

Extração do óleo da semente de maracujá e encapsulação em lipossomas

Extraction of passion fruit seed oil and liposome encapsulation

RESUMO

Marcelo de Jesus Corte Rosalem
marcelorosalem@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Caroline Casagrande Sipoli
carolinesipoli@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Rúbia Michele Suzuki
rubiasuzuki@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Milena Martins Andrade
milenaandrade@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Vítor Viganô Oliveira
vitoro@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



O maracujá é um fruto muito cultivado no Brasil e sua produção se estende em vários estados do país. O intuito deste trabalho foi agregar valor a um resíduo que seria descartado por uma indústria de polpa de fruta extraindo lipídio da semente de maracujá. O processo de extração foi baseado no método de Bligh & Dyer empregando uma abordagem com solventes menos tóxicos, substituindo o clorofórmio e metanol por hexano e etanol. Buscando uma melhor condição de extração, as temperaturas e tempo de agitação foram variadas. Além disso, utilizou-se a lipase, uma enzima que catalisa a hidrólise de triacilgliceróis a diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos, além de glicerol. A extração teve melhor eficiência em pontos de 15 minutos sob a temperatura de 45 e 60 °C. Como em condições ambientes os lipídios podem sofrer degradações, lipossomas foram usados para incorporar o óleo extraído, protegendo assim os compostos bioativos principais do óleo, por meio da injeção de etanol, avaliando sua polidispersidade e seu diâmetro hidrodinâmico.

PALAVRAS-CHAVE: Lipídios. Lipase. Nanoparticulados.

ABSTRACT

Passion fruit is a widely cultivated fruit in Brazil and its production extends to several states in the country. The aim of this work was to add value to a residue that would be discarded by a fruit pulp industry extracting lipid from the passion fruit seed. The extraction process was based on the Bligh & Dyer method using an approach with less toxic solvents, replacing chloroform and methanol with hexane and ethanol. Seeking a better extraction condition, the temperatures and stirring time were varied. In addition, lipase was used, an enzyme that catalyzes the hydrolysis of triacylglycerols to diacylglycerols, monoacylglycerols and fatty acids, in addition to glycerol. The extraction had better efficiency in 15 minutes at 45 and 60 °C. As in ambient conditions lipids can suffer degradation, liposomes were used to incorporate the extracted oil, thus protecting the main bioactive compounds in the oil, through the injection of ethanol, evaluating its polydispersity and its hydrodynamic diameter.

KEYWORDS: Lipids. Lipase. Nanoparticulate.

INTRODUÇÃO

A cultura do maracujá abrange diversas áreas do mercado consumidor, dentre elas estão dos setores alimentício, farmacêutico, estético e além do uso na ornamentação de ambientes (FERNANDES et al. 2015). Segundo o IBGE (2018), o Brasil teve uma produção anual de 600.000 toneladas, tendo um rendimento médio de 14 quilos do fruto por hectare. Apesar de ser o maior produtor mundial, seu rendimento é considerado baixo de acordo com a EMBRAPA (2017), pois quando o plantio é realizado em condições otimizadas, sua produtividade passa a ter em média 50 toneladas por hectare em um ano.

Além do baixo rendimento, uma parte do fruto é descartada como resíduo, e conforme Coelho et al. (2001), esses resíduos provenientes da indústria de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de cascas, caroços e outros. Esses materiais servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação. Visando o reaproveitamento desse material que seria descartado, é possível agregar valor ao produto.

O projeto de pesquisa baseou-se na extração do óleo desses resíduos, no caso, a semente do maracujá, por meio de solventes. A extração de óleo (OM) com solvente é um processo de transferência de constituintes solúveis de um material inerte para um solvente com o qual a matriz se acha em contato (REGITANO-D'ARCE; LIMA, 1987).

Existem diversos meios para se realizar a extração de lipídios, e além disso, esses métodos apresentam várias ramificações com o intuito de sempre otimizar tais processos. O método mais comum, é o do Bligh & Dyer (1959), e tem como finalidade a formação de sistemas de duas fases empregando solventes. Os solventes usados comumente são clorofórmio, metanol e água, possuindo uma capacidade de extrair tanto os lipídios neutros e os lipídios polares eficientemente, conforme Brum et al. (2009).

