

# ESTUDO DA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS PRESENTES NO RESÍDUO DE ACEROLA.

I.S.Graton, L.G.Mendes, T.S.Carrijo, P.B.Silva e M.A.S.Barrozo  
Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química.  
E-mail para contato: bellegraton@hotmail.com

**RESUMO** –O presente trabalho objetivou, através do método da extração assistida por ultrassom, analisar as variáveis: concentração do solvente, temperatura, razão solvente/amostra e tempo de extração, e, determinar a melhor condição para a extração de compostos fenólicos, além de determinar a atividade antioxidante do material. Por meio de uma análise de desejabilidade encontrou-se as melhores condições para cada uma das variáveis e foram realizados testes para fins de comparação com o método de extração convencional. Os resultados da análise dos compostos bioativos, em condições ótimas, mostraram-se superiores, comprovando a eficiência do método estudado. Além disso, utilizando-se o método do HPLC-UV, identificou-se e quantificou-se quatro compostos fenólicos.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores agrícolas do mundo, ocupando a terceira posição no ranking mundial de produção de frutas, cultivando, só em 2008, mais de 43 milhões de toneladas segundo o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF). Diante de tamanha produção, o processamento gera elevadas quantidades de resíduos, representando cerca de 40% do volume processado. Devido a estes fatores, estudos que destaquem o valor nutricional desses resíduos e a conscientização de empresários para esta possibilidade de reaproveitamento.

Entre as frutas processadas, destaca-se a acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) ou Cereja das Antilhas, que possui elevada concentração de vitamina C, além de vitamina A, ferro, cálcio, vitaminas do complexo B, são ricas em antioxidantes, tocoferóis, carotenóides, compostos fenólicos e tem demonstrado eficaz atividade em sistemas modelos. Além disso, estudos comprovam que os resíduos dessa fruta, possuem elevado teor de antioxidantes e compostos bioativos (Oliveira *et al.*, 2017).

Para o estudo da presença de fenólicos, existem alguns métodos de análise e quantificação. O método de extração utilizando-se solventes orgânicos é comumente utilizado (Trinquier *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2011) mas possui a desvantagem do longo tempo da extração e grande quantidade de solventes necessária. Com isso, o método da extração assistida por ultrassom vem sendo incorporada a fim de melhorar os métodos de extração com solventes. O método utilizando-se o ultrassom vem sendo utilizada para análise de fenólicos em ervas medicinais (Wei *et al.*, 2013), frutas (Goula *et al.*, 2016), plantas (Xu *et al.*, 2017; Baghdikian *et al.*, 2016) e resíduos agroindustriais (Melo, 2010).

Durante o processo de extração, vários fatores podem influenciar no resultado, tais como temperatura, a concentração do solvente extrator, o tempo de extração e a razão solvente/amostra. Considerando isso, este trabalho objetivou encontrar a condição desejável para obtenção de resultados melhores das variáveis influenciadoras frente aos compostos bioativos presentes na acerola, tais como os fenólicos totais, flavonoides totais e a atividade

antioxidante do material. Além disso, objetivou-se também, utilizando-se o método de HPLC-UV, a identificação e quantificação de sete compostos fenólicos: ácido gálico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rutina, quercetina e kaempferol.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material

O resíduo de acerola foi previamente seco em leito fixo, a potência da lâmpada infravermelha de 1050 W/m<sup>2</sup>, a temperatura de 80° C e a velocidade do ar de 0,6 m/s. Após a secagem, o material foi triturado, peneirado e armazenado a -18°C até o momento das análises. O resíduo de acerola utilizado nos experimentos apresentava umidade de 7.1±0.5 g/100g de amostra seca, atividade de água de 0,134, Ph igual a 3,88 e teor de ácido ascórbico de 3558,718±131,0194 mg/100 g.

### 2.2. Análise dos compostos bioativos

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de *Folin-Ciocalteu*, utilizando ácido gálico como padrão (Singleton & Rossi, 1965), com leitura de absorbância a 622 nm. Os resultados foram expressos em mL de ácido gálico/100 g de amostra em base seca.

A determinação do ácido ascórbico foi realizada por titulometria, método que se baseia na redução do 2,6-dicloroindofenol pelo ácido ascórbico.

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado pelo método colorimétrico segundo Zhishen *et al.* (1999), com leitura de absorbância a 450 nm. Os resultados foram expressos em mL equivalente de rutina/100 g de amostra em base seca.

A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH (Brand-Willians *et al.*, 1995) que se baseia na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1- picril-hidrazil) por antioxidantes, com leitura da absorbância a 515 nm. Os resultados foram expressos em IC<sub>50</sub> (g/L) que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH.

