

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE SEMENTES DE MARACUJÁ-AZEDO (*Passiflora edulis*) UTILIZANDO LÍQUIDOS PRESSURIZADOS

F. M. BARRALES¹, J. VIGANÓ¹, R. G. CORREA¹ e J. MARTÍNEZ¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: manubarrales@gmail.com

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi extrair compostos fenólicos de sementes de maracujá e verificar a capacidade antioxidante dos extratos. Técnicas de extração utilizando líquidos pressurizados, como água e etanol, são consideradas ambientalmente corretas, pois estes solventes não oferecem riscos ambientais e ao produto. Os experimentos de extração seguiram um planejamento experimental composto central com os fatores temperatura (30-80 °C) e percentual de etanol em água (0-100%). As variáveis vazão de solvente, pressão e tempo de extração foram mantidas constantes. Após a extração, os extratos foram armazenados a -18 °C e analisados quanto ao rendimento, fenólicos totais e capacidade antioxidante. As análises de fenólicos totais foram realizadas segundo o método Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante por ensaios DPPH. Os resultados indicaram que maiores temperaturas e concentrações de etanol em água favorecem a obtenção de maiores percentuais de rendimento, fenólicos totais e capacidade antioxidante. A melhor condição obtida por este trabalho foi 55 °C e 100 % etanol, em que se obteve 6,285 % de rendimento, fenólicos totais igual a 322,166 mgAGE/100g e atividade antioxidante de 317,261 mgTE/100g.

1. INTRODUÇÃO

A produção, o comércio e o consumo de frutos tropicais exóticos têm aumentado nos últimos anos devido às suas propriedades sensoriais atrativas e ao reconhecimento de seu valor nutricional e terapêutico. Em muitos casos estes frutos não são somente consumidos na forma *in natura*. O maracujá-azedo (*Passiflora edulis*), utilizado pela indústria de alimentos em grande quantidade na fabricação de suco e polpa, é um exemplo.

Os processos de separação da polpa de maracujá produzem volumes consideráveis de resíduos devido à separação da casca, fibras da polpa e sementes. Estima-se que este material corresponde entre 60 e 70 % da massa do fruto (Zeraik *et al.*, 2010; Gerola *et al.*, 2013). O desenvolvimento de técnicas que visam ao uso eficiente dos subprodutos agroindustriais pode agregar valor a estes materiais e reduzir impactos ambientais resultantes de seu descarte.

A valorização dos subprodutos agroindustriais está recebendo especial atenção nos últimos anos. Algumas pesquisas têm avaliado a conversão de subprodutos em ingredientes para alimentos e componentes para fármacos (Santana-Méridas *et al.*,

2012). Outras indicam que partes do fruto e da planta de espécies do gênero *Passiflora* são boas fontes de polifenóis (Oliveira *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2012), ácidos graxos (Liu *et al.*, 2009) e carotenoides (Ferreira *et al.*, 2013), compostos de alto valor nutricional, aos quais se atribui diversos benefícios à saúde. A obtenção destes compostos pode originar uma gama de produtos comerciais, seja matéria-prima para processos secundários, substitutos para ingredientes ou ingredientes de novos produtos (Martinez *et al.*, 2012). Entretanto, para explorar estes recursos, estratégias comercialmente viáveis para a extração e disponibilização desses compostos precisam ser desenvolvidas.

A extração com líquidos pressurizados (*Pressurized liquid extraction* – PLE) tem recebido especial atenção nos últimos anos, pois permite a extração rápida, com menor consumo de solventes e alta seletividade dos solutos (Herrero *et al.*, 2004). Além disso, há possibilidade de operar com solventes como água e etanol, o que torna a técnica ambientalmente correta e economicamente viável em relação aos métodos convencionais de extração, em que grandes quantidades de solventes, longos tempos de extração e altas temperaturas são requeridas (Ju e Howard, 2003; Santos *et al.*, 2013).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar extrações de sementes de maracujá-azedo utilizando fluidos pressurizados e avaliar os extratos quanto a conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Pré-tratamento da matéria-prima