Tendo conhecimento do método apresentado e de suas ramificações, foi proposto um novo modelo com o objeto de ser tão eficiente quanto ao mais usual, porém com menor toxicidade. Por isso, houve uma substituição do metanol pelo etanol e do clorofórmio pelo hexano. Além disso, foi acrescentada à extração a lipase imobilizada em Celite, uma enzima que realiza a hidrólise da parede celular e libera o óleo para o meio aquoso, conforme Nascimento (2008).

Com o lipídio já extraído, foram realizadas análises para determinar as quantidades de ácidos graxos presentes no óleo. Os ácidos encontrados foram o das séries ômega 3 e 6, que são estruturalmente diferentes e suas funções biológicas são opostas (BARBOSA et al. 2007). Além disso, eles competem entre si pelas mesmas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia (SALEM, 1999).

Esse lipídio quando exposto à um meio desfavorável à sua conservação, tal como variação de pH do meio, de temperatura e até mesmo a incidência de luz, diminuindo assim a qualidade do óleo extraído. Portanto, o processo de encapsulação do óleo em lipossomas surge como uma alternativa que para proteger das condições adversas. Elas são vesículas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso (BATISTA et al. 2007). Os lipossomas são produzidos por fosfolipídios, permitindo assim a

encapsulação de substâncias que possuem afinidade com a água, hidrofílica, assim como a encapsulação de substâncias que têm afinidade com os lipídios, lipofílica.

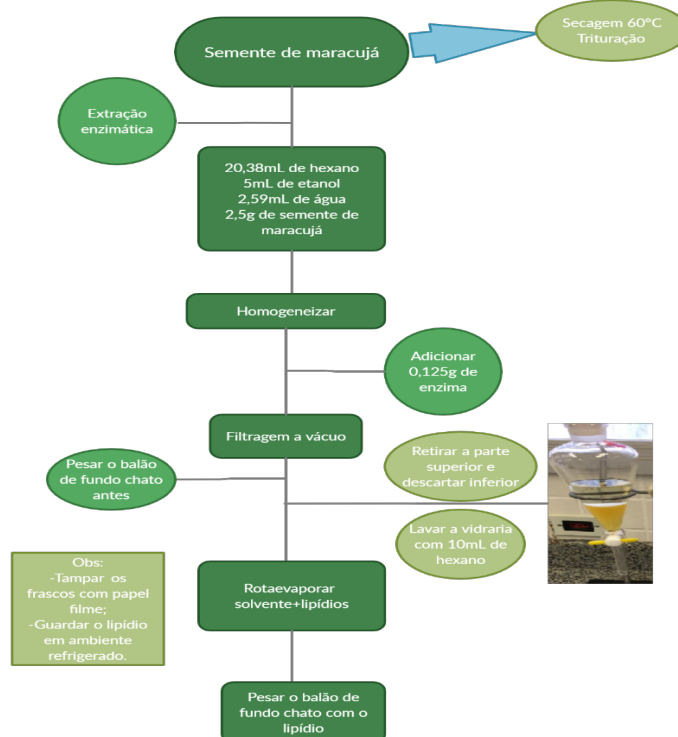
O presente trabalho teve como finalidade a extração de lipídios de um resíduo, agregando valor a um produto que seria descartado ou que contaminaria o meio ambiente. Além disso, a partir da injeção de etanol, proteger esse lipídio de ações externas que possam diminuir a sua qualidade e observar se ele seria apropriado para a encapsulação.

MATERIAL E MÉTODOS

Antes de iniciar as extrações, foi necessário a preparação das sementes do maracujá, para isso, elas foram lavadas para separar qualquer material que pudesse contaminá-las durante as extrações, como a separação da polpa das sementes. Após a lavagem, foram colocadas em estufa para retirar toda a umidade da parte externa. Com as sementes já secas, elas foram trituradas por um miniprocessador de alimentos, aumentando sua superfície de contato, com o intuito de melhorar o rendimento das extrações.

Após a preparação das sementes, acrescentou-se hexano, etanol, água e enzima conforme apresenta o fluxograma da Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma da extração enzimática.



