

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora
edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener)**

Maria Luiza Zeraik

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências, área Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janete Harumi Yariwake

São Carlos
2010

Aos meus amados pais, Otavio e Marcia, por todo amor e carinho, por serem o sustento de minha vida, o estímulo de minhas conquistas e alegria de vencê-las. Às minhas irmãs, Ana Eliza e Vivian, por todos os momentos de alegria, ensinamentos, troca de experiências, ajudas e apoio durante este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Janete H. Yariwake, por todos estes anos de ensinamentos, confiança, paciência, exemplo de competência profissional e pela oportunidade de trabalhar no Grupo de Análise Fitoquímica.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca, por terem aceitado a participar da avaliação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luc Angenot e todos os integrantes do Laboratoire de Pharmacognosie (Université de Liège, Bélgica), onde parte do trabalho foi realizada, em especial a Prof^a. Dr^a. Monique Tits, Dr. Michel Frédérich, Jean-Noël Wauters, Delphine, Maria Carolina e César. À Joëlle Widart pela ajuda nas análises realizadas por CL-EM/EM.

Ao Prof. Dr. Didier Serteyn, Prof. Dr. Ginette Deby-Dupont e Dr. Thierry Franck do Centre for Oxygen Research & Development (CORD), da Université de Liège, Bélgica, onde parte do trabalho foi realizada.

Aos professores integrantes do GMEME: Sergio A. S. Machado, Luiz Alberto Avaca e Luiz Henrique Mazo pelo uso do laboratório no início deste trabalho.

À todos meus queridos amigos que fizeram e fazem parte do Grupo de Análise Fitoquímica: Tati, Benê, Fabiana, Éder, Alessandra, Renatinha, Cíntia e Vânia, pela amizade e grande ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus amigos: Olivia, Paulo, Carol, Vanessa, Jéssica, Natália, Géssica e Murilo, pelos momentos de alegria e amizade.

À minha amiga Marília pela sincera amizade durante todos esses anos.

À Prof^a. Dr^a. Magali C. M. da Silva e ao agricultor Neivaldo de Oliveira pelos frutos de maracujá concedidos.

Ao Dr. Luís Carlos Bernacci do Herbário IAC pela identificação das espécies de *Passiflora*.

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas concedidas no Brasil e exterior, respectivamente.

À Fapesp pelo auxílio ao laboratório.

"Os analfabetos do próximo século não são aqueles que não sabem ler ou escrever, mas aqueles que se recusam a aprender, reaprender e voltar a aprender".

(Alvin Toffler)

RESUMO

Atualmente tem-se dado grande ênfase aos alimentos funcionais, pois atuam na prevenção e auxiliam na recuperação de várias doenças, como doenças inflamatórias crônicas, cardiovasculares e câncer, por apresentarem principalmente flavonoides, que previnem lesões oxidativas, propiciando benefícios à saúde. O Brasil é o maior produtor mundial do maracujá, e em vista disto é de suma importância o desenvolvimento de métodos analíticos e estudos de atividade antioxidante e anti-inflamatória do fruto de maracujá, visando sua possível utilização como alimento funcional e produção de possíveis fármacos. *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener, conhecida como maracujá azedo ou amarelo é a espécie mais cultivada e comercializada no Brasil.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: desenvolver e validar um método analítico por CLAE-UV/DAD (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada detector de arranjo de fotodiodos) para quantificação da flavona isoorientina, presente na polpa de *P. edulis*; quantificação dos flavonoides totais desta espécie, usando um padrão de baixo custo (rutina); comparar as técnicas CLAE e CCDAE (cromatografia em camada delgada de alta eficiência) e analisar a isoorientina nas cascas dos frutos de *P. edulis* infectada com o vírus PWV e cascas sadias por CCDAE; quantificar as proteínas totais e avaliar as atividades antioxidantes e anti-inflamatória dos extratos de cascas de *P. edulis* e da polpa dos frutos de *P. edulis* e *P. alata*, empregando-se o método do DPPH*, e os ensaios de QLuc (quimioluminescência dependente de lucigenina), ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), e SIEFED (*Specific Immunologic Extraction Followed by Enzymatic Detection*).

Os resultados mostraram que o método desenvolvido por CLAE-UV/DAD foi adequado e eficiente para quantificação de isoorientina e de flavonoides totais na polpa de *P. edulis*, apresentando especificidade, linearidade, exatidão, precisão, dentro das faixas internacionalmente aceitas. Além disso, este método foi aplicado com sucesso nas análises de flavonoides em cascas de *P. edulis* e polpa de *P. alata*.

O trabalho mostrou as vantagens da utilização da técnica CCDAE, como a realização de análises mais rápida e econômica, com baixo consumo de solvente e resíduos gerados frente à CLAE-UV/DAD.

Por meio da técnica CL-EM/EM (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem) foi possível identificar as flavonas isoorientina e isovitexina na polpa de *P. edulis*.

Os extratos de cascas de *P. edulis* apresentaram maior capacidade redutora de radicais (método do DPPH*), seguido das polpas de *P. edulis* e *P. alata*, respectivamente. Os extratos de cascas também mostraram maior inibição da produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) pelos neutrófilos ativadas e da atividade da MPO (mieloperoxidase) isolada, porém verificou-se que todos os extratos testados não modificaram a desgranulação dos neutrófilos, não influenciando a liberação de MPO no plasma. Assim, concluiu-se que a atividade antioxidante pode estar diretamente relacionada com a concentração de isoorientina presente nos extratos. A grande quantidade de proteínas e isoorientina encontrada nas cascas de *P. edulis*, se comparada à polpa de *P. edulis*, aliada à elevada atividade antioxidante e anti-inflamatória, sugere o potencial das cascas de *P. edulis* como um alimento funcional, ou

Resumo

como possível fonte de flavonoides naturais para a produção de fármacos, sugerindo assim o aproveitamento deste grande resíduo industrial.

Palavras-chave: maracujá, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, frutos, flavonoides, CLAE-UV/DAD, CCDAE, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Functional foods have been the focus of many studies nowadays, because they act preventing and assisting in the recovery of several diseases, such as chronic inflammatory, cardiovascular and cancer, due to they have mainly flavonoids, which prevent oxidative damage, providing health benefits. Brazil is the largest producer of passion fruit; therefore, it is very important to develop analytical methods and studies of antioxidant and anti-inflammatory activities of passion fruit, intending to its use as a functional food and in the development of drugs. *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener, known as yellow passion fruit, is the most cultivated and marketed species in Brazil.

Therefore, the objectives were: to develop and validate an analytical method by HPLC-UV/DAD (high-performance liquid chromatography with photo-diode array detection) for quantification of isoorientin present in the pulp of *P. edulis* and quantification of total flavonoids of this specie, using a low-cost standard (rutin); to compare HPLC and HPTLC (high-performance thin layer chromatographic) techniques and to analyze isoorientin in the peels of *P. edulis* fruits infected by PWV virus and healthy peels by HPTLC; to quantify the proteins and to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of the extracts of *P. edulis* peels and *P. edulis* and *P. alata* pulp, using the method of DPPH[•], QLLuc (chemiluminescence dependent of lucigenin), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), and SIEFED (specific immunologic extraction followed by enzymatic detection).

The results showed that the HPLC-UV/DAD method was suitable and efficient for isoorientin quantification and total flavonoids in the *P. edulis* pulp, with specificity, linearity, accuracy, precision, within internationally acceptable limits. Moreover, this method was successfully applied to the analysis of flavonoids in the *P. edulis* peels and *P. alata* pulp.

The study presented the advantages of using the HPTLC technique such as to perform faster and cheaper analysis, with low solvent consumption and waste generated compared to HPLC-UV/DAD.

Using LC-MS/MS technique (liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection) the flavones isoorientin and isovitexin were identified in the pulp of *P. edulis*.

The extracts of peels of *P. edulis* showed the higher radical scavenging ability (DPPH[•] method), followed by *P. edulis* and *P. alata* pulps, respectively. The peels extracts also showed greater inhibition of ROS (reactive oxygen species) production by neutrophils activated and isolated MPO activity, but it was found that the extracts did not alter the neutrophils degranulation and does not influence the MPO release in the plasma. Therefore, it was concluded that the antioxidant activity might be directly related to the concentration of isoorientin present in the extracts. The high amount of protein and isoorientin found in the *P. edulis* fruit peels, compared with *P. edulis* pulp, and the high antioxidant and anti-inflammatory activities, suggests the potential of the *P. edulis* fruit peels as functional food or a possible source of natural flavonoids for drugs production, suggesting the use of this substantial industrial waste.