Maracujás da espécie *Passiflora edulis* foram adquiridos no comércio local de Campinas-SP. As sementes foram separadas da polpa com o auxílio de liquidificador e peneira, cuidando para separá-las completamente da fibra da polpa, sem rompê-las. Posteriormente, foram levadas à estufa com circulação de ar a 60 °C, onde permaneceram por 24 horas. Após o processo de secagem, as sementes apresentaram teor de umidade igual a $0,025 \pm 0,001$ kg_{água}/kg_{amostra}. Para finalizar o pré-tratamento, as sementes foram trituradas.

2.2. Extração com líquido pressurizado (PLE)

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos (LAPEA-DEA-FEA-UNICAMP). As extrações foram realizadas no equipamento representado no fluxograma da Figura 1. Diferentes composições de solvente foram bombeadas a partir do reservatório até a célula de extração. Para cada ensaio, um leito de partículas foi empacotado, utilizando-se aproximadamente 5 gramas de sementes e completando o restante do volume da célula (100 mL) com esferas de vidro. A célula de extração possui uma camisa acoplada a um banho termostático para controle da temperatura. A pressão foi controlada pelo ajuste da válvula micrométrica. Os extratos foram coletados em frascos com proteção da luz no final da linha. Ao término da extração, os extratos foram pesados. Após a determinação de rendimento global, os extratos foram rota-evaporados durante uma hora a 38 °C, liofilizados e armazenados a -24 °C.

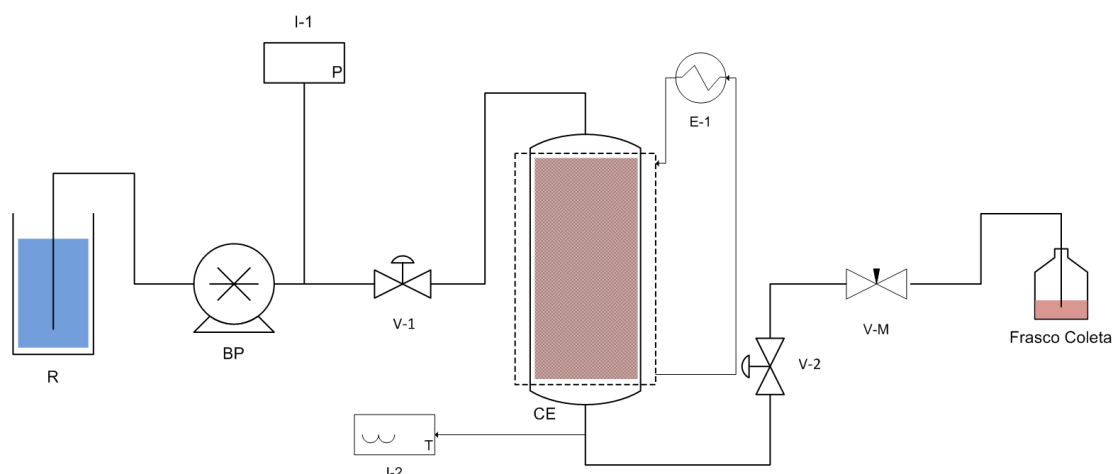


Figura 1 – Fluxograma da unidade de extração. R: reservatório de solvente; BP: bomba HPLC; I-1: indicador de pressão; CE: célula de extração; V-1 e V-2: válvulas de bloqueio; E-1: banho termostático; I-2: indicador de temperatura; V-M: válvula micrométrica.

Os experimentos de extração seguiram um planejamento experimental composto central (Tabela 1), cujas variáveis foram temperatura e percentual de etanol em água. Os parâmetros x_1 e x_2 representam as variáveis codificadas (temperatura e percentual de etanol respectivamente). A pressão, o tempo de extração e a vazão de solvente foram mantidos constantes, 10 MPa, 60 min. e 3 mL/min., respectivamente. A ordem de realização dos experimentos foi aleatória.