#### 2.2.1. HPLC-UV

Foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu ( modelo LC-20A Prominence), equipado com coluna de fase reversa C18 (4,6 mm x 150 mm). Para as análises realizadas utilizou-se uma vazão da fase móvel igual a 0,7 ml/ min, volume de injeção de 10 µl e temperatura da coluna de 40°C.

Para a análise de compostos fenólicos utilizou-se um comprimento de onda de 280 nm, sendo a fase móvel constituída por ácido acético (2,0% v/v) (A) e solução de acético em água (0,5% v/v) e acetonitrila (50:50 v/v) (B). Os gradientes utilizados foram: de 10 a 24% por 20 min; de 30 a 55% por 20 min; de 55 a 100% por 15 min; de 100% isocrático por 8 min e de 100 a 10% por 2 min.

Para a análise de compostos flavonoides utilizou-se um comprimento de onda de 320 nm, fase móvel constituída por ácido fosfórico em água 1% (v/v) (fase A) e acetonitrila (fase B). Os gradientes utilizados foram: de 0 a 15 % em 2 min; de 15 a 25% em 5 min; de 25 a 30% em 10 min; de 30 a 35% em 15 min; de 35 a 50% em 25 min; de 50 a 60% em 30 min; de 60 a 80% em 35 min; de 80 a 100% em 45 min e de 100 a 5% em 60 min.

#### 2.2.2. Extração convencional com metanol

A extração convencional foi feita utilizando 28 mL de metanol e 0,4 g do resíduo de acerola triturado e seco - valores determinados em experimentos prévios. A massa e o metanol foram colocados em um tubo e agitados por 3 min e deixada em repouso por 1h. Após esse período, filtrou-se e armazenou-se o extrato em frascos âmbar até o momento das análises.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Definiram-se previamente as condições do banho ultrassônico, como tempo e temperatura, assim com a massa a ser utilizada. Em um béquer de 200 mL foi adicionado à massa juntamente com 40 mL de solução hidroalcoólica e adicionado no banho ultrassônico cujo modelo é o LS-55DA-2/X, possui frequência de 33kHz e potência de 1050W. O extrato hidroetanólico foi obtido filtrando-se a mistura sólido-líquido.

#### 3.1. Planejamento Experimental

As variáveis temperatura do banho ultrassônico, tempo de extração, razão solvente/amostra e concentração de álcool etílico utilizadas, tiveram seus efeitos avaliados em um planejamento composto central, com 3 réplicas no ponto central, o qual está representado na Tabela 3. Posteriormente foram realizadas análises estatísticas dos resultados no software STATISTICA®.

**Tabela 1. 1** - Planejamento Composto Central ( $\alpha=1,547$ )

Independent variable	Factor levels				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
C (%)	63,5	70,0	81,8	93,6	100,0
t (min)	13,6	30,0	60,0	90,0	106,4
T (°C)	19,1	30,0	50,0	70,0	80,9
R(mL/g)	4,2	14,0	32,0	50,0	59,8

### 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 4.1. Quantificação dos compostos bioativos

Neste trabalho foram realizados 24 experimentos com mais três réplicas no ponto central. O teor de fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC) e  $IC_{50}$  obtidos para cada condição avaliada.

##### 4.1.1. Teor de compostos fenólicos Totais (TPC)

O melhor resultado para a avaliação de compostos fenólicos foi o experimento que apresentou 910,5 mg GAE/100 g de amostra seca. As condições utilizadas neste experimento foram: tempo de extração igual a 90 minutos, temperatura de 30°C, concentração de etanol igual a 70%, e razão solvente/amostra de 50 mL/g.

Vieira & Lima (2011) analisaram a capacidade antioxidante e o teor de fenólicos totais de resíduos de polpas de frutas tropicais, dentre eles o da acerola. Os resultados demonstraram que a extração hidroetanólica ( $279,99 \pm 3,5$  mg.  $100\text{ g}^{-1}$ ) foi mais eficiente que a aquosa ( $247,62 \pm 2,08$  mg.  $100\text{ g}^{-1}$ ). Os autores destacam ainda que o resíduo de acerola possui alto teor de fenólicos totais se comparado aos resíduos de goiaba, abacaxi, graviola, bacuri e cupuaçu.

Pereira *et al.* (2013) analisou a extração de compostos antioxidantes da farinha de resíduo de acerola. Os experimentos foram realizados com extrações com etanol (98%), água e solução hidroalcoólica (78,4%), sendo que os autores concluíram que a solução hidroalcoólica apresentou melhor poder extrator para compostos fenólicos do resíduo.

A utilização do ultrassom as extrações podem ser realizadas em tempos até 100 vezes menores do que quando se utiliza métodos convencionais Goula *et al.* (2016). Esse fato ocorre por conta das cavitações que rompem a estrutura do material tornando mais fácil o contato com o solvente.

