OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE BRÁCTEAS ESTÉREIS DE *Araucaria angustifolia*

Jorge Gabriel de Paula Lima Raitz (Fundação Araucária), Acácio Antonio Ferreira Zielinski, Danianni Marinho Zardo, Alessandro Nogueira, Aline Alberti (Orientadora), e-mail: alinealberti@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos

Ciência e Tecnologia de Alimentos

Palavras-chave: Pinhão, atividade antioxidante, planejamento Box-Behnken.

Resumo

Estudos mostram que sementes e brácteas estéreis de *Araucaria* apresentam compostos fenólicos que apresentam grande importância na saúde humana. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar a extração dos compostos fenólicos de brácteas estéreis (falhas) da *Araucaria angustifólia* utilizando a metodologia de superfície de resposta. Foi desenvolvido um planejamento Box-Behnken para analisar o efeito da temperatura, concentração do solvente e razão soluto/solvente na extração de fenóis totais, flavonóides totais, taninos, flavonóis e atividade antioxidante por DPPH e ABTS. A otimização sugeriu que as melhores condições para maximizar o conteúdo fenólico assim como maior atividade antioxidante do extrato são a extração a 80°C, com etanol 60% e razão de 1 g de soluto para 38 mL de solução. O extrato obtido apresenta compostos fenólicos e atividade antioxidante e desta forma pode ser utilizado em formulações de alimentos a fim de aumentar seu poder antioxidante.

Introdução

A *Araucaria angustifolia* é uma árvore muito conhecida na região sul do Brasil, principalmente pela sua semente, o pinhão, que é consumido cozido na época de frio e também em festas juninas. Na pinha, juntamente com os pinhões, temos também as brácteas estéreis conhecidas como falhas, essas não apresentam nenhuma forma de aproveitamento, não tendo nenhum fim e assim sendo jogada fora (GOLFARI, 1971).

Estudos realizados mostram que tanto nas cascas de pinhões assim como nas falhas, estão presentes compostos fenólicos que podem ser importantes para a saúde humana (MACIEL; ANDRADE,1996). No pinhão foi encontrado ácido gálico, catequina, epicatequina, quercitina e kaempferol. Esses compostos apresentam capacidade de reduzir o risco de doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (MICHELON; BRANCO; CALLONI; GIAZZON; AGOSTINI; SPADA, 2012).

Para a utilização dos extratos fenólicos em alimentos é imprescindível a utilização de um solvente de grau alimentício. Além do solvente outros parâmetros que podem ser avaliados são tempo de extração, a temperatura, a concentração do solvente e a proporção soluto/solvente. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar a quantidade de compostos fenólicos nas brácteas de *Araucaria angustifolia* com uso de solvente de grau alimentício para futuras aplicações alimentares.

Materiais e Métodos

Materiais

As pinhas utilizadas no experimento foram obtidas da região de Castro (24° 46 ‘ 42 “ S 50° 09 ’ 43 “ O), no Paraná, Brasil. Os reagentes e padrões utilizados foram de grau analítico.

Métodos

Preparo da amostra

As pinhas foram debulhadas e separadas as sementes (pinhões) das brácteas estéreis (falhas). As brácteas estéreis foram desidratadas em estufa a 60°C, por 24 horas, em seguida as falhas passaram por uma etapa de redução de tamanho, e em seguida o material foi tamisado entre 40 a 60 mesh.

Extração dos compostos fenólicos

Para extração dos compostos fenólicos das brácteas estéreis, foi realizado um planejamento experimental Box-Behnken. Foram avaliados os efeitos da concentração de etanol (20, 40 e 60%), da temperatura (30, 55 e 80 °C) e razão soluto solvente (1:10, 1:25 e 1:40).

As extrações foram feitas usando 2 g do pó de brácteas estéreis tamisado durante 20 min. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel de filtro e o volume foi ajustado para 100 mL.

Compostos fenólicos totais

A quantificação de fenóis totais (FT) foi determinada por método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, baseado no método de Singleton e Rossi (1965) adaptado a microplaca por Jacobo-Velázquez et al. (2011). As leituras foram comparadas com uma curva de calibração de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por g de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.