Tabela 1 – Planejamento experimental composto central

| Ensaio | Temperatura (°C) | Etanol (%) | x_1 | x_2 |
|--------|------------------|------------|-------|-------|
| 1 | 37 | 15 | -1 | -1 |
| 2 | 73 | 15 | +1 | -1 |
| 3 | 37 | 85 | -1 | +1 |
| 4 | 73 | 85 | +1 | +1 |
| 5 | 30 | 50 | -1,42 | 0 |
| 6 | 80 | 50 | +1,42 | 0 |
| 7 | 55 | 0 | 0 | -1,42 |
| 8 | 55 | 100 | 0 | +1,42 |
| 9 | 55 | 50 | 0 | 0 |
| 10 | 55 | 50 | 0 | 0 |
| 11 | 55 | 50 | 0 | 0 |

2.3. Rendimento global

Uma alíquota de massa conhecida de cada extrato foi submetida à análise de sólidos secos em estufa a vácuo a 60 °C, segundo metodologia da AOAC (1997). O percentual de sólidos secos foi relacionado com a massa de extrato para obter a massa total de soluto recuperado. Com essa informação foi calculado o rendimento global da extração, como mostra a Equação 1.

$$X_0(\%) = 100 \times \frac{m_{\text{soluto}}}{F} \quad (1)$$

Onde: X_0 é o rendimento global; m_{solute} é a massa total de soluto recuperado; e F é a massa de amostra usada para empacotar o leito.

2.4. Análise de fenólicos totais (FT)

A determinação de teor de compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton *et al.* (1999). A partir do extrato seco, prepararam-se diluições aquosas dos extratos em duas concentrações 0,4 e 0,2 mg/mL. Alíquotas de 0,5 mL de amostra dissolvida ou água destilada (branco de calibração) foram misturadas com 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, efetuando-se agitação manual por 15 s. Após 3 minutos, adicionou-se 0,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio e a solução foi diluída com água destilada para completar 5 mL. A mistura foi mantida no escuro por 150 minutos para reagir, logo a absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro UV-vis. A concentração de compostos fenólicos foi estimada usando uma curva de calibração realizada com ácido gálico (15, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg/mL).

2.5. Análise da capacidade antioxidante

A determinação de capacidade antioxidante *in vitro* foi realizada segundo a metodologia de DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil) descrita por Rufino *et al.* (2007), com modificações. Prepararam-se diluições do extrato seco em etanol, nas concentrações de 1 e 0,5 mg/mL. Posteriormente foi preparada uma solução de reagente DPPH (60 µM), dissolvendo 4,8 mg de reagente DPPH em 200 mL de etanol, logo uma solução estoque de Trolox (2000 µM) foi preparada, dissolvendo 25 mg de reagente Trolox em 50 mL de etanol, a partir da solução estoque foram preparadas em balões volumétricos de 5 mL soluções com as seguintes concentrações: 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 µM; para realizar a curva de calibração de Trolox. Em ambiente escuro, transferiu-se para tubos de ensaio alíquotas de 0,1 mL de solução de Trolox, etanol (controle) ou diluição de amostra e logo foi adicionado 3,9 mL de solução de reagente DPPH, após agitação manual por 30 s os tubos foram mantidos no escuro a temperatura ambiente durante 40 minutos, para que a reação ocorresse. Transcorrido esse tempo se realizou a leitura da absorbância no comprimento de onda de 515 nm em espectrofotômetro UV-vis, usando o etanol como branco.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do rendimento global de cada experimento de extração são apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que os maiores rendimentos foram obtidos para os níveis altos de porcentagem de etanol com fraca influência da temperatura. O diagrama de Pareto apresentado na Figura 2 (A) mostra que somente a porcentagem de etanol (linear e quadrática) teve efeito significativo a 95% de confiança. O maior rendimento (6,285%) foi obtido a 55 °C e 100% de etanol. Isto mostra que para o rendimento global, etanol como solvente possui melhor desempenho que a água para recuperar extratos de sementes de maracujá. Liu *et al.* (2009) obtiveram óleo de sementes de maracujá através de extração supercrítica com CO₂. O rendimento atingido por esses autores (25,98 %) foi substancialmente superior ao obtido por esse trabalho. Isso se deve ao fato do CO₂ ter melhor afinidade com óleo do que o etanol. No entanto, dependendo do objetivo, o rendimento global pode não medir a eficiência do processo. No caso deste trabalho, cujo objetivo é a extração de compostos bioativos, é mais interessante a obtenção de extratos com alto teor de compostos fenólicos e elevada