Fonte: Próprio autor (2020).

Após a adição dos solventes, buscou-se avaliar um melhor tempo sob uma determinada temperatura para que a quantidade de lipídio extraída tenha um

bom rendimento. Os tempos estudados foram de 2,5, 5, 15, 30 e 1440 minutos em agitação, cada um deles variando sob as temperaturas de 30, 45 e 60°C.

Após o período estipulado, as soluções foram adicionadas ao funil de decantação por um período de 24 horas, formando uma solução bifásica. O sobrenadante consiste na solução apolar, contendo óleo e hexano, já a parte inferior consiste na solução polar.

Com o lipídio já extraído, foi possível fazer as análises qualitativas, determinando o índice de acidez (IA), conforme a ANP (2017). Para tal fim, adicionou-se 2 g da amostra do lipídio juntamente com 50 mL de metanol, titulando em triplicatas com solução de hidróxido de potássio 0,01 mol/L e 5 gotas de fenolftaleína a 1% como indicador.

As preparações de ésteres metílicos de ácidos graxos foram efetuadas conforme método proposto por Hartman et al. (1973) e separados utilizando cromatógrafo a gás, equipado com coluna capilar de sílica fundida – Select Flame Varian (100 m de comprimento, 0,25 µm de espessura do filme cianopropil polisiloxano e 0,25 mm de diâmetro interno), conforme Martin et al. (2008), e detector de ionização em chama. As injeções foram realizadas em duplicata e volume injetado de 2 µL. O metil ésteres do ácido tricosanóico (23:0Me) foi utilizado como padrão interno.

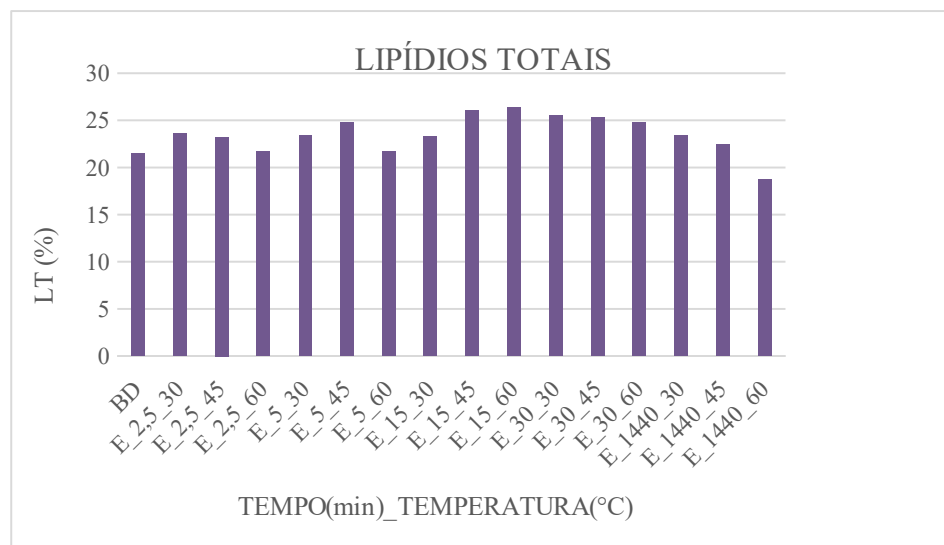
Para a produção dos lipossomas foi utilizado o método de injeção de etanol, em conformidade com Zômpero (2013). Utilizou-se a lecitina de soja para produção dos lipossomas. A condição de temperatura ficou na faixa de 50 a 60°C. A injeção da fase orgânica em água foi realizada considerando uma razão de 10% v/v de solução orgânica em água e com uma vazão de 30 mL/min. Na produção do lipossomas, o óleo era dissolvido no etanol e variou-se de 5 a 17%(m/m) pela quantidade de OM em relação à massa de lipídios.

As partículas foram caracterizadas considerando o diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas que foram avaliadas por meio da técnica de espelhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering – DLS).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 2 apresenta os resultados dos lipídios totais (LT) que foram obtidos e analisados nas extrações em cada ponto. No eixo X, o primeiro ponto apresentado é o do método Bligh & Dyer e os restantes são as extrações enzimáticas, separadas pelo tempo em minutos e a sua temperatura em graus Celsius.