Flavonóides totais

A quantificação de flavonóides totais foi determinada pelo método descrito por Zhishen, Mengeheng e Jianming (1999) com algumas alterações. As leituras foram comparadas com uma curva de calibração de catequina e os resultados foram expressos em mg de catequina por g de falhas de *Araucaria angustifolia.*

Taninos condensados

A quantificação de taninos condensados foi determinada pelo método da reação da vanilina de Broadhurst e Jones (1978). As leituras foram comparadas com uma curva de calibração de catequina e os resultados foram expressos em mg de catequina por g de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.

Atividade antioxidante por DPPH

A capacidade dos extratos em eliminar os radicais livres foi determinada em triplicata pela análise de DPPH de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com modificações realizadas por Thomas J Herald (2012). Esse método se baseia na determinação da capacidade de doar hidrogênio da molécula e não produzir as reações de oxidação em cadeia ou reagir com os radicais livres intermediários. A porcentagem de redução foi comparada com uma curva de calibração de Trolox e os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox por g de brácteas estéreis de pinhão (µmol TE/g).

Atividade antioxidante por ABTS

A atividade antioxidante pelo método da captura do radical 2,2´-azinobis 3 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), gerado por uma reação química, foi baseada no método de Re, Roberta (1999), adaptado para microplaca por Pastoriza et al. (2011). A porcentagem de redução foi calculada e comparada com uma curva de calibração de Trolox e os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox por g de brácteas de pinhão (µmol TE/g).

Resultados e Discussão

Os resultados das análises quantificados de fenóis totais, flavonóides totais, taninos condensados e atividade antioxidante por DPPH e ABTS dos extratos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 Compostos fenólicos totais (CFT), Flavonóides totais (FLA), Taninos condensados (TAN) e capacidade antioxidante por DPPH e ABTS dos extratos obtidos com soluções etanólicas

Experimentos	**CFT** (mg GAE/g)	**FLA** (mg CTE/g)	**TAN** (mg CTE/g)	**DPPH** (µmol TE/g)	**ABTS** (µmol TE/g)
1	3,57 ± 0,12^{h}	2,10 ± 0,05^{l}	2,17 ± 0,11^{n}	22,30 ± 1,47^{g}	28,09 ± 1,21^{i}
2	4,64 ± 0,28^{g}	3,14 ± 0,15^{ij}	4,83 ± 0,19^{i}	23,30 ± 0,85^{g}	33,44 ± 0,85^{h}
3	6,89 ± 0,44^{e}	4,29 ± 0,08^{h}	4,03 ± 0,13^{j}	31,48 ± 3,05^{f}	52,34 ± 1,60^{ef}
4	8,66 ± 0,42^{b}	5,68 ± 0,10^{c}	9,40 ± 0,38^{c}	54,89 ± 2,60^{c}	73,32 ± 1,62^{b}
5	4,92 ± 0,20^{g}	3,03 ± 0,08^{j}	2,97 ± 0,13^{l}	22,20 ± 3,16^{g}	32,58 ± 0,67^{h}
6	7,46 ± 0,37^{cd}	4,88 ± 0,07^{def}	7,44 ± 0,32^{d}	45,88 ± 1,08^{d}	50,65 ± 1,80^{f}
7	7,86 ± 0,12^{c}	4,81 ± 0,16^{efg}	6,95 ± 0,28^{e}	45,64 ± 1,41^{d}	53,08 ± 0,49^{e}
8	9,27 ± 0,31^{a}	6,05 ± 0,18^{b}	10,56 ± 0,30^{a}	60,55 ± 1,34^{b}	74,22 ± 2,03^{b}
9	3,77 ± 0,15^{h}	2,12 ± 0,09^{l}	2,60 ± 0,13^{m}	15,57 ± 1,15^{h}	28,13 ± 0,77^{i}
10	7,24 ± 0,22^{de}	4,57 ± 0,10^{g}	5,23 ± 0,23^{gh}	37,97 ± 1,18^{e}	53,51 ± 2,03^{e}
11	5,76 ± 0,27^{f}	3,36 ± 0,05^{i}	5,00 ± 0,09^{hi}	29,55 ± 0,98^{f}	41,13 ± 1,28^{g}
12	9,48 ± 0,34^{a}	6,57 ± 0,25^{a}	10,26 ± 0,22^{b}	68,69 ± 3,56^{a}	77,40 ± 2,05^{a}
13	7,59 ± 0,22^{cd}	4,94 ± 0,14^{de}	6,18 ± 0,14^{f}	43,12 ± 1,98^{d}	50,49 ± 2,16^{f}
14	7,37 ± 0,16^{d}	4,66 ± 0,21^{fg}	5,51 ± 0,19^{g}	38,80 ± 2,56^{e}	57,30 ± 0,41^{d}
15	7,81 ± 0,37^{c}	5,09 ± 0,28^{d}	6,39 ± 0,21^{f}	44,22 ± 1,55^{d}	64,11 ± 1,78^{c}
p (Cochran)*	0,70	0,49	0,08	0,31	0,49
p (ANOVA)**	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Nota: Valores expressos pela média (n=3) em base seca, * valor de probabilidade obtido por teste de Cochran para homogeneidade de variâncias, ** valor de probabilidade obtido por ANOVA fator único. Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística (p≤0,05) pelo teste de Fischer LSD.