Keywords: passion fruit, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, fruit, flavonoids, HPLC-UV/DAD, HPTLC, antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Maracujá azedo: <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener (a) flor e (b) fruto.	24
Figura 2. Maracujá doce: <i>Passiflora alata</i> Dryander (a) flor e (b) fruto.	24
Figura 3. <i>Passiflora edulis</i> infectada com o vírus PWV (Passion fruit Woodeness Virus).....	26
Figura 4. Estrutura geral dos flavonoides.	33
Figura 5. Flavonas relatados na polpa e cascas dos frutos de <i>P. edulis</i>	34
Figura 6. Representação esquemática de um sistema de detecção densitométrica por fluorescência.	38
Figura 7. Esquema geral de um cromatógrafo para CLAE.....	41
Figura 8. Esquema de um detector de arranjo de fotodiodos.....	42
Figura 9. Interface do tipo eletrospray utilizada para o acoplamento CL-EM.	45
Figura 10. Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo.....	46
Figura 11. Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm da fração flavonoídica de <i>P. edulis</i> . (*) Picos identificados como flavonoides. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B); 0-10 minutos, 12%-16% de B em A e 10-30 minutos, 16-20% de B em A, vazão 0,8 mL min ⁻¹ , temperatura do forno= 40 °C (item 2.4.2.2).	75
Figura 12. Espectro UV/DAD e estrutura da isoorientina (pico com $t_r = 13,217$ minutos no cromatograma da Figura 11) presente na fração flavonoídica do extrato de <i>P. edulis</i>	75
Figura 13. Gráfico de Pareto, indicando os valores dos efeitos padronizados.	76
Figura 14. Superfície de resposta estimada para área relativa da flavona isoorientina em função do tipo e proporção de solvente.....	78
Figura 15. Gráfico de contorno para a área relativa da isoorientina em função do tipo e proporção de solvente.....	78
Figura 16. Placas CCD reveladas com NP/PEG 400 e visualizadas sob luz UV ($\lambda = 366$ nm). 1- extrato de <i>P. edulis</i> ($R_F = 0,36$); 2- solução-padrão de isoorientina ($R_F = 0,35$); 3- extrato de <i>P. alata</i> . Fase móvel: acetato de etila/ácido fórmico/água (82:9:9 v/v).	80

Lista de Figuras

- Figura 17.** Placas CCD reveladas com NP/PEG 400 e visualizadas sob luz UV ($\lambda=366$ nm). 1- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico; 2- extrato de *P. edulis* fração acetato de etila; 3- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico; 4- padrão de hiperosídeo (H) e de rutina (R); 5- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico, 6- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico, 7- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico. Fase móvel: acetato de etila/ácido fórmico/água (82:9:9 v/v).....81
- Figura 18.** Estrutura dos flavonoides: (9) hiperosídeo (quercetina-3-O-galactosídeo), (10) rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo).....81
- Figura 19.** Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda=330$ nm da fração flavonoídica de *P. edulis* obtida por SPE em C_{18} (item 2.3.3). Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B); 0-10 minutos, 12%-16% de B em A e 10-30 minutos, 16-20% de B em A, vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno de $40 \text{ }^\circ\text{C}$84
- Figura 20.** Cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD ($\lambda=330$ nm) da fração flavonoídica de *P. edulis*, $t_r=13,21$ minutos (A) e do padrão isoorientina, $t_r=13,20$ minutos (B).....84
- Figura 21.** Espectros UV/DAD da fração flavonoídica de *P. edulis*, $t_r=13,21$ minutos (A) e do padrão isoorientina, $t_r=13,20$ minutos (B) (cromatograma da Figura 20)....85
- Figura 22.** Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda=330$ nm da fração flavonoídica de *P. alata*. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B); 0-10 minutos, 12%-16% de B em A e 10-30 minutos, 16-20% de B em A, vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno de $40 \text{ }^\circ\text{C}$85
- Figura 23.** Cromatograma do íon molecular (TIC) do extrato total de *P. edulis* obtido por CL-EM, ionização eletrospray, modo negativo. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A), 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B). Demais condições cromatográficas descritas no item 2.4.2.2.....86
- Figura 24.** Cromatograma do íon total (TIC) da fração acetato de etila de *P. edulis* obtido por CL-EM, ionização eletrospray, modo negativo. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A), 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B). Demais condições cromatográficas descritas no item 2.4.2.2.87
- Figura 25.** Cromatograma de massas (A) do íon m/z 431 do padrão de isovitexina, (B) do íon m/z 431 da fração acetato de etila de *P. edulis*, (C) do íon m/z 447 do padrão de isoorientina, (D) do íon m/z 447 da fração acetato de etila de *P. edulis*....88

Lista de Figuras

- Figura 26.** Espectros CL-EM/EM, ionização eletrospray, modo negativo, energia de colisão 18,0 eV: (A) do íon m/z 431 do padrão de isovitexina, (B) do íon m/z 431 do pico de $t_r = 19,46$ minutos da fração de *P. edulis* (Fig. 12), (C) do íon m/z 447 padrão isoorientina, (D) do íon m/z 447 do pico de $t_r = 14,09$ minutos de m/z 447 da fração de *P. edulis* (Fig. 22).89
- Figura 27.** Caminhos de fragmentação para as flavonas isovitexina e isoorientina...90
- Figura 28.** Cromatograma do íon total (TIC) da fração acetato de etila de *P. alata* obtido por CL-EM, ionização eletrospray, modo negativo. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A), 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B). Demais condições cromatográficas descritas no item 2.4.2.2.91
- Figura 29.** Espectros CL-EM/EM obtido com ionização eletrospray e modo negativo, energia de colisão de 18,0 eV: (A) do íon m/z 133 do pico de $t_r = 3,70$ minutos da fração de *P. alata*, (B) do íon m/z 133 do padrão de ácido málico.91
- Figura 30.** Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm da fração flavonoídica de *P. edulis* e espectro UV/DAD obtido em três diferentes regiões do pico de isoorientina ($t_r = 13,21$ minutos).93
- Figura 31.** Estrutura dos flavonoides: (3) isoorientina, (10) rutina; Glu: glucose; Rha: ramnose.94
- Figura 32.** Curvas analíticas obtidas por diferentes métodos: adição de padrão (preto) e padrão externo (vermelho); $X_{analito}$ representa a concentração do analito na amostra.95
- Figura 33.** Curva analítica de rutina em metanol 80%.96
- Figura 34.** Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm da fração flavonoídica de *P. edulis*. Os picos numerados foram identificados como possíveis flavonoides. ... 101
- Figura 35.** Espectros UV/DAD correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 34. 101
- Figura 36.** Espectros UV/DAD correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 34 (continuação)..... 102
- Figura 37.** Ampliação do cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm da fração flavonoídica de *P. alata*. Picos de possíveis flavonoides numerados de 1 a 7..... 103
- Figura 38.** Espectros UV/DAD correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 37. 103
- Figura 39.** Espectros UV/DAD correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 37 (continuação)..... 104

Figura 40. Reação de derivatização do flavonoide quercetina (11) com o éster 2-aminoetilico do ácido difenilbórico (12). 113

Figura 41. Fotos das placas de CCDAE revelada com NP/PEG-400 ($\lambda_{\text{excitação}} = 366$ nm). 1- Polpa *P. edulis* (safra 15/01/08), 2- Polpa *P. alata*, 3- Polpa *P. edulis* sadia (safra 15/12/08), 4- Padrão hiperosídeo (H) e rutina (R), 5- Polpa *P. edulis* infectada (vírus PWV) (safra 15/12/08), 6- Casca *P. edulis* sadia, 7- Casca *P. edulis* infectada (vírus PWV); **A**) fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: água (82:9:9); **B**) fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26).. 123

Figura 42. Fotos das placas de CCDAE revelada com NP/PEG-400 ($\lambda_{\text{excitação}} = 366$ nm). 1- Polpa *P. edulis* (safra 15/01/08), 2- Polpa *P. alata*, 3- Polpa *P. edulis* sadia (safra 15/12/08), 4- Padrão hiperosídeo (H) e rutina (R), 5- Polpa *P. edulis* infectada (vírus PWV) (safra 15/12/08), 6- Casca *P. edulis* sadia, 7- Casca *P. edulis* infectada (vírus PWV); **A**) fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: água (6:1:1); **B**) acetato de etila: metiletilacetona: ácido fórmico: água (50:30:10:10). 124

Figura 43. Foto da placa de CCDAE revelada com NP/PEG-400 ($\lambda_{\text{excitação}} = 366$ nm). Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: água (6:1:1). 1-3 Polpa *P. edulis* (6,0; 8,0 e 10,0 μL), 4-6 Casca *P. edulis* sadia (6,0; 8,0 e 10,0 μL), 7-9 Casca *P. edulis* infectada (vírus PWV) (6,0; 8,0 e 10,0 μL), 10-13 Padrão isoorientina (2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 μL), 14-21 Duplicata dos extratos de 1 a 8, respectivamente. 125

Figura 44. Foto da placa de CCDAE revelada com NP/PEG-400 ($\lambda_{\text{excitação}} = 366$ nm). Largura das bandas 5,0 mm; distância entre o meio das bandas 9,0 mm; velocidade de aplicação 30 s μL^{-1} ; tempo entre cada aplicação 15 s. 1-5 Padrão isoorientina (0,8; 1,6; 2,4; 3,2; 4,0 μL), 6- Cascas de *P. edulis* sadia (8,0 μL), 7- Cascas de *P. edulis* infectada com vírus PWV (16,0 μL), 8-14 Duplicata dos padrões e extratos de 1 a 7, respectivamente. 126

Figura 45. Fotos dos densitogramas (detecção em 300 nm, filtro em 550 nm). 1- Padrão isoorientina (1,6 μL); 2- Cascas de *P. edulis* sadias (8,0 μL); 3- Cascas de *P. edulis* infectadas com vírus PWV (16,0 μL), após separação por CCDAE e revelação com NP/PEG-400. (A) Isoorientina..... 127

Figura 46. Curva analítica de isoorientina em metanol (0,32; 0,65; 0,97; 1,3; 1,6 μg) obtida por CCDAE..... 128

Figura 47. Foto do densitograma (detecção em 300 nm, filtro em 550 nm) do padrão isoorientina (linhas 1-5 e 8-12) e dos extratos de cascas de *P. edulis* sadias (linhas 6 e 13) e cascas de *P. edulis* infectadas com o vírus PWV (linhas 7 e 14), após desenvolvimento cromatográfico por CCDAE (Figura 44) e revelação com NP/PEG. 129

