

OTIMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATORA DE COMPOSTOS FENÓLICOS ASSISTIDOS POR ULTRASSOM DE BAIXA FREQUÊNCIA PARA EXTRUSADOS EXPANDIDOS DE MILHO INTEGRAL E PALMA FORRAGEIRA

Luiz Eliel Pinheiro da Silva^{1*}; Sander Moreira Rodrigues²; Iraní Alves Leite¹; Cristiane Teles Lima¹; Alicia Anais Lavado-Cruz³; Nathália de Andrade Neves²
Luz Maria Paucar-Menacho³; Marcio Schmiele^{1,2}

RESUMO

Os compostos fenólicos são divididos em ácidos fenólicos, flavonoides e não flavonoides, sendo submetidos à diversos processos para realizar a extração destes fitoquímicos, sendo geralmente realizados utilizando solventes orgânicos e água na forma líquido-líquido ou sólido-líquido, maceração, extração assistida por ultrassom, micro-ondas, entre outros. Objetivou-se neste trabalho aplicar um Planejamento de Mistura Simplex-Centroide, para otimizar a solução extratora de compostos fenólicos em snacks de palma assistidos por ultrassom de baixa frequência. Os solventes estudados foram a água, o metanol, a acetona e o ácido acético. De acordo com a ANOVA, os resultados experimentais foram explicados por um $R^2 = 0,8909$, $p < 0,001$ e razão F_{cal}/F_{tab} de 7,45. O modelo matemático resultou em um ponto otimizado com uso de 52 % de água e 48 % de acetona, com uma desejabilidade de 0,9960. O ponto ótimo teve a finalidade de validar o modelo matemático preditivo, o qual apresentou um valor previsto de 0,111 e um valor experimental no ponto otimizado de 0,110, com desvio relativo de -0,59 %.

INTRODUÇÃO

Encontrados em sementes, frutas, cereais e legumes, além de folhas como a palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller), os compostos fenólicos possuem propriedades funcionais, sendo divididos em ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoico - ácidos gálicos, protocatecuico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico e siríngico - e ácidos hidroxicinâmicos - *p*-cumárico, ferúlico, cafeico, sinápico, clorogênico e cinâmico ácidos), flavonoides (flavonois, flavanois, flavonas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides) e não flavonoides (estilbenos, chalconas, cumarinas, lignanas e taninos) (1, 2). Esses compostos apresentam diversas formas estruturais (anéis aromáticos e ácido carboxílico orgânico), com grupos químicos funcionais (hidroxilas), polaridades distintas e uma ampla gama de combinações, resultando em compostos chamados de polifenóis, sendo encontrados em polímeros conjugados por esterificação ou eterificação aos macrocomponentes ou na forma livre, a qual é chamada de compostos fenólicos solúveis totais (TSPC) (2). Salienta-se que a quantidade e a variedade de compostos fenólicos são influenciadas por uma diversidade de fatores como condições agrônômicas, variedade dos vegetais, manipulação pós-colheita, condições de armazenamento e estágio de maturação (3).

¹ - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brasil. *luiz.eliel@ufvjm.edu.br

² - Engenharia de Alimentos. Instituto de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brasil.

³ - Ingenieria Agroindustrial. Departamento de Agroindustria y Agrónoma. Universidad del Santa, Perú.

São utilizados diversos processos para realizar a extração dos compostos fenólicos, sendo utilizados solventes orgânicos na forma líquido-líquido ou sólido-líquido, maceração, extração assistida por ultrassom, micro-ondas, entre outros (4). Gil-Martín *et al.* (5) afirmam que os derivados fenólicos são geralmente polares e os solventes próticos polares (contém uma ligação altamente polarizada ao hidrogênio), sendo assim mais efetivos na extração dos fitoquímicos. Os solventes mais utilizados são os álcoois alifáticos (metanol, etanol, propanol, isopropanol) e a água e os solventes orgânicos com diferentes polaridades (acetona, acetato de etila) sendo utilizados para extrair os fenólicos de subprodutos vegetais (1; 5), sendo que essas extrações podem ser realizadas por diversos métodos, destacando-se a extração assistida por ultrassom. Este é um processo emergente e considerado uma alternativa econômica, pois remete à questões de transferência de massa rápida através de um menor tempo de extração, aplicando baixas temperaturas e menor consumo de energia e reagentes químicos (6). Além disso, a miniaturização é um destaque para diminuir a geração de resíduos químicos em processos tecnológicos ambientalmente amigáveis (*environmental friendly*).