#### 4.1.2. Teor de Flavonoides Totais

O melhor resultado para a avaliação do teor de flavonoides totais foi de 4,7 mg de rutina/ 100 g de amostra, sendo o tempo de extração de 30 minutos, temperatura igual a 70°C, a concentração de etanol igual a 93,6% e a razão solvente/amostra iguais 50 mL/g.

Huang (2009) avaliou a aplicabilidade do ultrassom na extração de flavonoides de uma erva que tem relevante importância na medicina chinesa: *Folium eucommiae*. O autor comparou a extração utilizando enzimas em diferentes condições experimentais e métodos utilizando um micro-ondas. Com isso, os autores concluíram que a extração utilizando ultrassom é mais eficiente se comparado aos outros dois métodos. Além disso, a condição ótima encontrada para a extração de flavonoides presentes nesta planta foi etanol 42%, tempo de extração de 70 minutos, etanol 42%, razão de 60/1 mL/g.

#### 4.1.3. Atividade Antioxidante Total (IC<sub>50</sub>)

A atividade antioxidante total é verificada através da análise do DPPH. Esta análise exibe cor púrpura em solução, e cor amarelo quando reduzida. Desta forma, quanto maior a redução de DPPH, maior a capacidade de eliminação de radicais livres, e menores valores de absorbância obtidos, devido à diminuição na intensidade da cor. Portanto, deve-se considerar o menor valor do IC<sub>50</sub> (Jiménez *et al.* 2014).

Diante das condições analisadas neste estudo, o melhor valor encontrado foi de 6,3 µg/mL, sendo que a concentração de etanol utilizada foi de 70%, tempo de extração de 30 min, temperatura de 70 °C e razão solvente/amostra de 50 mL/g.

Caetano *et al.* (2009) realizou uma extração sequencial empregando três soluções extratoras (hidroacetônica 80%, hidrometanólica 80% e hidroalcoólica 80%). Diante dos resultados, concluiu-se que o extrato etanólico apresentou maior capacidade antioxidante, independente da concentração e temperatura, evidenciando sua eficácia na obtenção de IC<sub>50</sub>.

#### 4.1.4. Análise da Desejabilidade

Diante do planejamento experimental, observou-se que em determinadas condições os compostos fenólicos totais, flavonoides totais e IC<sub>50</sub> apresentaram os melhores resultados. Assim, fez-se necessário a análise da desejabilidade, a qual determina condições apropriadas para obtenção de maiores valores dos compostos fenólicos e flavonoides, e menores valores de IC<sub>50</sub>.

Utilizando-se o software STATISTICA®, obteve-se que a melhor condição conforme o método da desejabilidade foi empregando tempo de 13,6 min, concentração de etanol 67,5%, temperatura de 80,9°C e razão de 59,8 mL/g. O tempo proposto foi o menor estudado neste trabalho, visto que os três compostos independem do tempo de extração em ultrassom.

Para fins de comparação, fez-se uma extração pelo método convencional e outra em condições ótimas (análise da desejabilidade). Além disso, estes valores foram comparados com os valores obtidos utilizando-se o modelo previsto e o modelo reduzido. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.1.4.

**Tabela 1.1.1 - Resultados obtidos para o método estudado e o método convencional**

	Extração convencional	Condição Ótimas	Previsto modelo completo	Previsto modelo reduzido
TPC (mg/100g )	538,5 ± 13,8	931,2 ± 40,1	923,2	912,14
TFC (mg/100g)	3,2 ± 0,3	4,8 ± 0,3	5,8	5,26
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	9,3 ± 0,1	5,6 ± 0,3	4,9	5,95

A eficiência da extração assistida por ultrassom está relacionada ao processo de cavitação que ocorre no ultrassom e também a polaridade do solvente utilizado. O processo de cavitação ocasiona o rompimento das estruturas do material, beneficiando o contato do solvente. Além disso, a polaridade média do solvente e sua afinidade com os polifenóis facilitam a extração dos compostos.

Portanto, o método da extração assistida por ultrassom utilizando como solvente extrator uma solução hidroalcoólica é eficiente para a extração simultânea de compostos fenólicos, flavonoides e para analisar a atividade antioxidante presente no resíduo de acerola.

#### **4.1.5. Análise de compostos fenólicos em HPLC**

Neste estudo, avaliaram-se sete padrões diferentes de compostos fenólicos, três tipos de flavonoides e quatro tipos de ácidos fenólicos. Determinou-se, para cada substância, o tempo de retenção.