Lista de Figuras

- Figura 48.** Cromatogramas (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm. 1- Extrato das cascas sadias de *P. edulis*; 2- Extrato das cascas de *P. edulis* infectadas com vírus PWV. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B); 0-10 minutos, 12%-16% de B em A e 10-30 minutos, 16-20% de B em A, vazão da fase móvel $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 131
- Figura 49.** Curva analítica de isoorientina em metanol obtida por CLAE-UV/DAD.. 132
- Figura 50.** Esquema dos mecanismos independente e dependente de oxigênio durante a fagocitose de um microorganismo pelo neutrófilo 142
- Figura 51.** Esquema das reações químicas envolvidas na produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QLuc) 146
- Figura 52.** Grupo prostético heme da mieloperoxidase 147
- Figura 53.** Esquema do isolamento de neutrófilos equinos por gradiente de Percoll. 157
- Figura 54.** Esquema do princípio do método ELISA..... 160
- Figura 55.** Esquema do procedimento do método SIEFED..... 161
- Figura 56.** Princípio da revelação usado no método SIEFED..... 163
- Figura 57.** Reações envolvidas no método de BCA. 164
- Figura 58.** Curva cinética da reação do DPPH[•] com a amostra da polpa dos frutos de *P. edulis* ($\lambda = 515$ nm). 167
- Figura 59.** Curvas da capacidade antioxidante para os extratos aquoso e metanólico da polpa de *P. edulis*, obtidas pelo método do DPPH[•]..... 168
- Figura 60.** Representação gráfica do EC₅₀ das amostras de alimentos e bebidas e dos padrões..... 170
- Figura 61.** Efeito inibitório dos extratos, padrão e controles sobre as respostas quimioluminescentes das EROs produzidas por PMN equinos ativados por PMA. A porcentagem de inibição indicada no topo das colunas foi calculada com relação ao controle (CTRL) DMSO como 100% (n= 3); NA= controle com DMSO não ativado. 172
- Figura 62.** Esquema das reações químicas envolvidas no processo de hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato pela enzima fosfatase alcalina (ALP), resultando na formação do *p*-nitrofenolato. 173

Lista de Figuras

- Figura 63.** Esquema das diferentes formas de atuação de substâncias sobre a desgranulação neutrofílica. Linhas tracejadas: possíveis modos de ação das substâncias dos extratos sobre a produção de p-nitrofenolato. Esquema adaptado de Johansson et al. (2002)..... 174
- Figura 64.** Efeito inibitório dos extratos, padrão e controles sobre a quantidade de MPO total liberada por neutrófilos equinos estimulados por PMA. A porcentagem de inibição indicada no topo das colunas foi calculada com relação ao controle (CTRL) DMSO como 100% (n= 3); NA= controle com DMSO não ativado..... 175
- Figura 65.** Efeito inibitório dos extratos, padrão e controles sobre a atividade da MPO purificada, medida por SIEFED. A porcentagem de inibição indicada no topo das colunas foi calculada com relação ao controle (CTRL) DMSO como 100% (n= 3).
..... 177
- Figura 66.** Curva analítica de BSA em água..... 178

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre a placa de CCD e a placa de CCDAE.....	37
Tabela 2. Níveis e fatores avaliados no planejamento fatorial 2^3	66
Tabela 3. Respostas dos experimentos do planejamento fatorial completo 2^3	74
Tabela 4. Valores dos efeitos do planejamento fatorial completo	76
Tabela 5. Parâmetros referentes às curvas analíticas dos padrões	96
Tabela 6. Resultados dos ensaios de exatidão para os extratos de <i>P. edulis</i> fortificados com padrões de flavonoides	97
Tabela 7. Resultados dos ensaios de precisão para os extratos de <i>P. edulis</i> fortificados com padrões de flavonoide	98
Tabela 8. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) das soluções padrão... ..	99
Tabela 9. Determinação quantitativa por CLAE-UV/DAD dos flavonoides de duas espécies de <i>Passiflora</i>	105
Tabela 10. Determinação quantitativa de isoorientina nas cascas de <i>P. edulis</i> por CCDAE.....	129
Tabela 11. Determinação quantitativa de isoorientina nas cascas de <i>P. edulis</i> por CLAE-UV/DAD	132
Tabela 12. Dados obtidos para os resultados da quantificação da isoorientina nas cascas de <i>P. edulis</i> por meio de diferentes métodos	133
Tabela 13. Comparação dos dois métodos para quantificação da isoorientina nas cascas de <i>P. edulis</i>	134
Tabela 14. Porcentagem de DPPH* reduzido pelas amostras e padrões	168
Tabela 15. Quantificação de proteínas totais pelo método de Smith	179
Tabela 16. Quantificação de isoorientina presente nas amostras por CLAE-UV/DAD	180

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A- Absorbância

ABTS- ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico

ALP- enzima fosfatase alcalina

BCA- ácido bicinchoninico

BSA- albumina de soro bovino

C₁₈- octadecilsilano

CCD- cromatografia em camada delgada

CCDAE- cromatografia em camada delgada de alta eficiência

CLAE-EM- cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

CLAE-UV/DAD- cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos

CV- coeficiente de variação

DMPD- dicloridrato de *N,N*-dimetil *p*-fenileno diamina

DMSO- dimetilsulfóxido

DNA- ácido desoxirribonucleico

d.p.- desvio padrão

DPPH[•] - radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DPR- desvio padrão relativo

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima)

EROs- espécies reativas de oxigênio

fMLP- *n*-formil-metionil-leucil-fenilalanina

FRAP- *Ferric Reducing Antioxidant Power* (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

HBSS- solução salina balanceada de Hank

IAC- Instituto Agronômico de Campinas

ICH- *International Conference on Harmonisation* (Conferência Internacional de Harmonização)

LOD- limite de detecção

LOQ- limite de quantificação

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

Lista de Siglas e Abreviaturas

NP/PEG- difenilborato de aminoetanol/ polietilenoglicol 400

PBS- tampão fosfato salino

PKC- proteína quinase C

PMA- forbol-12-miristato-13-acetato

PMN- leucócito polimorfonuclear ou neutrófilo

pNPP- para-nitrofenilfosfato

PVDF- fluoreto de polivinilideno

PWV- *Passion fruit Woodenness Virus* (Vírus do Endurecimento do Fruto)

QL- quimioluminescência

QLluc- quimioluminescência dependente de lucigenina

r- coeficiente de correlação

R_F- fator de retenção

rpm- rotação por minuto

SIEFED- *Specific Immunologic Extraction Followed by Enzymatic Detection*

(Extração Imunológica Específica Seguida por Detecção Enzimática)

EFS- extração em fase sólida

t_R- tempo de retenção

UV-Vis- ultravioleta visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL	23
1.1 INTRODUÇÃO	23
1.1.1 Passiflora L.	23
1.1.1.1 Breve histórico econômico.....	25
1.1.2 Alimentos Funcionais.....	27
1.1.3 Farmacologia	28
1.1.3.1 Polpa dos frutos.....	28
1.1.3.2 Cascas.....	29
1.1.4 Antioxidantes	31
1.1.5 Flavonoide	32
1.1.6 Técnicas de análise de flavonoides	35
1.1.6.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)	36
1.1.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	40
1.1.6.3 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM)	43
1.2 OBJETIVOS GERAIS	47
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO 2- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS FLAVONOIDES DA POLPA DOS FRUTOS DE <i>P. EDULIS</i> E <i>P. ALATA</i>	57
2.1 INTRODUÇÃO	57
2.1.1 Planejamento Fatorial	57
2.1.2 Validação do método analítico.....	59
2.2 OBJETIVOS.....	62
2.3 PARTE EXPERIMENTAL	63

2.3.1 Materiais, reagentes e padrões analíticos	63
2.3.2 Amostras dos frutos	63
2.3.3 Preparo dos extratos de flavonoides da polpa do maracujá para análise por CLAE-UV/DAD.....	64
2.3.4 Otimização da extração de flavonóides	65
2.3.5 Preparo dos extratos de flavonoides da polpa do maracujá para análises por CL-EM/EM	66
2.3.6 Análises dos flavonoides presentes nos extratos de maracujá.....	67
2.3.6.1 Análise por CCD	67
2.3.6.2 Análise por CLAE-UV/DAD.....	67
2.3.6.3 Análise por CL-EM/EM	68
2.3.7 Parâmetros analíticos avaliados na validação	69
2.3.7.1 Especificidade	69
2.3.7.2 Linearidade.....	69
2.3.7.3 Exatidão.....	70
2.3.7.4 Precisão.....	70
2.3.7.5 Limite de detecção e limite de quantificação	71
2.3.8 Análise quantitativa dos flavonoides presentes nos maracujás (<i>P. edulis</i> e <i>P. alata</i>)	72
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
2.4.1 Otimização da extração através de planejamento fatorial	73
2.4.2 Análise cromatográfica dos flavonoides presentes nos extratos de polpa de <i>P. edulis</i> e <i>P. alata</i>	79
2.4.2.1 Análise por CCD	79
2.4.2.2 Otimização das condições de análise por CLAE	82
2.4.2.3 Análise por CL-EM/EM	86
2.4.3 Validação do método cromatográfico (CLAE).....	93
2.4.3.1 Especificidade	93
2.4.3.2 Linearidade.....	94

2.4.3.3 Exatidão.....	97
2.4.3.4 Precisão.....	98
2.4.3.5 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	99
2.4.4 Análise quantitativa dos extratos de <i>Passiflora</i>	100
2.4.4.1 Quantificação da isoorientina	100
2.4.4.2 Quantificação dos flavonoides totais	100
2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS	106
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

CAPÍTULO 3- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS FLAVONOIDES DAS CASCAS DE *P. EDULIS*.....

