



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

Otimização da extração de compostos antioxidantes do coproduto *trub* quente

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM THE CO-PRODUCT HOT TRUB

Isabella Salvat Luccas*, Lilian Tatiani Dusman Tonin†

RESUMO

A produção de cerveja caracteriza-se como um processo muito difundido no Brasil, que gera muitos coprodutos, fontes de compostos bioativos. Este trabalho objetivou a otimização da extração dos compostos antioxidantes do resíduo da produção da cerveja artesanal, o *trub* quente, utilizando o lúpulo Bobek. Foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional 2^2 , variando tempo e temperatura. O coproduto foi seco a 40 °C e extraído pelo método da maceração dinâmica em shaker (150 rpm) utilizando o solvente etanol/água 70/30 (v/v). Os extratos foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. Os melhores resultados foram obtidos para os tempos de 4 e 12 horas na temperatura de 60 °C e 20 horas na temperatura de 66,2 °C, não apresentando diferença significativa entre seus valores ($p < 0,05$). Os valores de atividade antioxidante próximos de 83%, indicam esse coproduto com potencial aplicação nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: Cerveja. Planejamento experimental. Compostos fenólicos. DPPH.

ABSTRACT

Beer production is characterized as a widespread process in Brazil, which generates many co-products, sources of bioactive compounds. This work aimed to optimize the extraction of antioxidant compounds from craft beer production residue, the hot trub, using Bobek hops. An experimental design of the central composite rotational design 2^2 was carried out, varying time and temperature. The co-product was dried at 40 °C and extracted by the dynamic maceration method in a shaker (150 rpm) using the solvent ethanol/water 70/30 (v/v). The extracts were evaluated for their antioxidant activity by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl free radical scavenging method. The best results were obtained for the times of 4 and 12 hours at the temperature of 60 °C and 20 hours at the temperature of 66.2 °C, with no significant difference between their values ($p < 0.05$). Antioxidant activity values close to 83% indicate this co-product with potential application in the cosmetic, food and pharmaceutical industries.

Keywords: Beer. Experimental design. Phenolic compounds. DPPH.

1 INTRODUÇÃO

A produção de cerveja pode ser avaliada como um processo produtivo gerador de muitos resíduos, podendo citar o bagaço de malte, levedura de cerveja e *trub*, que possuem características que possibilitam, em muitos casos, serem reutilizados em outros processos industriais. O mercado brasileiro de cerveja apresenta um

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; isabellasalvat@yahoo.com.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana; liliandusman@utfpr.edu.br



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, respectivamente), ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido vanílico, ácido gálico e ácido siríngico, as formas glicosiladas dos flavonoides kaempferol, quercetina, morina e miricetina, flavan-3-óis catequina e epicatequina, *cis* e *trans*-resveratrol e prenilflavonoides, sendo o principal o xanthohumol e outras 13 chalconas relacionadas (BOCQUET et al., 2018). A quantidade de polifenóis depende da variedade do lúpulo (KAMMHUBER, 2005). Os flavonoides presentes no lúpulo apresentam diversas atividades biológicas como antitumoral (PAN; BECKER; GERHÄUSER, 2005), antioxidante e antiviral (DI SOTTO, 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 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.

2 MÉTODO

Amostras: A cerveja artesanal foi preparada pela professora Lilian Tatiani Dusman Tonin, 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).

A secagem do resíduo 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 1,0 g do resíduo 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). 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 descreve.

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 (2021).

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; isabellasalvat@yahoo.com.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana; liliandusman@utfpr.edu.br



Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH. O método do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIE; BERSET, 1995) foi realizado a partir da adição de 1,0 mL de extrato ($C = 20 \text{ g L}^{-1}$) e 2,0 mL de solução do radical DPPH (0,12 mM em MeOH) em uma cubeta. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 517 nm. Interpreta-se a atividade antioxidante como a porcentagem de inibição em relação ao controle (1,0 mL de EtOH e 2,0 mL da solução do radical DPPH). Foi feito também o preparo do branco da amostra (1,0 mL de extrato e 2,0 mL de EtOH). A atividade antioxidante foi calculada com o uso da Equação 1, onde (Aa) representa a absorbância da amostra, (Ab) a absorbância do branco da amostra e (Ac) a absorbância do controle. Os padrões BHT (butil-hidroxi-tolueno) e ácido ascórbico a uma concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ foram testados nas mesmas condições. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

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

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 o software Stat Soft. Inc. (2007).

3 RESULTADOS

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 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 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, extraíndo 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 & 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 solvente-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).

Para a otimização do tempo e temperatura de extração por maceração dinâmica utilizando EtOH:H₂O 70:30 como solvente extrator, foi realizado um DCCR 2², e os resultados de atividade antioxidante para os extratos do resíduo estudado e os padrões BHT e ácido ascórbico pelo método DPPH estão apresentados na Tabela 2.