capacidade antioxidante.

Tabela 2 – Rendimento global, fenólicos totais (FT) e atividade antioxidante (DPPH) dos extratos obtidos de sementes de maracujá-azedo - valores expressos pela média \pm desvio padrão

| Ensaio | T (°C) | % Etanol | X_o (%) | FT (mgAGE/100g) | DPPH (mgTE/100g) |
|--------|--------|----------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 37 | 15 | $0,939 \pm 0,022$ | $41,456 \pm 0,5$ | $28,704 \pm 2,3$ |
| 2 | 73 | 15 | $0,956 \pm 0,006$ | $68,195 \pm 0,8$ | $12,870 \pm 0,7$ |
| 3 | 37 | 85 | $1,096 \pm 0,033$ | $92,941 \pm 0,1$ | $117,672 \pm 9,1$ |
| 4 | 73 | 85 | $1,923 \pm 0,007$ | $255,885 \pm 0,3$ | $214,959 \pm 3,9$ |
| 5 | 55 | 50 | $1,016 \pm 0,002$ | $149,773 \pm 0,9$ | $115,481 \pm 2,5$ |
| 6 | 55 | 50 | $0,791 \pm 0,003$ | $120,327 \pm 3,6$ | $97,706 \pm 2,8$ |
| 7 | 55 | 50 | $1,040 \pm 0,006$ | $170,422 \pm 3,1$ | $118,652 \pm 7,4$ |
| 8 | 55 | 100 | $6,285 \pm 0,001$ | $322,166 \pm 2,8$ | $317,261 \pm 7,6$ |
| 9 | 80 | 50 | $1,239 \pm 0,006$ | $286,658 \pm 0,7$ | $194,461 \pm 13,6$ |
| 10 | 55 | 0 | $0,696 \pm 0,001$ | $21,808 \pm 0,1$ | $38,478 \pm 0,95$ |
| 11 | 30 | 50 | $0,788 \pm 0,027$ | $94,013 \pm 0,9$ | $67,654 \pm 0,45$ |

*AGE: Ácido gálico equivalente

**TE: Trolox equivalente

Na Tabela 2 são apresentados também os resultados das análises de fenólicos totais e atividade antioxidante obtida pelo método DPPH. Pode-se observar que os maiores valores de fenólicos totais e capacidade antioxidante foram obtidos com o aumento da porcentagem de etanol e temperatura. Para fenólicos totais somente os fatores porcentagem de etanol e temperatura (linear) tiveram efeitos significativos a 95% de confiança. Para DPPH, porcentagem de etanol (linear), temperatura (linear) e interação entre ambos tiveram efeitos significativos a 95% de confiança (Figura 2 (A) e (B)).