OBJETIVO

Neste estudo objetivou-se aplicar um Planejamento de Mistura Simplex-Centroide para otimizar a melhor solução extratora de compostos fenólicos em snacks de farinha de milho integral e farinha de palma (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller), sendo assistidos por ultrassom de baixa frequência.

MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 1 podemos observar o fluxograma aplicado, onde os snacks de palma contendo 76 % de farinha integral de milho e 24 % de farinha integral de palma foram triturados em moinho de bolas TE-350 (Tecnal, Piracicaba, BRA). Uma alíquota de 0,2 g da amostra foi adicionada de 1500 μ L das soluções extradoras aos eppendorfs, sendo que os solventes estudados foram água, metanol, acetona e ácido acético. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex NA 3600 (Norte Científica) e assistidos em banho ultrassom CBU-100/3LDG (Plana TC) a 40 Hz e 100 W durante dois tempos de 30 min, tendo entre os tempos o descanso de 20 min. Após a sonicação, a separação das fases foi realizada em centrífuga SL-5GR (Spinlab) a 5000 g, 20 °C por 10 min. O sobrenadante foi ajustado ao volume final de 2000 μ L. O método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu foi realizado em microleitora espectrofotométrica Anthos 200 ZT, (Zenyth) para determinar a absorbância a 750 nm, em quadruplicata.

Para o desenvolvimento experimental foi aplicado um Planejamento de Misturas Simplex-Centroide, composto por 4 ensaios para os pseudocomponentes, 6 ensaios para os componentes binários, 8 ensaios para os componentes ternário e 4 repetições no ponto central, totalizando 22 ensaios. Os dados foram avaliados estatisticamente através de Metodologia de Superfície de Resposta ($p < 0,05$, $F_{cal} > F_{tab}$ e $R^2 > 0,85$) para a determinação dos coeficientes de regressão e análise de variância. A otimização dos dados foi realizada de acordo com metodologia proposta por Derringer e Suich (7).