O método colorimétrico de sequestro do radical livre DPPH é determinado pelo decréscimo da absorbância a 517 nm da solução de DPPH, que sofre redução pelos componentes presentes no extrato e formação do composto difenil-picril-hidrazina, com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo (BRAND-WILLIAMS; CUVELIE; BERSET, 1995).

A partir da análise dos dados é possível observar que os tempos de 4 e 20 h na temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e 12 h na temperatura de $66,2 \text{ }^\circ\text{C}$ foram as condições que forneceram a maior porcentagem de inibição do radical DPPH, não apresentando diferença significativa entre seus valores ($p < 0,05$). A alta atividade antioxidante dos extratos pode ser conferida a presença de compostos fenólicos presentes no lúpulo.

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; isabellasalvat@yahoo.com.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana; liliandusman@utfpr.edu.br



Tabela 2 – Resultados das porcentagens de atividade antioxidante (%AA) do trub quente.

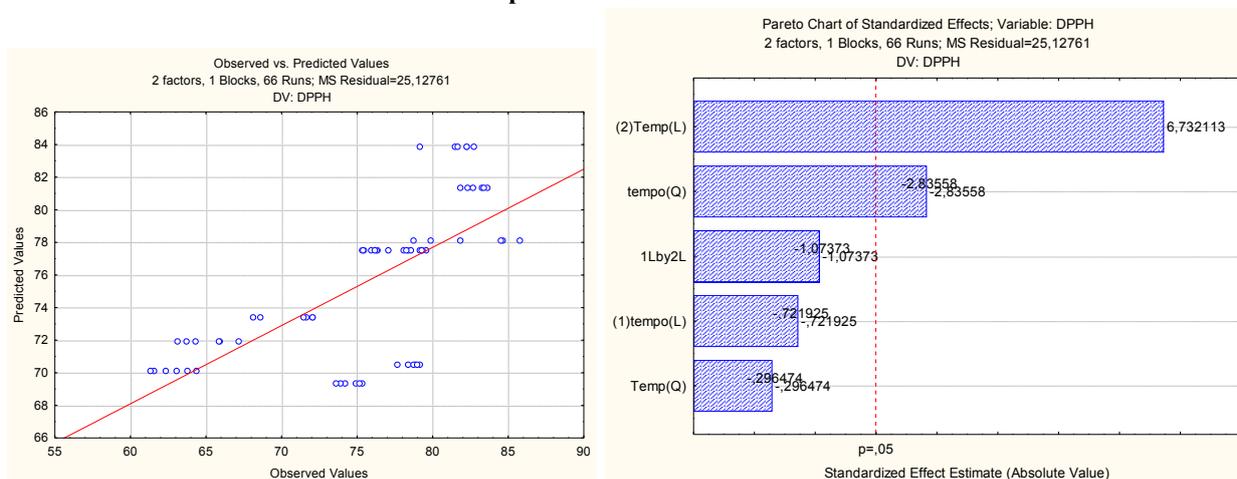
Tempo	Temperatura	DPPH
0,69	45,0	70,66 ± 0,73 ^d
4,0	30,0	74,51 ± 0,29 ^c
4,0	60,0	82,86 ± 0,29^a
12,0	23,8	62,73 ± 0,49 ^e
12,0	45,0	78,31 ± 0,54 ^b
12,0	45,0	77,19 ± 0,63 ^{b, c}
12,0	45,0	77,17 ± 0,70 ^{b, c}
12,0	66,2	81,58 ± 0,52^a
20,0	30,0	78,62 ± 0,22 ^b
20,0	60,0	82,57 ± 1,17^a
23,3	45,0	65,01 ± 0,63 ^e
BHT		99,45 ± 0,04
Ácido ascórbico		99,68 ± 0,06

Fonte: Autoria própria (2021).

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. DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. BHT = butil-hidroxi-tolueno.

A partir dos resultados do planejamento experimental apresentado na Tabela 2, foram obtidos os modelos teóricos, as superfícies de resposta e os diagramas de Pareto, para conseguir-se uma visão clara dos efeitos dos fatores tempo e temperatura na atividade antioxidante da semente do maracujá.

Figura 1 – a) Modelo proposto pelo planejamento fatorial 2². b) Diagrama de pareto para o teste de DPPH.



Fonte: Autoria própria (2021).

A metodologia de superfície de resposta é considerada crucial para um estudo estatístico científico, no qual otimiza-se os processos experimentais, através da análise da influência das variáveis experimentais e suas interações no resultado experimental, enquanto reduz o número de experimentos (TONG et al., 2017).