O Ensaio 8 mostrou melhor desempenho nas avaliações de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, 322,166 mgAGE/100g e 317,261 mgTE/100g, respectivamente. Outras pesquisas realizaram estas mesmas determinações para resíduos e polpa de maracujá. Martinez *et al.* (2012) trabalharam com resíduos do maracujá (casca, sementes e restos de polpa, secos e triturados) e os submeteram à extração com dois solventes (metanol/acetona e etanol) a pressão e temperatura ambiente por 24 h. O resultado de compostos fenólicos totais obtido por esses autores na extração com metanol/acetona é próximo ao deste trabalho (246 mgAGE/100g). Por outro lado, a atividade antioxidante foi inferior (127,5 mgTE/100g). Oliveira *et al.* (2009) trabalharam com o mesmo tipo de resíduos de Martinez *et al.* (2012) e os submeteram à extração em Soxhlet por 4 h com *n*-hexano e posteriormente por mais 4 h com metanol, sempre a 60 °C e pressão atmosférica. Os extratos obtidos por metanol apresentaram conteúdo de compostos fenólicos totais igual a 103 mgAGE/100g e capacidade antioxidante não foi reportada em termos de mgTE/100g. Os extratos obtidos por *n*-hexano não exibiram capacidade antioxidante e consequentemente não foram analisados quanto a compostos fenólicos. Valores próximos ao alcançados neste trabalho foram obtidos por Souza *et al.* (2012) quando da extração de polpa de maracujá doce. Estes autores reportaram teor de compostos fenólicos de 245,36 mgAGE/100g e atividade antioxidante de 271 mgTE/100g. Com base nestes resultados pode-se inferir

que o extrato das sementes de maracujá, obtido por fluidos pressurizados, pode ser uma fonte de igual ou maior quantidade de compostos bioativos do que a polpa.