111

3.1 INTRODUÇÃO	111
3.2 OBJETIVOS.....	114
3.3 PARTE EXPERIMENTAL	115
3.3.1 Materiais, reagentes e padrões analíticos	115
3.3.2 Preparo dos extratos de flavonoides das polpas e cascas do maracujá e das soluções-padrão para análise por CCDAE	116
3.3.3 Escolha da fase móvel.....	117
3.3.4 Análises por CCDAE.....	118
3.3.5 Análise densitométrica.....	119
3.3.4 Análises por CLAE-UV/DAD	120
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
3.4.1 Análise dos extratos e padrões por CCDAE	121
3.4.1.1 Análise quantitativa	126
3.4.2 Análise dos extratos de cascas de <i>P. edulis</i> por CLAE-UV/DAD.....	130
3.4.3 Comparação de métodos analíticos para a análise de isoorientina nos extratos de cascas de <i>P. edulis</i>	133
3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS	136

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
CAPÍTULO 4- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	140
4.1 INTRODUÇÃO	140
4.1.1 Neutrófilos.....	140
4.1.2 Produção de EROs.....	142
4.1.3 Quimioluminescência.....	144
4.1.4 Mieloperoxidase.....	146
4.1.5 Participação dos neutrófilos em doenças	148
4.2 OBJETIVOS.....	150
4.3 PARTE EXPERIMENTAL	152
4.3.1 Materiais, reagentes e padrões analíticos	152
4.3.2 Preparo de soluções.....	153
4.3.3 Amostras.....	154
4.3.4 Preparo das amostras e teste da capacidade redutora de radicais do maracujá (método do DPPH*).....	154
4.3.5 Preparo das amostras para os ensaios de QLuc, ELISA e SIEFED	156
4.3.6 Isolamento dos neutrófilos equinos.....	156
4.3.7 Medida da produção total de EROs produzidas por neutrófilos ativados	158
4.3.8 Medida da MPO total liberada por neutrófilos ativados.....	159
4.3.9 Medida da atividade da MPO isolada	161
4.3.10 Determinação de proteínas totais	163
4.3.11 Análise quantitativa de isoorientina nos extratos de <i>Passiflora</i> por CLAE-UV/DAD	165
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	166
4.4.1 Análise da capacidade redutora de radicais do maracujá.....	166
4.4.2 Efeito dos extratos e padrões sobre a produção de EROs liberadas por neutrófilos ativados.....	170

4.4.3 Efeito dos extratos e padrões sobre a liberação de MPO total pelos neutrófilos ativados.....	173
4.4.4 Efeito dos extratos e padrões sobre a atividade da MPO equina purificada	176
4.4.5 Quantificação de proteínas totais pelo método do BCA e de isoorientina nos extratos de maracujá por CLAE-UV/DAD	178
4.5 CONCLUSÕES PARCIAIS	182
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	183
CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES GERAIS.....	189
5.1 CONCLUSÕES.....	189
5.1.1 Avaliação do método desenvolvido por CLAE e sua aplicação	189
5.1.2 Comparação entre as técnicas CLAE e CCDAE	190
5.1.3 Sobre o potencial uso do maracujá como alimento funcional	190

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 *Passiflora* L.

No século XVI, a denominação *Passiflora* (do latim *passio*, “paixão” e *flos*, “flor”) surgiu da interpretação religiosa dos colonizadores europeus da flor de maracujá, cuja morfologia sugere uma correlação com os símbolos da Paixão de Cristo.¹ Maracujá é o nome popular dado a várias espécies do gênero *Passiflora*, e vem de *maráú-ya*, que para os indígenas significa “fruto de sorver” ou “polpa que se toma de sorvo”.²

Passiflora é o maior e mais importante gênero da família *Passifloraceae*, abrangendo cerca de 500 espécies principalmente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo o maior foco de distribuição geográfica o Centro-norte do Brasil, onde são encontradas pelo menos 79 espécies.^{3,4} Destas, apenas 30 são descritas por terem frutos comestíveis, e as de maior interesse e desenvolvimento comercial no país são: maracujá-azedo ou amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener) e maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander).¹

O maracujá-azedo ou amarelo (Figura 1) é o mais conhecido e comercializado no Brasil, sendo a matéria-prima das indústrias de suco de maracujá.⁵ É amplamente cultivado, e o suco produzido com a fruta é muito apreciado e representa pelo menos 90% da área plantada e do volume comercializado em todo país.⁶



Figura 1. Maracujá azedo: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener (a) flor e (b) fruto.

Já o maracujá-doce (Figura 2) tem sua produção e comercialização limitadas pela falta de hábito de consumo. Embora nativa do Brasil, é uma fruta ainda pouco conhecida pela maioria da população. Ao contrário do maracujá amarelo, é consumida exclusivamente como fruta fresca, devido à sua baixa acidez.⁷

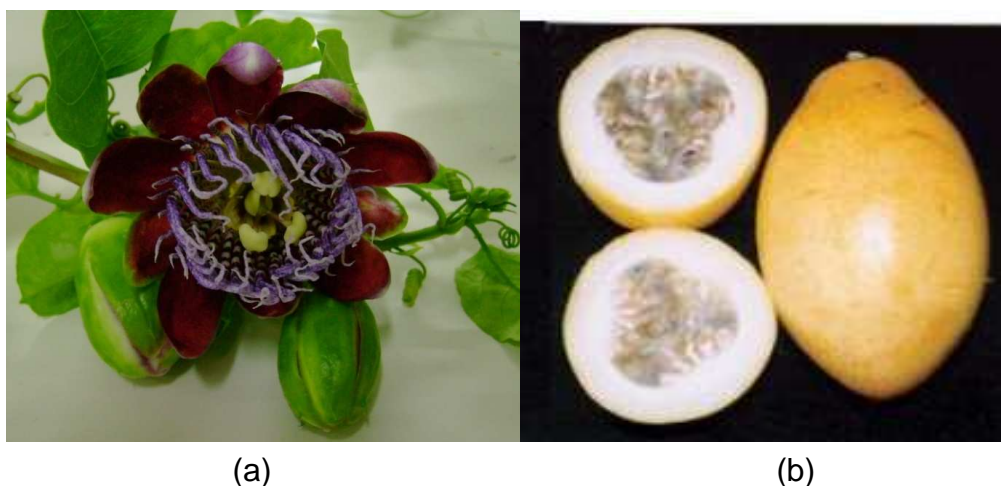


Figura 2. Maracujá doce: *Passiflora alata* Dryander (a) flor e (b) fruto.

Os medicamentos fitoterápicos à base de maracujá são elaborados a partir das folhas das espécies *P. alata* e *P. incarnata*, espécies oficiais da Farmacopeia Brasileira e Europeia, respectivamente. As folhas de maracujá destas espécies são

consideradas medicinais por sua ação calmante, em casos de insônia e irritabilidade.^{8,9}

1.1.1.1 Breve histórico econômico

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá. Segundo o IBGE,¹⁰ a produção brasileira de maracujá em 2006 foi de 615.196 toneladas, com 45.327 ha de área plantada ou destinada a colheita, concentrada nos estados do Pará, Bahia, Sergipe e São Paulo.

Até ao redor de 1970, a comercialização do maracujá baseava-se apenas no mercado *in natura*, *i.e.* frutas frescas. Na segunda metade da década de 80, o cultivo da fruta teve marcante expansão, época em que a cafeicultura atravessava forte crise e os pequenos agricultores buscavam uma alternativa para a diversificação. As condições de solo e clima favoráveis à cultura do maracujazeiro foram excelentes alternativas ao café. Os custos de produção eram baixos e a alta produtividade foi estimulada pelo crescente interesse das indústrias extratoras de suco e do mercado de produtos industrializados. Na década de 90 houve modificação dos hábitos de consumo e conseqüentemente valorização do preço da fruta fresca.¹¹ Praticamente toda a produção de fruta fresca é destinada ao mercado interno, enquanto menos da metade do volume de frutas processadas é voltado ao mercado brasileiro, essencialmente na forma de suco concentrado.

Segundo Ângelo Domingos Rossi, presidente do Fundo *Passiflora* e diretor-presidente da Afruvec - Associação dos Fruticultores da Região de Vera Cruz-SP,¹² a cultura da fruta vive um alarmante momento de baixa produção, o que tem provocado não apenas um aumento no preço do produto *in natura*, como também

uma diminuição de sua oferta para processamento industrial, devido ao surgimento e propagação de doenças, em especial do PWV (*Passion fruit Woodenness Virus*), conhecido popularmente como o vírus do endurecimento dos frutos. Este vírus é transmitido por pulgões e causa redução quantitativa e qualitativa na produção, pois os frutos ficam menores, deformados e endurecidos, podendo até exibir rachaduras, dependendo da estirpe do vírus (Figura 3).¹³ Antes de ocorrerem as frequentes epidemias, a cultura era perene e por pelo menos três anos consecutivos, mas em decorrência principalmente do PWV o cultivo está tornando-se anual.¹⁴

Os produtos registrados no Ministério da Agricultura para o controle químico de pragas e doenças em culturas de maracujá nem sempre possibilitam resultados satisfatórios. Assim, alguns produtos utilizados atualmente para o tratamento fitossanitário do maracujá não estão registrados para uso geral no Ministério da Agricultura (dados de 2009), tais como: benomil, paration, dentre outros.¹⁵ Porém, quando solicitado pela Secretária da Agricultura em caráter excepcional, alguns destes produtos podem ser legalmente empregados após a autorização de uso emergencial concedida pelo Governo Federal.¹⁶



Figura 3. *Passiflora edulis* infectada com o vírus PWV (*Passion fruit Woodenness Virus*).

