

ESTUDO DA EXTRAÇÃO E ACILAÇÃO ENZIMÁTICA DE FLAVONOIDES OBTIDOS A PARTIR DA CASCA DE *Passiflora edulis*

I. X. MARQUES¹, L. R. V. SAMPAIO¹, B. A. S. SILVA², J. R. SOUSA¹, M. C. M. SOUZA²
e L. R. B. GONÇALVES¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

² Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável
E-mail para contato: julianarabelo09@gmail.com

RESUMO – Oxidantes e radicais livres estão ligados a diversas doenças degenerativas humanas e envelhecimento celular. De modo que a aplicação de flavonoides, antioxidantes naturais, torna-se bastante atrativa, pois exibem também atividade anti-inflamatória, antitumoral e antibacteriana. Uma vez que possuem baixa lipossolubilidade, faz-se necessário a utilização de técnicas de esterificação por lipase para melhorar esta característica. Desta forma, foram avaliadas duas técnicas de extração de flavonoides a partir da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*), variando-se o tempo de extração e a razão sólido-líquido. A reação de esterificação foi testada em um sistema reacional modelo utilizando a rotina monohidradata comercial e lipase de *Candida antarctica* tipo B (CALB) imobilizada em resina acrílica, com ácido esteárico. Determinou-se o teor de flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com emprego de detector UV/PDA. Com a técnica de extração por ultrassom obteve-se um teor de flavonoides totais de 0,90 mg/g casca seca, expresso em termos de isoorientina. O sistema reacional com a rotina mostrou que houve formação de produto com e sem controle de água durante a reação.

1. INTRODUÇÃO

Flavonoides são compostos polifenólicos encontrados em uma vasta gama de espécies vegetais, possuindo várias funções no desenvolvimento e defesa destes organismos (Dixon e Harrison, 1990), sendo bastante diversificados, existindo mais de 8.000 tipos de flavonoides identificados (Pietta, 2000). Estes compostos apresentam efeito antioxidante (Spencer *et al.*, 2008), vasodilatador, anti-inflamatório, antitumoral, antibacteriano e antiviral (Bendini *et al.*, 2006). Uma grande quantidade dos flavonoides isovitexina e isoorientina pode ser encontrada na espécie *Passiflora edulis* (Família Passifloraceae), popularmente conhecido como maracujá amarelo e maracujá-azedo (Rudnicki *et al.*, 2007). No Brasil em 2012 foram produzidas cerca de 776,1 mil toneladas de maracujá, concentrando-se principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Minas Gerais e Espírito Santo (EMBRAPA).

Devido à baixa lipossolubilidade os flavonoides possuem pouca capacidade de atravessar camadas celulares e conseqüentemente têm sua distribuição tecidual em organismos vivos reduzida, sendo assim eliminados muito facilmente. Sua baixa

hidrofobicidade também dificulta aplicações em certas formulações farmacêuticas e produtos alimentícios (Passicos *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010). Desta forma, a funcionalização destes compostos com cadeias alifáticas a partir de esterificação enzimática é uma alternativa para alterar sua solubilidade em meios orgânicos.

A extração destes compostos fenólicos é uma das etapas mais importantes para o isolamento e identificação, tendo assim atraído estudos no desenvolvimento de processos e no aumento do rendimento das extrações (Pinelo *et al.*, 2005). Métodos tradicionais de extração por uso de solventes (sólido-sólido, sólido-líquido) e não tradicionais (extração com fluido supercrítico, extração por ultrassom, extração mecânico-química, extração por microondas, extração com infravermelho e líquido pressurizado) (Chua, 2013, Xie *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2014). Independente da técnica, a extração consiste nas etapas de tumefação da matéria-prima e transferência de massa para o solvente, sendo que as variáveis de principal influência no processo são temperatura, razão sólido-líquido, tempo de extração, número de ciclos, concentração e tipo de solvente (Liu *et al.* 2014; Xie *et al.*, 2011).

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a quantidade de flavonoides obtidos pelos métodos de extração sólido-líquido a partir da casca da espécie *P. edulis* e o estabelecimento de um sistema reacional modelo utilizando rutina e CALB imobilizada em resina acrílica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Utilizou-se como matéria prima a casca da espécie *Passiflora edulis* seca e pulverizada adquirida comercialmente.

2.2 Determinação do perfil cromatográfico e quantificação de flavonoides glicosilados do extrato

As análises foram conduzidas em cromatógrafo Thermo Fisher Scientific acoplado a um detector UV/PAD. Utilizou-se coluna Lichrospher RP-18 (250mm x 4 mm; 5 μ m) e fase móvel composta por acetonitrila/água (1:4). O volume de injeção foi de 20 μ L e comprimento de onda de 340 nm. Os flavonoides padrões isoorientina e isovitexina foram fornecidos pela Sigma, grau HPLC (98%).