O DCCR escolhido não se ajustou ao modelo referente ao ensaio do DPPH (Figura 1a) apresentando R² baixo (0,4798) e erro residual alto (25,1276). No diagrama de Pareto (Figura 1b) observa-se o efeito padronizado linear (L) e quadrático (Q) das variáveis tempo e temperatura e suas interações sobre a atividade

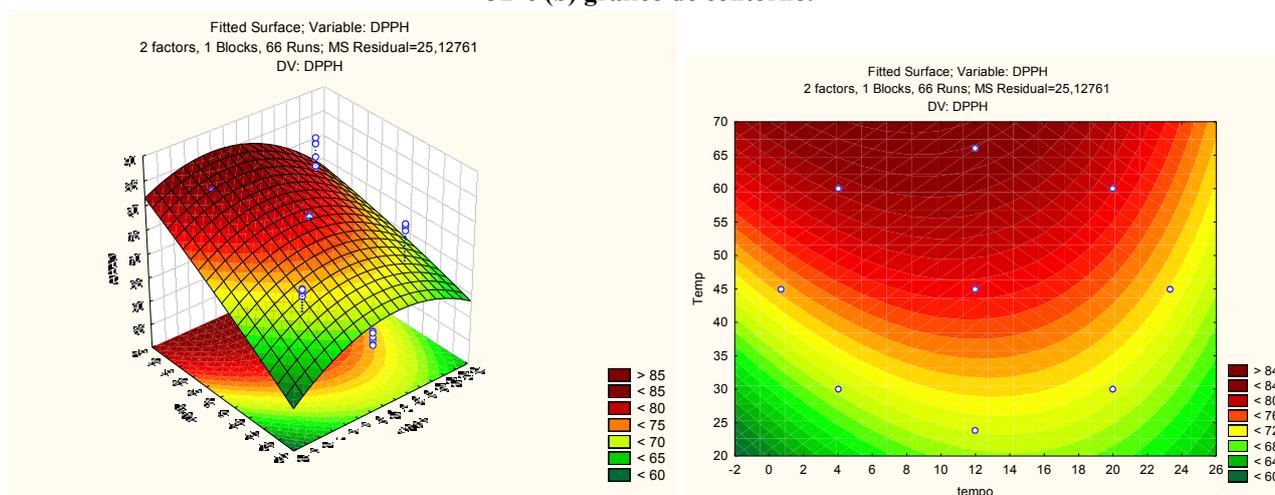
* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; isabellasalvat@yahoo.com.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana; liliandusman@utfpr.edu.br

antioxidante pelo método DPPH. O tempo (Q) e a temperatura (L) foram significativos no intervalo de confiança de 95 %. O maior efeito é observado para a temperatura linear, que exerce influência positiva no processo extrativo, isto é, o aumento da temperatura reflete em um aumento na atividade antioxidante pelo método DPPH.

Pelo gráfico de superfície de resposta do delineamento experimental (Figura 2), que indica a relação entre as variáveis tempo e temperatura para o teste de DPPH, pode-se observar que para a obtenção do percentual máximo de redução do radical DPPH, o extrato deve ser preparado em temperaturas mais altas (65 a 70 °C) e tempos entre 4 a 14 h.

Figura 2 - Superfície de resposta para o teste DPPH em relação a temperatura (°C) e tempo (horas): (a) gráfico 3D e (b) gráfico de contorno.



Fonte: Autoria própria (2021).

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram o potencial antioxidante do coproduto agroindustrial, proveniente do *trub* quente, utilizando o lúpulo Bobek, sendo as melhores condições de extração obtidas pelo planejamento experimental temperaturas entre 65 a 70 °C e tempos entre 4 a 14 h. O coproduto estudado possui potencial para aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas.

AGRADECIMENTOS

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

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; isabellasalvat@yahoo.com.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Apucarana; liliandusman@utfpr.edu.br



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.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 22, p.25-30, 1995.
- 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.; SUZUKI, R. M.; CANESIN, E. A.; TONIN; L. T. D. Otimização do processo de extração de compostos fenólicos do jiló (*Solanum gilo Radi*) 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.
- 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.
- KAMMhuber, K. Differentiating between the world range of hop varieties according to bitter compounds and polyphenols. **Hopfen-Rundschau International**, v. 2005/2006, p. 42–46, 2005.
- 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.
- TZIA, C.; LIADAKIS, G. Extraction optimization in food engineering. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003.
- TONG, A.; et al. Modeling and analysis of a dual-active-bridge-isolated bidirectional DC/DC converter to minimize RMS current with whole operating range. **IEEE Transactions on Power Electronics**, v. 33, p. 5302-5316, 2017.
- 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.

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; isabellasalvat@yahoo.com.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana; liliandusman@utfpr.edu.br