1.1.2 Alimentos Funcionais

Estudos relataram a presença de flavonoides,¹⁷ carotenoides,¹⁸ ácidos orgânicos não voláteis,¹⁹ além de proteínas,²⁰ vitaminas²¹ entre outras classes de substâncias no fruto do maracujá. A presença destas substâncias pode indicar o potencial do maracujá como um alimento funcional.

Nos últimos anos, tem-se atribuído aos alimentos, além das funções de nutrição e de prover apelo sensorial, uma terceira função relacionada à resposta fisiológica específica produzida por alguns alimentos, que são chamados de alimentos funcionais. Estes podem prevenir, curar ou auxiliar na recuperação de determinadas doenças.^{22,23}

Os alimentos funcionais fazem parte de uma recente concepção de alimentos, lançada pelo Japão na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida.²²

O termo “alimento funcional” é tema de estudo e discussão por muitos autores.²⁴⁻²⁶ Um alimento pode ser considerado funcional se apresentar as seguintes características: deve ser um alimento convencional e ser consumido na dieta normal/usual; deve ser composto por componentes naturais; deve ter efeitos positivos além do valor nutritivo básico, promovendo benefícios à saúde e a alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico.²⁷ Não são considerados medicamentos, pois os princípios ativos responsáveis pelos efeitos benéficos não são extraídos do alimento.²⁸

Os alimentos funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando

no sistema gastrointestinal, no sistema cardiovascular, no metabolismo, crescimento, desenvolvimento, diferenciação celular e como antioxidantes.²⁹

1.1.3 Farmacologia

Muitos estudos foram realizados sobre a farmacologia das folhas de diversas espécies de *Passiflora*.^{4,30,31} Apesar do grande consumo do fruto de *P. edulis* no Brasil, suas ações farmacológicas ainda são pouco estudadas. Recentemente foi realizada uma revisão bibliográfica sobre as espécies brasileiras de *Passiflora* (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener, *P. alata* Dryander e *P. edulis* Sims.), com enfoque na polpa do maracujá e resíduos industriais (casca e sementes), estudos nutricionais e farmacológicos, principalmente as substâncias químicas, e o possível uso do maracujá como um alimento funcional.³²

1.1.3.1 Polpa dos frutos

Apesar do grande uso popular do suco de *P. edulis* devido ao seu suposto efeito contra ansiedade, depressão e insônia, apenas um trabalho foi encontrado referente a estes efeitos. Lutomski et al. (1975),³³ estudando sucos obtidos do fruto do maracujá vermelho e do maracujá amarelo, verificaram que após administração oral a camundongos, houve diminuição significativa da movimentação espontânea dos animais, apresentando um efeito tranquilizante. Este efeito sedativo do suco foi atribuído à presença de pequenas quantidades de alcaloides do grupo harmana e flavonoides, identificados por cromatografia em papel, utilizando o reagente de Dragendorff. No entanto, estudos com técnicas mais apuradas ainda são

necessários para a comprovação da presença destas substâncias e do efeito tranquilizante no suco.

Puricelli et al. (2003)³⁴ verificaram que o decocto do fruto de *P. edulis* inibiu *in vitro* a atividade da matriz-metaloproteinase-2 e a matriz-metaloproteinase-9, duas gelatinases envolvidas na invasão tumoral, metástases e angiogeneses. A atividade inibitória foi mais eficiente para a matriz-metaloproteinase-2.

Araújo et al. (2004)²⁰ avaliaram a atividade biológica de proteínas totais presentes em várias polpas de frutos tropicais, e a polpa do maracujá apresentou a maior quantidade de proteínas (0,8 mg de proteínas/g de polpa) entre as amostras testadas, porém não mostrou atividade inibidora de enzimas digestivas mamíferas.

A atividade biológica mais estudada com relação ao suco do maracujá é sua ação antioxidante.³⁵⁻³⁷ A capacidade antioxidante do maracujá foi determinada por diferentes métodos, como DPPH* (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico), DMPD (dicloridrato de *N,N*-dimetil *p*-fenileno diamina), entre outros, sendo o principal e mais utilizado o método do radical DPPH*. É atribuído aos polifenóis, principalmente aos flavonoides, a atividade antioxidante encontrada na polpa de *P. edulis*.³⁸

1.1.3.2 Cascas

De acordo com Oliveira et al. (2002)³⁹ os subprodutos (cascas e sementes) produzidos no processamento do suco do maracujá correspondem a cerca de 65 a 70% do peso do fruto, sendo portanto um grande problema de resíduo agroindustrial. A utilização destes subprodutos na alimentação humana ou animal

como fonte alimentar de bom valor nutricional mostra-se viável, reduzindo custos e, ao mesmo tempo, diminuindo os problemas de eliminação dos subprodutos provenientes do processamento. A casca de maracujá é rica em fibras solúveis, principalmente pectina, que é benéfica ao ser humano.^{40,41} Ao contrário da fibra insolúvel (contida no farelo dos cereais), que pode interferir na absorção do ferro, a fibra solúvel pode auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares e gastrointestinais, câncer de colón, hiperlipidemias, diabetes e obesidade, entre outras.^{42,43}

A casca do maracujá é também rica em niacina (vitamina B3), ferro, cálcio e fósforo;⁴⁴ elas já foram testadas e usadas com sucesso na alimentação animal.^{45,46} Paiva (1998)⁴⁷ demonstrou que o emprego dos resíduos industriais do maracujá (cascas e sementes) na alimentação de bovinos levam os animais a produzirem mais leite, inibindo inclusive problemas digestivos. Foram também verificados os benefícios da farinha de casca de maracujá como redutor da glicemia (no controle de diabetes).^{48,49}

Ramos (2004)⁵⁰ constatou que o extrato seco da casca de maracujá amarelo exerce uma ação positiva sobre o controle glicêmico no tratamento do diabetes mellitus tipo II, sendo o provável mecanismo desta ação a presença de um alto teor de pectina, totalmente degradável no organismo, que ajuda a diminuir a taxa de glicose e colesterol no sangue, sugerindo o uso do extrato seco da casca do maracujá como adjuvante das terapias convencionais. Agra et al. (2007),⁵¹ em extenso levantamento sobre as plantas medicinais mais utilizadas no nordeste brasileiro, evidenciaram que o mesocarpo seco e pulverizado de *P.edulis* Sims é utilizado popularmente contra o diabetes.

Ramos et al. (2007)⁵² realizaram estudos clínicos que demonstraram que o tratamento com a farinha da casca do maracujá resultou na diminuição dos níveis de colesterol em mulheres entre 30 e 60 anos que apresentavam hipercolesterolemia (colesterol \geq 200,0 mg/dL).

Ichimura et al. (2006)⁵³ demonstraram o efeito anti-hipertensivo do extrato metanólico da casca de *P. edulis* em ratos naturalmente hipertensos. Este efeito foi atribuído principalmente ao ácido γ -aminobutírico (GABA) e parcialmente à ação vasodilatadora dos polifenóis, principalmente da luteolina.

1.1.4 Antioxidantes

Segundo Abdalla (2003),⁵⁴ de um modo geral, antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, são substâncias químicas que inibem o processo de oxidação, protegendo sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações de oxidação.

Quando há um excesso de radicais no organismo causado pelo desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, ocorre o estresse oxidativo, e estes radicais contribuem nos processos de metagênese, carcinogênese, doenças coronárias, danos ao DNA, entre outros.^{55,56} Radicais ou espécies reativas do metabolismo do oxigênio e nitrogênio (ERMON) são espécies altamente instáveis e reativas, que contêm um ou mais elétrons não pareados, sendo assim, sua presença crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais.⁵⁷

Os antioxidantes são classificados quanto ao modo de ação. Eles podem ser sequestrantes de radicais, sequestrantes de íons metálicos capazes de catalisar a oxidação lipídica, ou sequestrantes de oxigênio. Eles podem ainda ser subdivididos em antioxidantes primários, grupo formado por substâncias como enzimas, quelantes e proteínas, as quais impedem a geração de espécies reativas ou sequestram-nas, bloqueando a etapa de iniciação da cadeia radicalar; antioxidantes secundários, também conhecidos como antioxidantes preventivos, formado por compostos fenólicos como tocoferóis, tocotrienóis e flavonoides, os quais bloqueiam a etapa de propagação da cadeia radicalar, sequestrando radicais intermediários do tipo peroxila e alcóxila; antioxidantes terciários, constituídos pelo sistema de reparo do DNA por proteases e fosfolipases, os quais atuam removendo as lesões oxidativas do DNA, proteínas e lipídeos, respectivamente.⁵⁴

Uma das mais importantes fontes naturais de antioxidantes são as plantas que contêm compostos fenólicos, como os flavonoides, os quais podem ocorrer em todas as partes dos vegetais.^{58,59}

1.1.5 Flavonoide

Os flavonoides desempenham diferentes papéis na ecologia das plantas: devido às suas cores atrativas, flavonas, flavonóis e antocianinas podem atuar como sinais visuais para polinização; as catequinas e outros flavonóis adstringentes podem representar um sistema de defesa contra insetos nocivos para as plantas; os flavonoides atuam também na proteção contra radiação solar na região do UV (ultravioleta), devido às propriedades de absorção de radiação no UV.⁶⁰