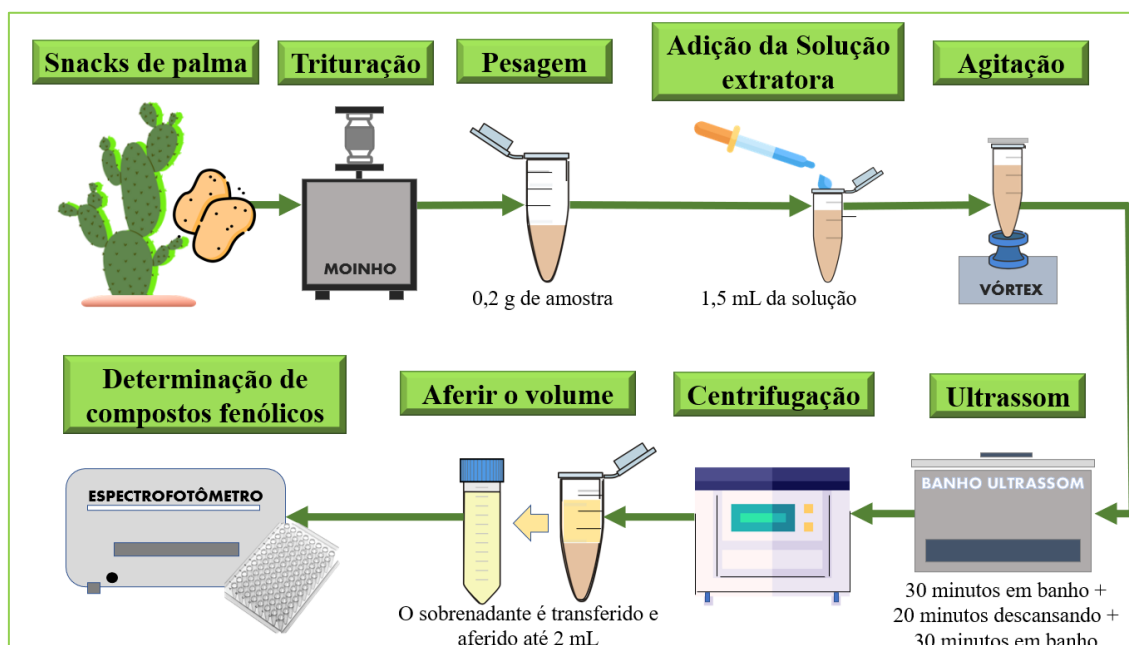


Figura 1: Fluxograma para determinação de compostos fenólicos totais solúveis (CFTS) em microleitora espectrofotométrica.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados de absorbância dos ensaios variaram de $0,051 \pm 0,008$ no ensaio 3 a $0,112 \pm 0,003$ no ensaio 11, sendo que as maiores absorbâncias indicam as melhores extrações (Figura 2). De acordo com a (Equação 1), para os pseudocomponentes, os maiores destaques foram apresentados pela água ($\beta_1=0,060$; $p<0,001$) e pelo metanol ($\beta_2=0,064$; $p<0,001$). Para os componentes binários foi observado que a água apresentou efeito sinérgico com os demais solventes, sendo o maior efeito observado com a acetona ($\beta_{13}=0,278$; $p<0,001$), com o ácido acético ($\beta_{14}=0,220$; $p<0,001$) e com o metanol ($\beta_{12}=0,182$; $p<0,001$). Na Figura 3 podemos observar nas curvas de contorno que a água e a acetona apresentaram os maiores efeitos nos valores da absorbância. Além disso, a interação da água com os demais solventes demonstrou-se importante. Segundo a ANOVA, os resultados experimentais foram explicados por um $R^2 = 0,8909$, valor $p = <0,001$ e razão $F_{cal}/F_{tab (6;15;0,10)}$ de 7,45.

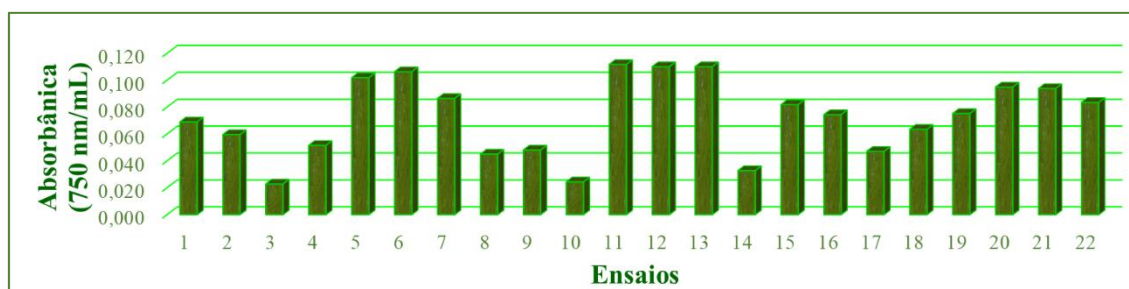


Figura 2: Gráfico de absorbância (750 nm/mL) dos 22 ensaios para a quantificação de compostos fenólicos em snacks de palma.

$$\text{Absorbância (750 nm/mL)} = 0,060x_1 + 0,064x_2 + 0,022x_3 + 0,024x_4 + 0,182x_1x_2 + 0,278x_1x_3 + 0,220x_1x_4 \quad (1)$$

O ponto otimizado foi determinado através da maximização da absorbância dos compostos fenólicos (Tabela 1). A melhor solução foi obtida com o uso combinado de 52 % de água e 48 % de acetona, indicado por uma desejabilidade de 99,60 %. O modelo matemático preditivo foi validado (em triplicata verdadeira) por ter apresentado um desvio relativo de -0,59 %.

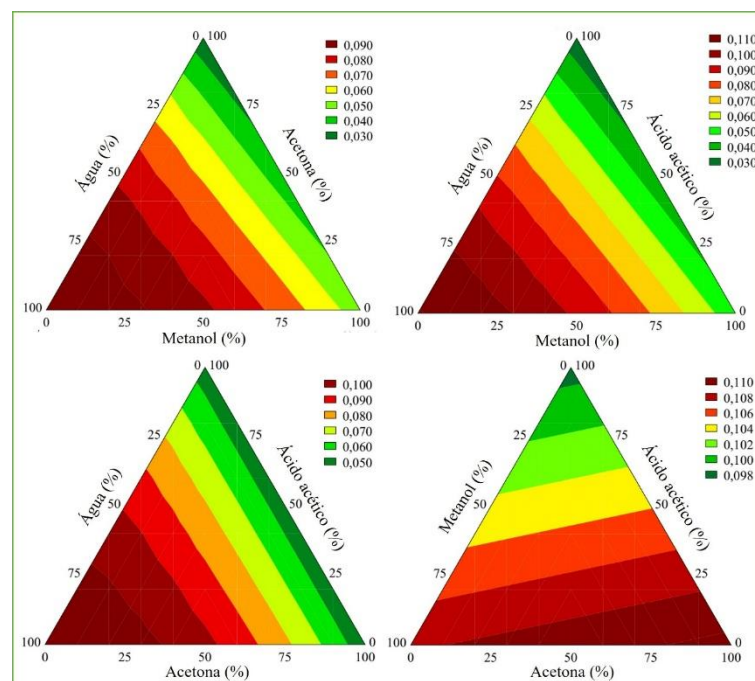


Figura 3: Curvas de contorno o desempenho dos solventes estudados pelo Planejamento de Misturas Simplex-Centroide.