2.3 Técnicas de extração

Avaliaram-se duas técnicas de extração: ultrassônica e Soxhlet. Em ambas se utilizou solução de etanol 60 % (v/v) como solvente e razão sólido-líquido 20 ml/g de casca seca. As condições de operação foram obtidas a partir da literatura (Ćiric *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). O extrato obtido de cada tipo de extração foi então diluído para 100 ml e armazenado sob refrigeração para posterior análise.

Na extração Soxhlet utilizou-se a razão 20 ml de solvente/g de casca, sendo conduzida a 60°C. Variou-se o tempo de extração em 2 horas em ciclo único e 4 horas divididas em 2

ciclos. Ao fim do ciclo as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm, por 5 minutos a 10°C. A extração por ultrassom foi realizada em sonificador Ultra Cleaner Modelo 1450A. A operação foi conduzida a 25°C durante 2 horas divididas em 4 ciclos de 0,5 hora. Ao fim de cada ciclo as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm, por 5 minutos a 10°C.

2.4 Acilação enzimática de flavonoides

Devido à dificuldade de solubilização do extrato liofilizado elaborou-se um sistema modelo de reação utilizando rutina como flavonoide glicosilado. Seguiu-se a metodologia proposta por Zheng *et al.* (2013) com modificações. A reação foi conduzida em tubos de ensaio com tampa incubados em agitador rotativo a 200 rpm durante 72 horas a 50 °C. A concentração inicial de rutina foi de 1g/L e utilizou-se como solvente a solução álcool terc-amílico/acetona 2:1 (v/v). Utilizou-se ácido oleico como doador acil em uma razão 10 mol de ác. oleico/mol de rutina. Adicionou-se a CALB imobilizada em resina acrílica (Novozym 435) na concentração de 20 g/L. As reações foram conduzidas com e sem peneira molecular (zeólita 3Å) com objetivo de avaliar a influência do teor de água durante a reação. O solvente e o ácido oleico foram previamente secos com zeólita 3Å na concentração 100 g/L. A quantificação do éster de rutina, expresso em termos de rutina, foi realizada por CLAE.

2.5 Determinação do perfil cromatográfico dos constituintes da reação em um sistema modelo

As análises foram conduzidas em cromatógrafo Waters acoplado a detector UV e controlado pelo software Breeze. Utilizou-se coluna Lichrospher RP-18 (250mm x 4 mm; 5µm) fornecida pela Merck para separação e quantificação, com gradiente de eluição de metanol e solução de ácido acético 3% (v/v) em fluxo de 0,8 mL/min: 0,8 mL/min: 0min (30/70), 5 min (100/0), 10 min (100/0), 15 min (30/70), 20 min (30/70) (Ardhaoui et al., 2004). As amostras foram injetadas automaticamente (20µ) e monitorada a 280nm. A curva de calibração foi construída utilizando-se rutina grau HPLC (Sigma) com concentrações entre 5 e 40 mg/L.

3. RESULTADOS

3.1 Análise das técnicas de extração de flavonoides da casca de *P. edulis*

O teor de flavonoides totais obtidos por cada técnica, e suas condições, foram exibidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Teor de flavonoides totais obtidos pelos diferentes métodos de extração

Técnica	Temperatura (°C)	Razão sólido/líquido (g/ml)	Tempo de extração (h)	Nº de Ciclo s	Teor (mg de isoorientina /g de casca seca)
Ultrassom	25	1/20	2	4	0,90
Soxhlet	60	1/20	4	2	0,27
Soxhlet	60	1/20	2	1	0,16

Pelos dados apresentados na Tabela 1, o método de extração por ultrassom apresentou um teor máximo de flavonoides expressos em isoorientina de 0,90 mg/g de casca seca, valor 3,3 vezes maior que o resultado da extração Soxhlet com dois ciclos de 2h. Este estudo tem grande relevância para as futuras etapas de isolamento da isoorientina e isovitexina.

3.2 Sistema modelo de acilação enzimática com rutina

Os sistemas foram avaliados em duas condições: com e sem controle de água durante a reação através da adição de zeólita 3Å ao meio reacional. As reações foram monitoradas através de cromatografia líquida nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.

Os cromatogramas do meio reacional estão apresentados nas Figuras 1 e 2. Observou-se, nos dois sistemas avaliados, a presença de um pico em 8,7 min após 24h de reação que se manteve ao longo das 72 horas de reação. Dada à possibilidade da formação de subprodutos, além da água, durante a esterificação direta dos flavonoides será realizada a caracterização químico-estrutural do produto obtido através de técnicas espectroscópicas, como espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear.

Figura 1 – Cromatograma do meio reacional na ausência de zeólita em t = 0h.