Figura 2: Extração de LT (%).

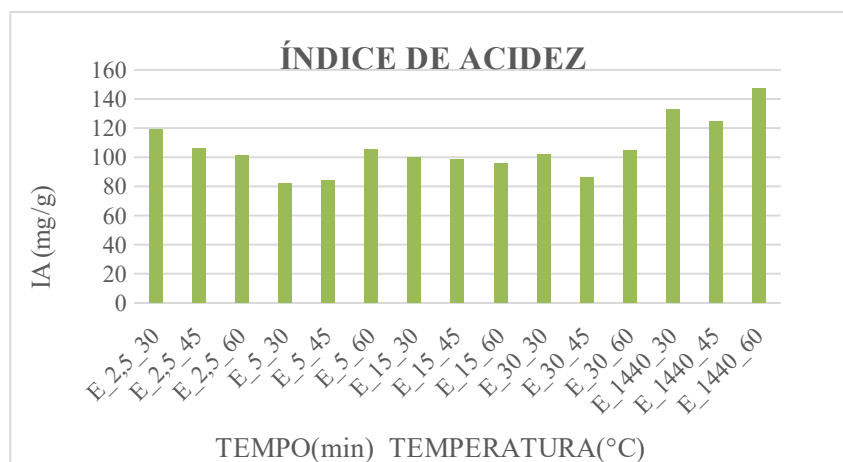


Fonte: Próprio autor (2019).

Na grande maioria, os pontos da extração enzimática foram superiores ao método proposto por Bligh & Dyer, exceto o ponto em que foi operado a 60°C sob uma agitação que durou 24 horas (1440 minutos). Ademais, destacaram-se dois pontos, ambos com 15 minutos de agitação, sendo suas temperaturas de 45 e 60°C, que é explicado por Andrade et al. (2013) pois a melhor temperatura para a enzima é de 55 °C.

Em termos de IA, a Figura 3 apresenta valores altos em todos os pontos, o que revela uma elevação nos índices de ácidos graxos livres. Isso se deve ao fato de que a enzima está hidrolisando o lipídio que foi extraído pois a lipase imobilizada em Celite possui a capacidade de hidrolisar óleos em meio aquoso. Apesar disso, por Sharma et al. (2001), a esterificação pode ocorrer em presença de solventes orgânicos, explicando a variação do IA que em tempos maiores são favoráveis a hidrólise.

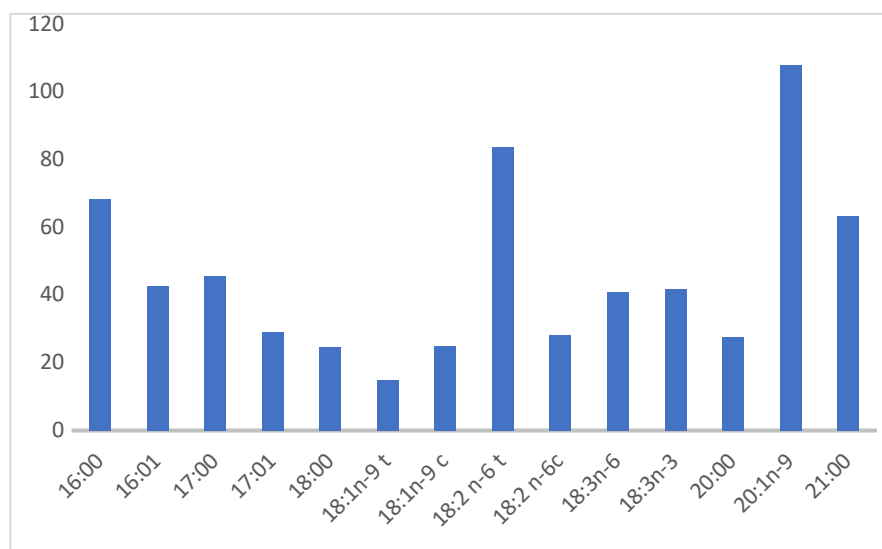
Figura 3: Índice de acidez.