Tabela 1: Otimização numérica, valores preditos e experimentais para a validação dos modelos matemáticos

| Variáveis independentes | Alvo | Importância | Solução | | |
|-------------------------|-----------|-------------|------------------|--------------------|-----------------|
| | | | Valor codificado | Valor real (%) | |
| Água | Na faixa | 3 | 0,52 | 52 | |
| Metanol | | | 0,00 | 0 | |
| Acetona | | | 0,48 | 48 | |
| Ácido acético | | | 0,00 | 0 | |
| Variáveis dependentes | Alvo | Importância | Valor predito | Valor experimental | Desvio relativo |
| Absorbância (750 nm/mL) | Maximizar | 5 | 0,111 | 0,110 ± 0,002 | -0,59 % |
| Desejabilidade | | | 0,9960 | | |

O processo de otimização da forma de extração é fundamental para a avaliação precisa dos compostos fenólicos em diferentes matizes alimentícias. Geralmente a

acetona é o melhor solvente para extrair proantocianidinas e taninos. O etanol extrai melhor os flavonoides na forma aglicona ou glicosilada e os taninos. Os ácidos fenólicos e as catequinas são melhor extraídos com metanol e água. Portanto, não há um único solvente capaz de extrair todas as classes de compostos fenólicos de uma amostra simultaneamente (8).

CONCLUSÃO

Concluimos que o delineamento experimental aplicado é uma importante ferramenta para otimização da solução extratora de compostos fenólicos totais solúveis, tendo como principal vantagem a possibilidade de economizar reagentes químicos, além de favorecer a quantificação dos compostos fitoquímicos. A combinação dos solventes resultou em uma solução extratora ideal, com 52 % de água e 48 % de acetona para o ponto ótimo, indicando uma desejabilidade de 0,996. O valor previsto foi de 0,111 e o valor experimental no ponto otimizado de $0,110 \pm 0,002$, gerando um desvio relativo de $-0,59\%$.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UFVJM pela bolsa de estudos de L. E. P. Silva (cota institucional), à CAPES pelo apoio financeiro (#001) e pelas bolsas de estudos de I. A. Leite (88887.666582/2022-00) e C. T. Lima (88882461706/2019-01), ao CNPq pelo suporte financeiro (#421777/2021-4) e à FAPEMIG pela bolsa de estudos de S. M. Rodrigues (#6832021).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ALBUQUERQUE, M. A. C. de; LEVIT, R.; BERES, C.; BEDANI, R.; LEBLANC, A. de M. de; SAAD, S. M. I.; LEBLANC, J. G. Tropical fruit by-products water extracts as sources of soluble fibres and phenolic compounds with potential antioxidant, anti-inflammatory, and functional properties. **Journal Of Functional Foods**, v. 52, p. 724-733, 2019.
2. SILVA, L. E. P.; RODRIGUES, S. M.; NEVES, N. A.; LEORO, M. G. V.; SCHMIELE, M. Water, methanol and acetone as solvents for optimized extraction of phenolic compounds using a simplex centroid mixture design. In: III Congresso Internacional da Agroindústria, Recife, 2022. **Anais do III Congresso Internacional da Agroindústria**, Recife, CIAGRO, 2022.
3. ALAÑÓN, M. E.; OLIVER-SIMANCAS, R.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. Evolution of bioactive compounds of three mango cultivars (*Mangifera indica* L.) at different maturation stages analyzed by HPLC-DAD-q-TOF-MS. **Food Research International**, v. 125, p. 108526, 2019.
4. DEY, T. B.; CHAKRABORTY, S.; JAIN, K. K.; SHARMA, A.; KUHAD, R. C. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: a review. **Trends In Food Science & Technology**, v. 53, p. 60-74, 2016.
5. GIL-MARTÍN, E.; FORBES-HERNÁNDEZ, T.; ROMERO, A.; CIANCIOSI, D.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M. Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. **Food Chemistry**, v. 378, p. 131918, 2022.
6. HE, B.; ZHANG, L.; YUE, X.; LIANG, J.; JIANG, J.; GAO, X.; YUE, P. Optimization of Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry**, v. 204, p. 70-76, 2016.
7. DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal Of Quality Technology**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 214-219, out. 1980.
8. MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation And Purification Technology**, v. 162, p. 68-76, 2016.