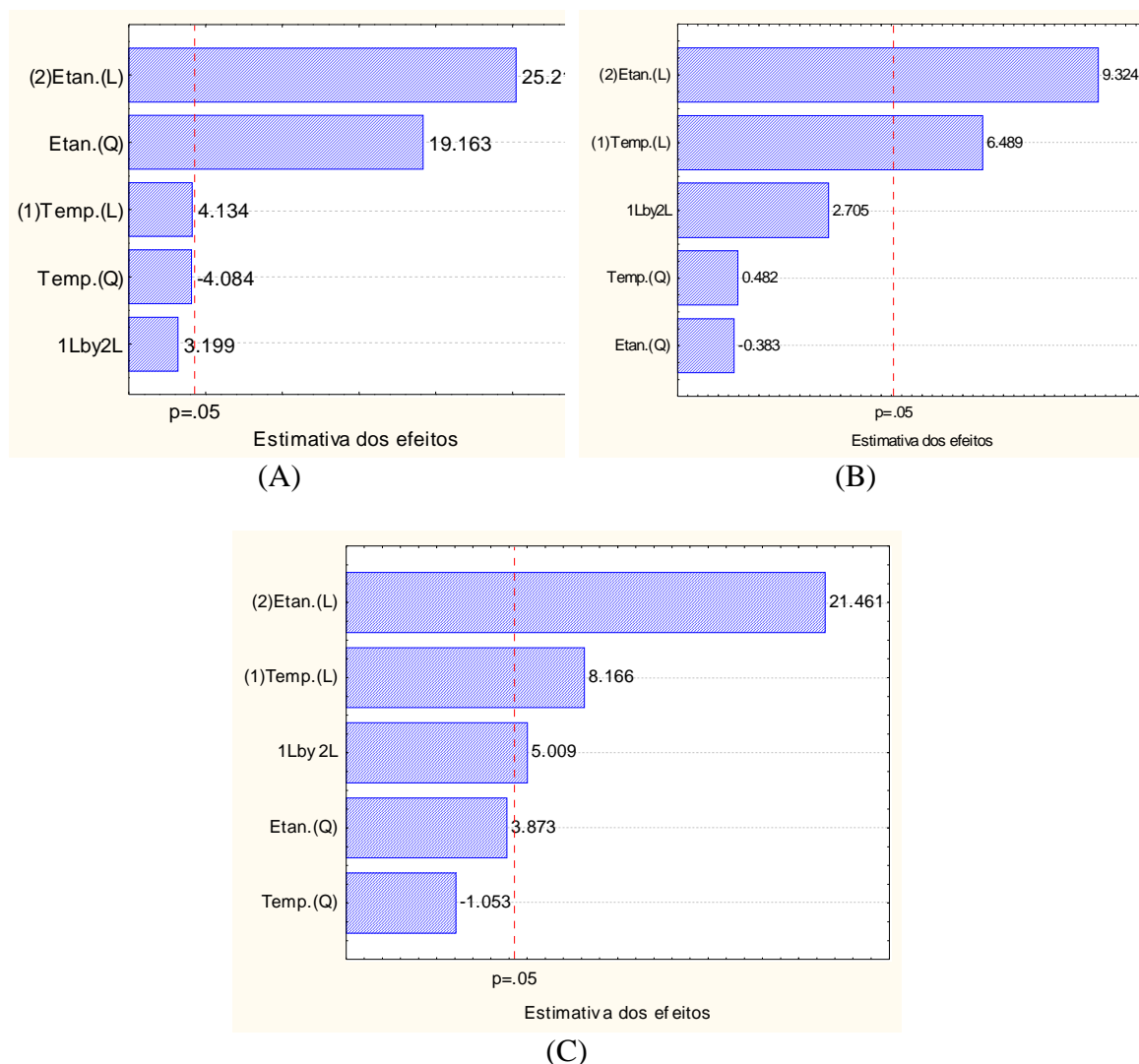


Figura 2 – Diagrama de Pareto para estimativa dos efeitos, Rendimento (A), Fenólicos totais (B) e DPPH (C)

4. CONCLUSÕES

A técnica de extração com fluidos pressurizados demonstrou ser apropriada para a extração de compostos bioativos em sementes de maracujá. O ensaio com maior rendimento global coincidiu com os melhores resultados de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, ou seja, 55 °C e 100 % de etanol, em que se obteve 6,285%, 322,166 mgAGE/100g e 317,261 mgTE/100g. A melhor condição deste trabalho resultou em valores comparáveis com os resultados disponíveis na bibliografia para a fruta inteira e somente polpa.

5. REFERÊNCIAS

AOAC. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*. 16th ed. Gaithersburg, USA: AOAC International, 1997.

- FERREIRA, B. S.; DE ALMEIDA, C. G.; LE HYARIC, M.; DE OLIVEIRA, V. E.; EDWARDS, H. G. M.; DE OLIVEIRA, L. F. C. Raman Spectroscopic Investigation of Carotenoids in Oils from Amazonian Products. *Spectrosc. Lett.*, v. 46, n. 2, p. 122-127, 2013.
- GEROLA, G. P.; BOAS, N. V.; CAETANO, J.; TARLEY, C. R. T.; GONÇALVES, A. C.; DRAGUNSKI, D. C. Utilization of passion fruit skin by-product as lead (II) ion biosorbent. *Water, Air, Soil Poll.*, v. 224, n. 2, 2013.
- HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORÁNS, J.; CIFUENTES, A. Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga. *J. Chromatogr.*, v. 1047, n. 2, p. 195-203, 2004.
- JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 5207-5213, 2003.
- LIU, S.; YANG, F.; ZHANG, C.; JI, H.; HONG, P.; DENG, C. Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology. *The J. of Supercritical Fluids*, v. 48, n. 1, p. 9-14, 2009.
- MARTINEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M. A.; FIGUEROA, J. G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, v. 135, n. 3, p. 1520-6, 2012.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, v. 115, n. 2, p. 469-475, 2009.
- RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre. *Comunicado Técnico (Embrapa Agroindústria Tropical. Online)*, p. 0-3, 2007.
- SANTANA-MÉRIDAS, O.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R. Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochemistry Reviews*, v. 11, n. 4, p. 447-466, 2012.
- SANTOS, D. T.; ALBARELLI, J. Q.; BEPPU, M. M.; MEIRELES, M. A. A. Stabilization of anthocyanin extract from jaboticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent. *Food Res. Int.*, v. 50, n. 2, p. 617-624, 2013.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.*, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; DE DEUS SOUZA CARNEIRO, J. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chemistry*, v. 134, n. 1, p. 381-386, 2012.
- ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? *Braz. J. of Pharmacog.*, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.