Além do seu papel fisiológico nas plantas, os flavonoides são importantes substâncias na dieta humana, apresentando diversos efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica e vasodilatadora. Além disso, estas substâncias inibem a peroxidação lípidica e reduzem o risco de doenças cardiovasculares, efeitos estes relacionados à sua atividade antioxidante, caracterizada pela capacidade de sequestrar radicais em organismos vivos.⁶¹⁻⁶³

Os flavonoides ocorrem nas plantas em uma variedade de formas estruturais, todas contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico arranjados na configuração C₆-C₃-C₆, isto é, são dois anéis aromáticos ligados por 3 carbonos unitários que podem ou não formar um terceiro anel, ligados a vários substituintes (Figura 4).⁶⁴ Devido a esta estrutura os flavonoides apresentam intensa absorção no UV, exibindo 2 bandas: banda I em 300-380 nm e banda II em 240-280 nm.⁶⁵ Eles podem ocorrer de forma livre (agliconas) ou ligados a açúcares (glicosídeos). São classificados em 10 classes de compostos, de acordo com seu processo de formação: antocianinas, proantocianidinas, flavonóis, flavonas, glicoflavonas, biflavonilas, chalconas, auronas, flavononas e isoflavonas,⁶⁶ sendo que mais de 4000 flavonoides já foram identificados em plantas.⁶⁷

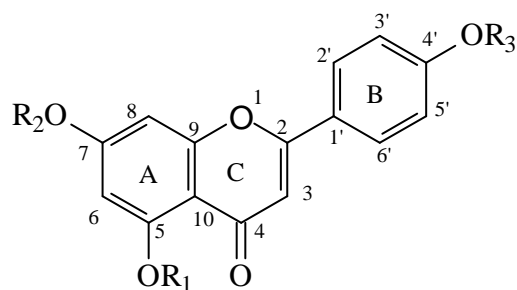
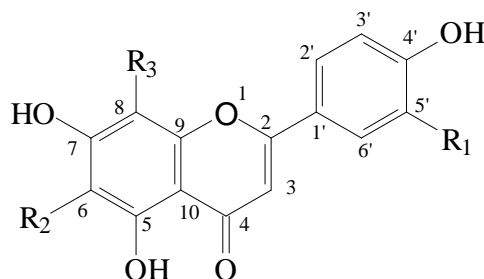


Figura 4. Estrutura geral dos flavonoides.

Os flavonoides encontrados em *Passiflora* são do tipo C-glicosídeo, nos quais os açúcares estão diretamente ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono. Estes açúcares ligados diretamente a carbonos são encontrados apenas nas posições 6 e 8 do núcleo dos flavonoides e apresentam pouca diversificação, dentre os quais o principal é a glicose.⁶⁶

A grande maioria dos trabalhos sobre os flavonoides do maracujá foi realizada em folhas e partes aéreas.⁶⁸ A Figura 5 apresenta as flavonas relatadas na polpa e cascas dos frutos de *P. edulis*.^{17,53}



Flavonas	R ₁	R ₂	R ₃
(1) Shaftosídeo (apigenina-6-C-glicosil-8-C-arabinosídeo)	H	glucose	arabinose
(2) Isoshaftosídeo (apigenina-6-arabinosil-8-C-glicosídeo)	H	arabinose	glucose
(3) Isoorientina (luteolina-6-C-glucosídeo)	OH	glucose	H
(4) Orientina (luteolina-8-C-glucosídeo)	OH	H	glucose
(5) Isovitexina (apigenina-6-C-glucosídeo)	H	glucose	H
(6) Luteolina 6-C-quinovosídeo	OH	quinose	H
(7) Luteolina 6-C-fucosídeo	OH	fucose	H
(8) Luteolina	H	H	H

Figura 5. Flavonas relatados na polpa e cascas dos frutos de *P. edulis*.

Foram relatados poucos trabalhos sobre os flavonoides nos frutos do maracujá: Lutomski et al. (1975)³³ relataram 1,0 mg% de flavonoides nas duas variedades de *P. edulis*, analisadas por cromatografia em papel e densitometria.

Mareck et al. (1990)¹⁷ identificaram por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) flavonoides C-glicosídeos no suco dos frutos do maracujá amarelo e no suco industrializado. Foram encontrados no suco dos frutos frescos os flavonoides: shaftosídeo (1) em mistura com isoshaftosídeo (2), isoorientina (3), orientina (4), isovitexina (5), luteolina 6-C-quinovosídeo (6) e luteolina 6-C-fucosídeo (7). No suco industrializado foi relatada a presença de (1), (3), (4) e (5).

Zucolotto (2005)⁶⁹ relatou a presença de flavonoides C-glicosídeos no pericarpo, mesocarpo e na casca dos frutos maduros de *P. edulis* com o mesmo fator de retenção das substâncias (3) e (4) na análise por CCD (cromatografia em camada delgada).

Ichimura et al. (2006)⁵³ analisaram por CL-EM/EM as cascas do maracujá amarelo, encontrando os flavonoides luteolina (8) (20,0 µg/g) e luteolina-6-C-glicosídeo ou isoorientina (3) (20,0 µg/g), além do ácido γ-aminobutírico (GABA, 2,4 mg/g).

1.1.6 Técnicas de análise de flavonoides

Várias técnicas podem ser empregadas na detecção e quantificação de flavonoides, mas neste trabalho foram utilizadas: CCD, para análises qualitativas; CCDAE (cromatografia em camada delgada de alta eficiência) e CLAE para quantificação dos flavonoides; CL-EM (cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massas) para identificação estrutural dos flavonoides na polpa de *P. edulis*.

1.1.6.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)

Neste trabalho foi utilizada como técnica preliminar para detecção de flavonoides a CCD, por ser uma técnica que oferece muitas vantagens, tais como: fácil execução e interpretação, separações em pequeno espaço de tempo, reprodutibilidade, baixo custo, além de permitir a análise simultânea de várias amostras.^{70,71}

A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial entre duas fases: uma fixa (estacionária), geralmente sílica gel, retida sobre uma superfície plana, e outra móvel. O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção, porém usando fases estacionárias tratadas pode ocorrer também separação por partição ou troca iônica.⁷² Existem disponíveis comercialmente placas de vidro ou alumínio já revestidas com o adsorvente de interesse. Esta técnica cromatográfica é uma das mais tradicionais utilizadas no estudo de produtos naturais.

Uma evolução da cromatografia em camada delgada são as placas de cromatografia em camada delgada de alta eficiência, que são confeccionadas com partículas de tamanho otimizado e com granulações mais finas e homogêneas, possibilitando menor tempo de análise, melhor resolução cromatográfica e detecção de amostras em concentrações menores que aquelas observadas nas placas

tradicionais de CCD.^{73,74} A Tabela 1 mostra a comparação da placa de CCD com relação à placa de CCDAE.⁷¹

Tabela 1. Comparação entre a placa de CCD e a placa de CCDAE.

Parâmetro	CCD	CCDAE
Tamanho usual da placa	20x20 cm	10x10 ou 10x20 cm
Diâmetro médio das partículas	20 µm	5 µm
Espessura da camada da fase estacionária	250 µm	100, 200 µm
Número de amostras por placa	7 a 10	10 a 20
Diâmetro da mancha	3 a 6 mm	1 mm
Tempo de corrida para a distância ideal de separação	30 a 120 minutos	7 a 20 minutos
Números de pratos teóricos	Até 600	Até 5000

Os princípios das técnicas de CCD e CCDAE são os mesmos, diferindo fundamentalmente nos aspectos práticos, como a maior qualidade dos adsorventes, além dos desenvolvimentos na forma de aplicação da amostra e na detecção por densitometria, permitindo análise quantitativa *in situ*, tornando-se assim a CCDAE uma técnica de precisão, sensibilidade e reprodutibilidade comparáveis às da CLAE.^{71,75}

O uso de aplicadores automáticos permite a deposição de volumes pequenos (0,5 µL a 10,0 µL) em placas CCDAE com grande precisão e reprodutibilidade, e com isso os efeitos de alargamento de bandas cromatográficas é reduzido ou minimizado. Neste trabalho utilizou-se o aparelho de depósito automático AS 30 Desaga, o qual possui uma seringa que não entra em contato com a placa, depositando a solução da amostra através de ar comprimido, o que permite a obtenção de bandas estreitas, melhorando a resolução; além disso, possui controle

por microprocessador no qual vários parâmetros são fixados e permanecem constantes durante todo o procedimento de depósito.