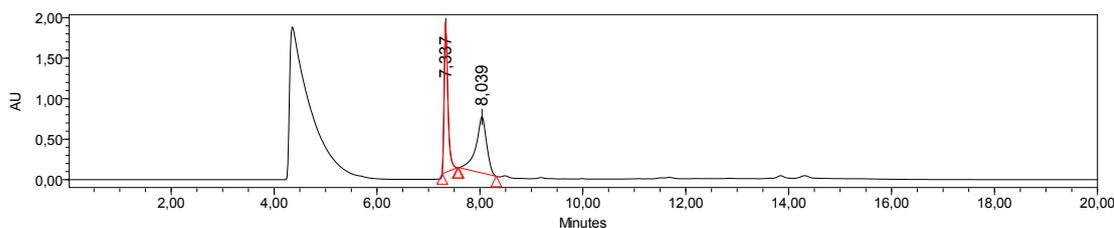
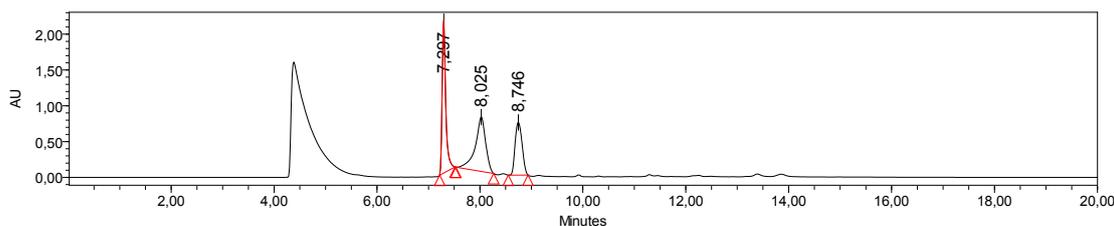


Figura 2 – Cromatograma do meio reacional na ausência de zeólita em t = 72h.



4. CONCLUSÕES

A casca de *P. edulis* (maracujá amarelo) constitui uma fonte promissora de flavonoides. Dentre as técnicas de extração estudadas, a extração com ultrassom forneceu o melhor rendimento, equivalente a 0,90 mg/g de casca seca. O sistema reacional estudado com a rutina mostrou que houve a formação de produto, com e sem controle do teor de água durante a reação. Este será, posteriormente, purificado e caracterizado por técnicas espectroscópicas.

5. REFERÊNCIAS

- ARDHAOUI, M.; FALCIMAIGNE, A.; OGNIER, S.; ENGASSER, J.M.; MOUSSOU, P.; PAULY, G.; GHOU, M. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids, *Journal of Biotechnology*, v. 110, n. 3, p. 265 – 271, 2004.
- BENDINI, A.; CERRETANI, L.; PIZZOLANTE, L.; TOSCHI, T. G.; GUZZO, F.; CEOLDO, S.; MARCONI, A. M.; ANDREETTA, F.; LEVI, M. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. *Eur. Food Res. Technol.*, v.223, p. 102-109, 2006.
- CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, p. 805–817, 2013.
- CIRIC, A.; PROSEN, H.; JELIKIC-STANKOV, M.; DURDEVIC, P. Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in foods amples by LC-MS/MS method, *Talanta*, v. 99, 780 – 790, 2012.
- DIXON, R. A.; HARRISON, M. J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics*, v. 28, p. 165-234, 1990.
- LIU, Y.; HONGWU, W.; CAI, X. Optimization of the extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgius in the response surface methodology, *Journal of Food Science Technology*, 2014
- PASSICOS, E.; SANTARELLI, X.; COULON, D. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. *Biotechnol. Lett.*, v. 26, p. 1073-1076, 2004.
- PIETTA, G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J., Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 2111 – 2117, 2005.
- RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DALPIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chem.*, v. 100, 719-724, 2007.
- SPENCER, J.P.; ABD EL MOHSEN, M. M.; MINIHANE, A. M.; MATHERS, J. C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, v. 99, n. 01, p. 12-22, 2008.
- WANG, A.; ZHANG, F.; HUANG, Y.; LI, H.; WANG, Q.; ZHAOWU, Z.; XIE, T. New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. *J. Med. Plant Res.*, v. 4, p. 847-856, 2010.

XIE, J.; SHI, L.; ZHU, X.; WANG, P.; ZHAO, Y.; SU, W. Mechanochemical-assisted efficient extraction of rutin from *Hibiscus mutabilis* L., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 12, p. 146–152, 2011.

ZHENG, M. M.; WANG, L.; HUANG, F. H.; GUO, P. M.; WEI, F.; DENG, Q. C.; WAN, C. Y. Ultrasound irradiation promoted lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters with unsaturated fatty acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 95, p. 82-88, 2013.