Fonte: Próprio autor (2019).

Esse elevado índice de acidez apresentado na Figura 3 revela que no lipídio existe uma ruptura em sua longa cadeia, liberando os ácidos graxos. Com esse caráter ácido, o óleo sofrerá uma deterioração rápida, afirmando a importância da proteção desse lipídio pela encapsulação por meio de nanopartículas, garantindo assim, uma manutenção das propriedades desse óleo por um tempo maior. A Figura 4 apresenta a quantidade de ácidos graxos livres e os lipídios na forma mono, di e triglicerídios. Vale a pena destacar que a Figura 4 apresenta apenas a composição do óleo extraído apenas com os solventes substituídos, posteriormente será realizada análise da metodologia realizada com as enzimas.

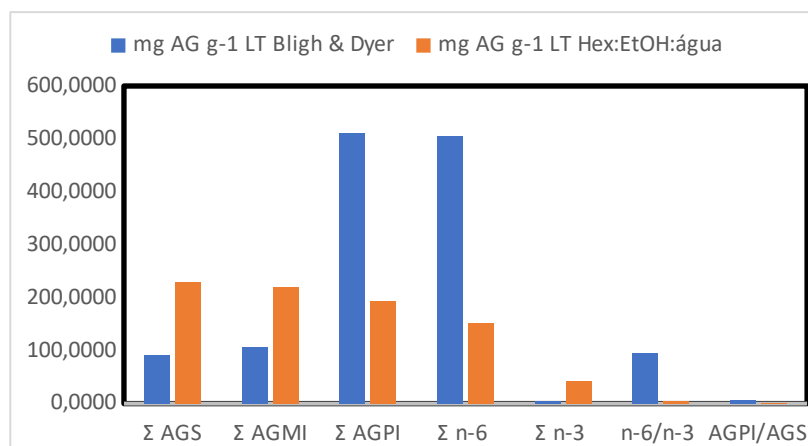
Figura 4: Composição do óleo extraído nas melhores condições. Composição pelo novo método.



Fonte: Próprio autor (2020).

A Figura 5 apresenta as comparações das extrações químicas com a do método que foi utilizado como referência, *Bligh & Dyer*, revelando as quantidades de ômega 3 e 6 presentes nos lipídios das sementes e até sua razão.

Figura 5: Composição do óleo de semente de maracujá por Bligh & Dyer (1959) e pelo novo método (hexano:etanol:água, 3,6:1,0:0,5).

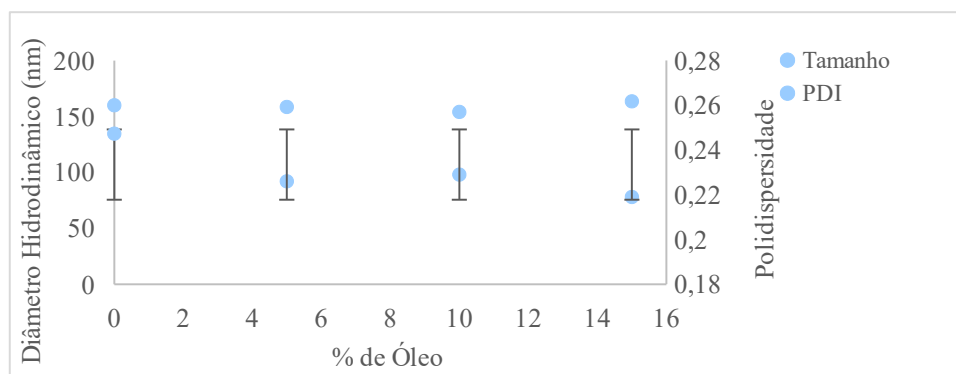


Fonte: Próprio autor (2020).

Com o intuito de averiguar o potencial desse lipídio pelo método descrito, foi realizado uma incorporação deste à lipossomas pela injeção de etanol. Foram verificados diâmetro hidrodinâmico e sua polidispersidade (PDI) dos lipossomas produzidos com o óleo incorporado pela técnica de Dynamic Light Scattering (DLS). A concentração de fosfolipídio escolhida foi de 4,64 mM.