O detector mais utilizado em CCDAE é o densitômetro, o qual oferece um meio rápido e simples de quantificar as bandas cromatográficas com grande sensibilidade. Este equipamento pode ser utilizado para a detecção de substâncias que absorvem no UV-Visível ou fluorescentes, sendo que este último modo foi utilizado neste trabalho (Figura 6).⁷⁶

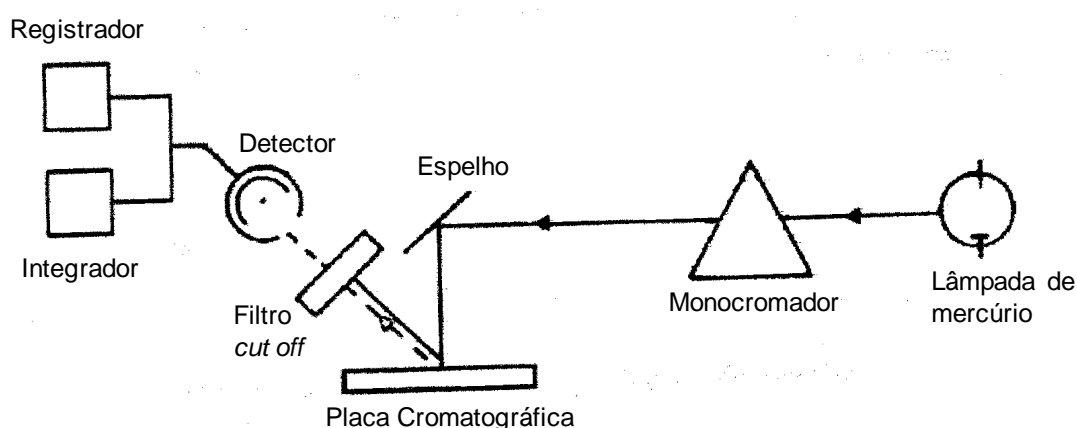


Figura 6. Representação esquemática de um sistema de detecção densitométrica por fluorescência.

Na detecção densitométrica por fluorescência, a radiação luminosa proveniente da lâmpada de mercúrio passa pelo monocromador, que seleciona um determinado comprimento de onda; a radiação é direcionada pelo espelho até atingir a placa cromatográfica, e uma parte definida da luz dispersa atravessa o filtro e chega no detector (fotomultiplicadora), produzindo uma resposta que depende da intensidade de luz. O aparelho avalia as diferentes bandas da separação cromatográfica, registrando as distâncias de migração a partir do ponto de aplicação e também a densidade ótica das bandas; este registro gráfico é denominado densitograma.⁷⁷

A análise quantitativa da amostra por CCDAE pode ser realizada em dois modos: modo direto (quantificação direta *in situ*) ou modo indireto. Neste trabalho foi utilizado o modo direto, que determina as substâncias separadas sobre a placa e mede diretamente sobre ela a densidade ótica das bandas, e a quantificação do analito é realizada por meio da média da área ou da altura dos picos em comparação com a curva analítica elaborada com soluções-padrão simultaneamente sob as mesmas condições.^{76,78}

A detecção de substâncias incolores, não-fluorescentes ou que não possuem um grupo cromóforo adequado à detecção densitométrica pode requerer uma etapa de revelação, geralmente realizada após a separação cromatográfica e evaporação da fase móvel. A revelação da placa cromatográfica pode ser realizada por imersão, pulverização ou exposição a vapores de um reagente. Para quantificação, o ideal é utilizar a imersão, pois os resultados são mais precisos e reprodutíveis.^{77,79}

A quantificação *in situ* apresenta várias vantagens: conservação do cromatograma após determinação quantitativa, visualização completa do cromatograma, possibilidade de aumento da sensibilidade com a utilização de reagentes de detecção específicos, além do aumento da seletividade com modificação no $\lambda_{\text{detecção}}$. Mas a quantificação *in situ* apresenta também algumas desvantagens: necessidade da migração simultânea de uma substância de referência a cada análise para traçar a curva analítica, e em alguns casos, falta da estabilidade do produto formado na derivatização pós-cromatográfica.⁷⁶

Apesar dos avanços da instrumentação, da alta qualidade das placas cromatográficas e das vantagens que a técnica apresenta, a CCDAE ainda é muito pouco utilizada no Brasil. Espera-se que com a necessidade de se gerar menos

resíduos de laboratório, diminuir custo e tempo de análise, a CCDAE seja mais explorada e valorizada como ferramenta analítica.

1.1.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A utilização da CLAE começou a crescer como ferramenta na análise de flavonoides em *Passiflora* principalmente a partir de meados da década de 80, por ser uma ótima técnica para análise de compostos não voláteis.^{30,80}

As razões para a popularidade deste método devem-se à sua grande versatilidade, o que permite o emprego desta técnica para uma larga variedade de amostras não-voláteis, além de reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade, precisão e exatidão.⁸¹

A separação de uma mistura por CLAE ocorre através das interações entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel, as quais podem ser do tipo: ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals, entre outras. É de acordo com a natureza destas interações que os modos de separação podem ser classificados em: cromatografia em fase reversa, fase normal, troca iônica ou exclusão molecular. Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel; no modo reverso, a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada em CLAE, uma vez que permite o uso de fases móveis aquosas, como utilizado neste trabalho.⁸²

Apesar das diferenças entre os equipamentos comerciais existentes, os componentes básicos de um instrumento para CLAE consistem em: um reservatório de solvente, o qual contém a fase móvel; a bomba, usada para empurrar o solvente

através da coluna; o regulador de pressão, para monitorar a pressão da bomba antes da coluna; a válvula de injeção; a coluna, contendo a fase estacionária, que usualmente é um tubo de aço inoxidável com comprimento variando entre 15 e 25 cm e diâmetro interno entre 2 e 4 mm; o detector e o registrador para obtenção do cromatograma (Figura 7).⁷¹

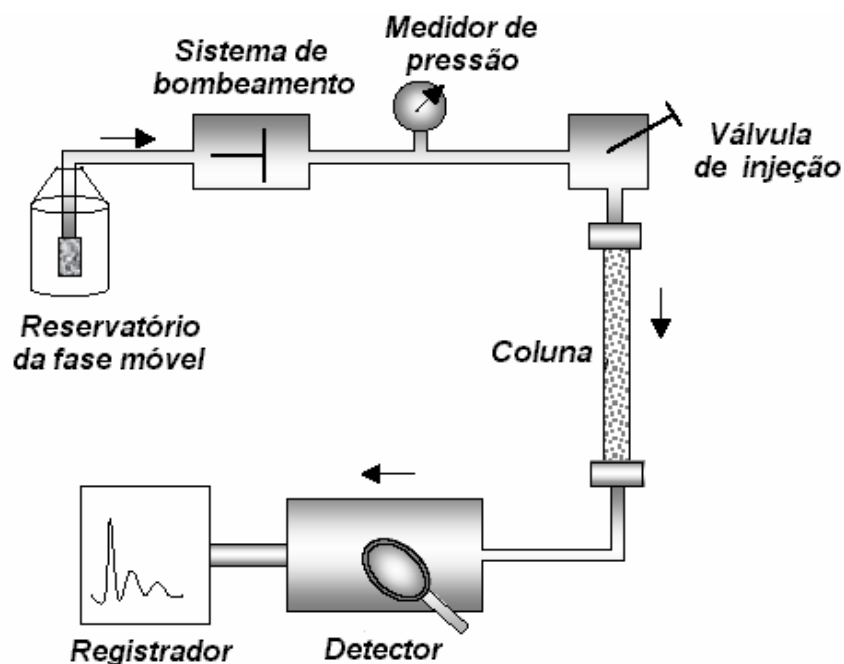


Figura 7. Esquema geral de um cromatógrafo para CLAE.

Os detectores mais utilizados em CLAE são: detector UV (comprimento de onda fixo ou variável), índice de refração, fluorescência, condutividade elétrica e eletroquímico.⁸³ Neste trabalho foi utilizado o detector UV-Visível com arranjo de fotodiodos (DAD) (Figura 8).

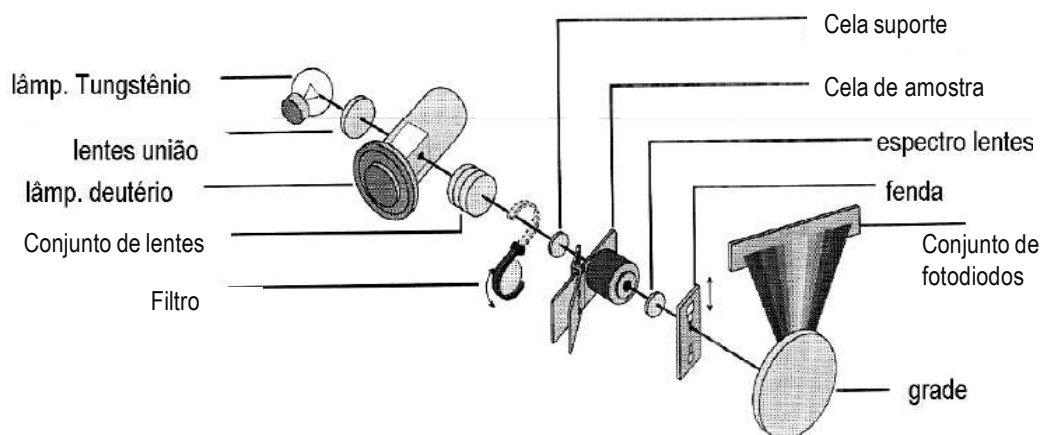


Figura 8. Esquema de um detector de arranjo de fotodiodos.