Os resultados mostram que todos os fatores influenciaram o rendimento da extração de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados. A temperatura aumenta a solubilidade dos compostos e aumenta a permeabilidade das membranas vegetais. Uma mistura entre solvente e água tem um efeito maior na extração, do que o solvente puro propriamente dito, pois quando adicionamos água nesse solvente, ele não se torna tão seletivo, extraindo mais compostos. A razão soluto:solvente é importante para identificarmos quanto de solvente precisamos para extrair o máximo de compostos a partir de 1 g de amostra, se colocarmos pouco solvente e muita amostra, a solução ficará saturada e por isso a razão deve ser a mais correta possível, como exemplo, foi feito extrações de 1:10, 1:25 e 1:40, após o processo de otimização, verificamos que a melhor razão é 1:38.

O processo de verificação foi efetuado a fim de maximizar ao mesmo tempo a extração de todos os compostos. Os modelos propostos para fenóis totais, flavonoides, taninos e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) foram significativos ($p<0,001$) e explicaram mais de 90 % dos dados e não apresentaram falta de ajuste. O processo de otimização sugere que o melhor ponto para a extração é com etanol 60%, temperatura de 80°C e razão soluto solvente de 38 mL para 1 g de amostra, esses fatores compõe a melhor combinação das variáveis estudadas. Com esses valores as análises foram refeitas a fim de fazer a validação, e verificamos que os modelos foram validados com sucesso.

Conclusões

A combinação das variáveis que obtiveram os melhores valores de extração, ou seja, melhor rendimento de extração, foi obtida com etanol 60%, a temperatura de 80°C e com a razão de 1 g de amostra para 38 mL de etanol, sendo estas extrações feitas por 20 min. O modelo de otimização foi validado, e pode ser utilizado posteriormente. Vale lembrar que com todo esse estudo, podemos utilizar o extrato fenólico de brácteas estéreis, que não tem nenhum uso atualmente, em produtos alimentícios a fim de conseguirmos um efeito antioxidante.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Estadual de Ponta Grossa por disponibilizar meios para realizar a pesquisa cientifica e a Fundação Araucária pela bolsa de estudos.

Referências

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel – Wissenschaft und -Technologie, v. 22, p. 25-30, 1995.

BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 29, p. 788-794, 1978.

GOLFARI, L. Coniferas aptas para reflorestamento nos estados do Parana, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Brasil Florestal**,** v. 1, p. 1-71, 1971.

MACIEL, A. da S.; ANDRADE, A.M. de Quantificação de fenóis totais em sementes de cinco espécies florestais. Floresta e Ambiente, n. 3 p. 22-27, 1996.

MICHELON, F., S BRANCO, C., CALLONI, C., GIAZZON, I., AGOSTINI, F., KW SPADA, P., & SALVADOR, M. *Araucaria Angustifolia*: a Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities. Current Nutrition & Food Science, v. 8, p. 1-5, 2012.

RE, ROBERTA & PELLEGRINI, NICOLETTA & PROTEGGENTE, ANNA & PANNALA, ANANTH & YANG, MIN & RICE-EVANS, CATHERINE. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Rad. Biol. Med. 26, 1231-1237. Free radical biology & medicine, 1999

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture, n.16, p.144-158, 1965.