O comportamento das partículas obtidas com 0, 5, 10 e 15% de óleo incorporado em relação à massa de lipídio utilizada para a produção é apresentada na Figura 6. A literatura demonstra que o aumento da porcentagem de material encapsulado geraria um aumento no tamanho das nanopartículas (Gómez-Mascaraque et al. 2017). Entretanto, foi observado que com essa concentração de lipossomas o aumento do diâmetro hidrodinâmico não foi significativo. Ademais, a análise da PDI demonstrou grau de homogeneidade das nanopartículas, sabendo que esse valor pode variar de 0 a 1. Desta forma, todas as porcentagens de óleo estudadas apresentaram baixos valores de polidispersidade, mostrando alta potencialidade do sistema produzido.

Figura 6: Diâmetro e PDI das nanopartículas obtidas.



Fonte: Próprio autor (2019).

CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos foi possível concluir que o método de extração utilizando rotas alternativas que são menos nocivas ao meio ambiente, demonstrou uma eficiência tão boa quanto ao método Bligh & Dyer, além de conseguir agregar valor a um resíduo. Sendo assim, a incorporação desse lipídio em sistemas particulados apresentou resultados promissores. Os óleos possuem características essenciais e a sua proteção é de extrema importância para futuras aplicações nas áreas de alimentos, cosméticos e até na produção de fármacos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelos equipamentos cedidos para realização das extrações e aos professores que sempre me auxiliam nos procedimentos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. M.; BARBOSA A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B. et al.; Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meals: optimization. Immobilization and application for biodiesel production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?id=268>, Acesso em janeiro de 2020.

BARBOSA, K. B. F. et al. Ácidos graxos das séries ômega 3 e 6 e suas implicações na saúde humana Omega-3 and 6 fatty acids and implications on human health. **Omega**, v. 32, n. 2, p. 129-145, 2007.

BATISTA, Cinthia Meireles; CARVALHO, Cícero Moraes Barros de; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BERNACCI, Luís Carlos; MELETTI, Laura Maria Molina; SOARES-SCOTT, Marta Dias. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 355-356, 2003.

BLIGH, E. Graham; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRUM, Aelson Aloir Santana et al. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

COELHO, MARIA ALICE ZARUR et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca do coco verde. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2001.

CÓRDOVA, KATIELLE R. VONCIK et al. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, 2005.

FERNANDES, D. A.; ARAUJO, Maicon Marinho Vieira; CAMILI, Elisangela Clarete. Crescimento de plântulas de maracujazeiro-amarelo sob diferentes lâminas de irrigação e uso de hidrogel. **Revista de Agricultura**, v. 90, n. 3, p. 229-236, 2015.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G., SIPOLI, C. C., de LA TORRE, L. G., & LÓPEZ-RUBIO, A. (2017). Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. **Food chemistry**, 233, 343-350.

HARTMAN, Leopold; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, v. 22, n. 6, p. 475-6 passim, 1973.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal 2018. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/0>. Acesso em: 21/05/2020.

MARTIN, C. A.; OLIVEIRA, C. C.; VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for the gas chromatographic analysis of trans fatty acids. **Journal of Chromatography**, v. 1194, p. 111-117, 2008

NASCIMENTO, Rhutynéia Joana Silva do et al. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 498- 502, 2008

REGITANO, d'ARCE; MAB, LIMA. UA Emprego de álcool etílico na extração de óleo de sementes de girassol (*Helianthus annuus*). **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 1987.

REVISTA DA FRUTA. <https://revistadafruta.com.br/eventos/brasil-e-atualmente-o-maior-produtor-mundial-de-maracuja,306010.jhtml>. Acesso em: 21/05/2020.

SALEM JR, N. Introduction to polyunsaturated fatty acids. **Background**, v. 3, n.1, p. 1-8, 1999.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p.627-662, 2001.

STATISTICA 8.0 SOFTWARE (2007). Tucks: StatSoft.

ZÔMPERO, R. H. F. Desenvolvimento e otimização do método de injeção de etanol para produção de lipossomas contendo β -caroteno visando sua aplicação na indústria de alimentos. 95 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.