Identificaram-se os compostos fenólicos através da comparação entre os tempos de retenção padrão e os tempos analisados, com as curvas de calibração obtidas para cada um dos compostos, pode-se fazer a quantificação. Para o ácido gálico foi encontrado 111,7 mg/100g b.s. (desvio padrão de 16,0); o valor para o ácido caféico foi de 1,4 mg/100g b.s. (desvio padrão de 0,2); 4,9 mg/100g b.s. para o ácido p-cumárico (0,2 de desvio padrão) e para a rutina o valor foi de 1,2 mg/100g b.s. (desvio padrão de 0,2)

Analisando os dados acima, verifica-se que os flavonoides quercetina e kaempferol e o ácido ferúlico não foram detectados, e o ácido gálico é o composto mais abundante na amostra.

### **5. CONCLUSÃO**

Neste trabalho foram feitos estudos para analisar a viabilidade da utilização do método da extração assistida por ultrassom juntamente com o método de extração utilizando-se solventes orgânicos e, concluiu-se que o método se mostra eficiente para a extração de compostos fenólicos presentes na amostra e para analisar a atividade antioxidante presente no resíduo de acerola. Verificou-se também, que foi possível conseguir as melhores condições experimentais para a obtenção dos melhores resultados para as variáveis estudadas.

Portanto, um estudo mais aprofundado sobre a aplicabilidade destes extratos se torna viável devido à atividade antioxidante e ao alto valor de compostos fenólicos presentes no resíduo de acerola.

### **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AOAC. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD1995.
- AQUINO, A.C.M.S., et al. Avaliação físico-química e aceitação sensorial de biscoitos tipo cookies elaborados com farinha de resíduos de acerola. RevInst Adolfo Lutz 2010:379-386.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology, v.28, p.25-30. 1995
- CAETANO, A. C. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; MACIEL, M. I. S.; ARAÚJO, C. R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. Brazilian Journal of food technology, v.12, n.2, p.155-160, 2009.
- GOULA, A. M., K THYMIATIS e K KADERIDES. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. Food and Bioproducts, 2016.
- HUANG, W.; XUE, A.; NIU, H.; JIA, Z.; WANG, J. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro*. Food Chemistry, v.114, p.1147-1154, 2009.



- JIMÉNEZ, Y.C.; VALME GARCÍA-MORENO, M.; IGARTUBURU, J.M.; BARROSO, C.G., Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products, Food Chemistry, 2014, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.106>.
- MARQUES, T. R. ;LINO, J.B.R.;SIMÃO, A.A.;ALVES, A.P.C.;CORRÊA, A.D.; LAGE, F.F. Minerais e propriedades funcionais em resíduos agroindustriais de acerola (*Malpighiaemarginata*D.C). 52º Congresso Brasileiro de Química, 2012.disponível em:<<http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/10/52513680.html>>
- MELO, P. S. Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. Dissertação de mestrado. USP, São Paulo, 2010.
- OLIVEIRA, K. G.; Queiroz, V. A. V.; Carlos, L. A.; Cardoso, L. M.; Pinheiro-Santana, H. M.; Anunciação, P. C.; Menezes, C. B.; Silva, E. C.; Barros, F. Effectofstorage time andtemperatureonphenoliccompoundsofsorghumgrainandflour. FoodChemistry, v.216, p. 390-398, 2017.
- PEREIRA, C. T. M.; SILVA, C. R. P.; LIMA, A.; PEREIRA, D. M.; COSTA, C. N. C.; NETO, A. A. C. Obtenção, caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante in vitro da farinha de resíduo de acerola (*Malpighia glabra* L.). Acta Tecnológica, v. 8, n.2, p.50-56, 2013.
- SANCHO, S O, et al. Characterization of the Industrial Residues of Seven Fruits and Prospection of Their Potential Application as Food Supplements. Journal of Chemistry , p.1-8, 2015.
- SINGLETON, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture,v.16, p.144-158, 1965.
- SOUSA, M. S. B.;VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. Ciência e Agrotecnologia. v.35, n. 3, p. 554-559, 2011.
- SOUSA. M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. Brazilian Journal of Food Technology, v.14, n.2, p.202-210, 2011.
- TRINQUIER, S.F.; MAURY, C; BARON, A.; MEURLAY, D. L. Optimization of the extraction of apple monomeric based on response surface methodology: Comparison of pressurized liquid-solid extraction and manual-liquid extraction. JournalofFoodCompositionandAnalysis. v.34, p.56-67, 2014.
- WEI, M.; Yang, Y.;Chiu, H.; Hong, S. Developmentof a hyphenated procedure ofheat-refluxandultrasound-assistedextractionfollowedbyRP-HPLC separation for the determination of three flavonoids contentin *Scutellariabarbata* D. Don. Journal of Chromatography B, v.940, p. 126-134, 2013.
- XU, D.; ZHENG, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; LI, S.; LI, H. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limoniumsinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. Food Chemistry, v.217, p. 552-559, 2017.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; Jianming, W.The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. Food Chemistry, v.64, p.555-559, 1999.