraction techniques. **Food Research International**, v. 133, p. 197-209, nov. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918305441>. Acesso em: 22 jun. 2019.

BIONDO, P.B.F.; BOEING, J.S.; BARIZÃO, E.O.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M.; OLIVEIRA, C.C.; BOROSKI, M.; VISENTAINE, J.V. Evaluation of beetroot (*Beta vulgaris* L.) leaves during its developmental stages: a chemical composition study. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 94-101, jan./mar. 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612014000100014. Acesso em: 19 jun. 2019.

COSTA, A.P.D.; HERMES, V.S.; RIOS, A.O.; FLÔRES, S.H. Minimally processed beetroot waste as an alternative source to obtain functional ingredients. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 2050-2058, jun. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28720962>. Acesso em: 25 jun. 2019.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, mar. 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.687>. Acesso em: 03 mai. 2019.

NISTOR, O.V.; SEREMENT, L.C.; ANDRONOIU, D.G.; RUDI, L.; BOTEZ, E. Influence of different drying methods on the physicochemical properties of red beetroot (*Beta vulgaris* L. var. Cylindra). **Food Chemistry**, v. 236, p. 59-67, dez. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617307070?via%3Dihub>. Acesso em: 03 jul. 2019.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, M.Y.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, mai. 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998003153>. Acesso em: 12 mai. 2019.

TRAN, T.N.; ATHANASSIOU, A.; BASIT, A.; BAYER, I.S. Starch-based bio-elastomers functionalized with red beetroot natural antioxidant. **Food Chemistry**, v. 216, p. 324-333, fev. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461631295X>. Acesso em: 29 jun. 2019.