O detector UV-Visível é o mais empregado atualmente em CLAE para as análises de flavonoides, especialmente porque estes compostos apresentam duas bandas de absorção características no UV, sendo uma com $\lambda_{\text{máx.}}$ entre 240-280 nm e a outra em torno de 300-380 nm.⁶⁵ O detector de comprimento de onda variável com arranjo de fotodiodos apresenta como vantagens: maior seletividade, sempre que um determinado comprimento de onda pode ser escolhido no qual o soluto possua alta absorção e outros solutos não; obter o espectro de absorbância de cada substância em separado. Neste tipo de detector toda a luz da fonte passa pela cela do detector, a luz emergente é dispersada por uma grade holográfica, sendo os comprimentos de onda resultantes focalizados sobre uma fila de fotodiodos, assim todo o espectro pode ser armazenado usando um microcomputador, sem que haja necessidade de interromper o fluxo da fase móvel. Com este detector, o microcomputador pode produzir um cromatograma a partir de um dado comprimento de onda ou uma série de espectros em intervalos de tempo fixos.⁷¹

1.1.6.3 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM)

Apesar da CLAE ser uma excelente técnica de separação, ela necessita de uma técnica confirmatória quando a confirmação da estrutura química é também necessária. A espectrometria de massas é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias, assim o acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa: a CL-EM.⁸⁴

Um importante aspecto da CL-EM é sua alta sensibilidade, permitindo a identificação estrutural de substâncias encontradas em extratos preparados a partir de quantidades muito pequenas de material vegetal se comparado com os procedimentos tradicionais fitoquímicos em escala preparativa de isolamento de produtos naturais; além disto, a CL-EM é uma poderosa técnica para identificação *on-line* de substâncias em misturas complexas, especialmente em extratos brutos de plantas.^{85,86} Informações estruturais mais detalhadas e com maior rapidez podem ser obtidas através do recurso da espectrometria de massas sequencial (EM/EM) em combinação com a dissociação induzida por colisão (DIC).⁸⁷

A técnica CL-EM apresenta grande potencial na identificação e caracterização de flavonóides em várias plantas e alimentos.⁸⁸ Através da EM pode-se obter a massa molecular dos flavonoides glicosilados, além da estrutura da aglicona, informações sobre a acilação dos grupos hidroxila dos açúcares e possíveis metilações ou sulfonações da aglicona hidroxilada, e também o número de unidades de açúcares.⁸⁹ Utilizando a técnica CL-EM/EM, Pereira et al. (2005)⁹⁰ identificaram isômeros de flavonas C-glicosilados em extratos de *Passiflora*.

Quando se utiliza a CL-EM, são encontradas incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente do sistema cromatográfico com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas. Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no interfaceamento do sistema CLAE com EM foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais, em alguns casos, também é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas termolábeis e/ou pouco voláteis.^{91,92}

As fontes de ionização mais utilizadas no acoplamento CL-EM, e que operam à pressão atmosférica são: eletrospray (ES), ionização química à pressão atmosférica (IQPA) e fotoionização à pressão atmosférica (FIPA). A ionização à pressão atmosférica pode ser acoplada com diferentes analisadores (quadrupolo, ion trap, eletromagnético, tempo de voo e ciclotron).⁹³

Neste trabalho foi utilizado o equipamento CL-EM com espectrômetro de massa tipo quadrupolo equipado com fonte de ionização por eletrospray, para a análise dos flavonoides presentes na polpa de *P. edulis*.

A Figura 9 mostra a interface para CL-EM utilizando a ionização via eletrospray. A saída da coluna de CLAE é conectada à sonda (*probe*), formada por um tubo capilar de metal circundado por um fluxo de gás nebulizador (geralmente N₂). Aplica-se uma diferença de potencial de alguns milhares de volts entre a ponta do tubo de metal e o cone de amostragem, criando um spray formado por gotículas do analito na fase móvel e o gás nebulizador. O solvente é então evaporado, e à medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido sucessivamente, até que os íons do analito evaporem e sejam direcionados para o cone de amostragem, e a seguir para o analisador de íons, onde ocorre a separação

dos íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, razão m/z .^{84,94}

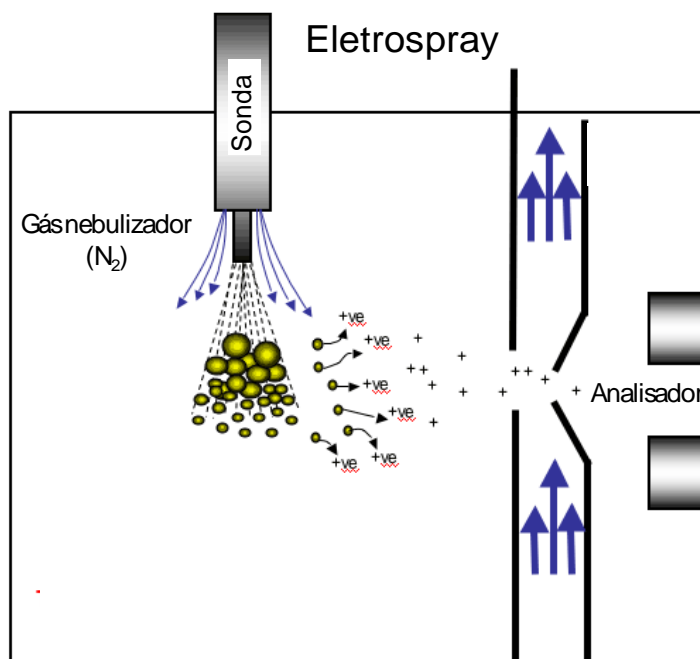


Figura 9. Interface do tipo eletrospray utilizada para o acoplamento CL-EM.

O analisador do tipo quadrupolo é composto de quatro barras, usualmente feitas de metal, dispostas em dois pares. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, e o outro par em potencial elétrico negativo. Considerando uma dada amplitude para as voltagens de radiofrequência e de corrente contínua aplicada nas barras, somente os íons que apresentarem determinada razão massa/carga (m/z), a qual esteja em ressonância com o campo aplicado, irão passar pelas barras do quadrupolo e serão detectados.⁸⁴

Já o analisador de massas em EM/EM do tipo triplo quadrupolo (Figura 10), utilizado neste trabalho, é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão (DIC) com um

gás inerte, e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. Na DIC, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produtos. Quando a DIC é realizada em baixa energia, as reações de fragmentação levam geralmente à perda de fragmentos neutros (H₂O, MeOH, CO, CO₂ etc.), dependendo da natureza do íon precursor. Esta perda de fragmentos neutros é muito importante na determinação estrutural da molécula do analito, uma vez que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula. Quando a DIC é realizada sob elevada energia, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, uma vez que pode levar à quebra das moléculas em posições características.⁹² Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informações analíticas mais exatas.

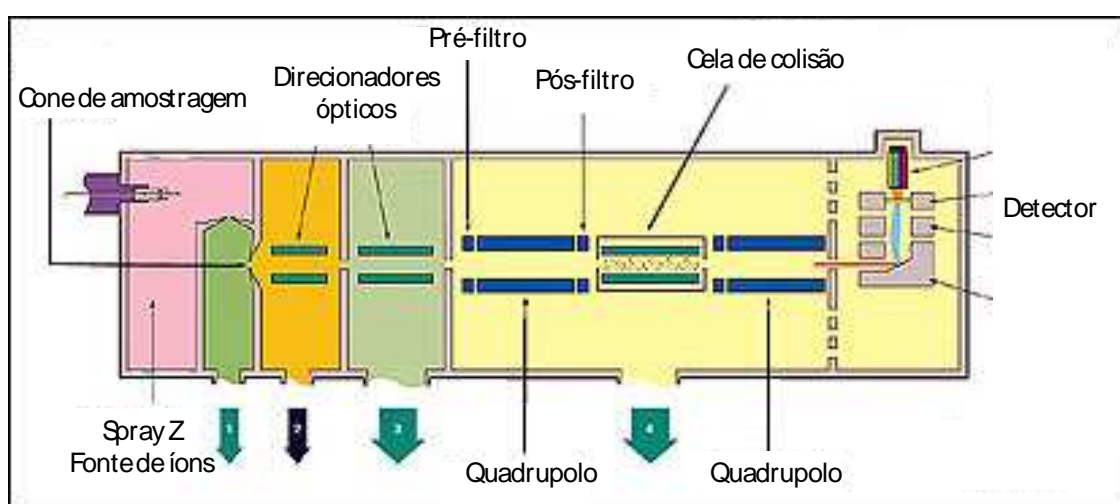


Figura 10. Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo.

1.2 OBJETIVOS GERAIS

Neste trabalho pretende-se identificar e quantificar os flavonoides presentes nos frutos da espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener, além de testar sua capacidade antioxidante, a fim de avaliar a possível utilização como alimento funcional. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- Desenvolvimento e otimização de um método de extração dos flavonoides dos frutos de maracujá utilizando planejamento fatorial completo 2³.
- Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE-UV/DAD para quantificação da flavona isoorientina presente na polpa de *P. edulis* (usando o método de adição de padrão) e para quantificação dos flavonoides totais desta espécie (expressos em rutina, usando o método do padrão externo).
- Identificação de alguns flavonoides da polpa de *P. edulis* por CL-EM/EM.
- Detecção da capacidade antioxidante e anti-inflamatória dos extratos de polpa de *P. edulis* por meio do: método do radical DPPH[•]; produção de EROs gerados pela estimulação dos neutrófilos, medida por quimioluminescência dependente de lucigenina (CL); medida da desgranulação por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), e avaliação da atividade da MPO purificada usando o método SIEFED (*Specific Immunologic Extraction Followed by Enzymatic Detection*). Comparação da capacidade antioxidante e

anti-inflamatória dos extratos da polpa de *P. edulis* com os extratos de polpa de *P. alata*, cascas de *P. edulis* infectada com o vírus PWV e cascas sadias.

- Quantificação por CCDAE da flavona isoorientina nas cascas de *P. edulis* infectada com o vírus PWV e cascas sadias e comparação com o método por CLAE-UV/DAD.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades e cultivo**. Piracicaba: FEALQ- Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 1997. v. 3.
2. INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: ITAL, 1994. 267 p.
3. RUGGIERO, C. **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. 250 p.
4. DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.
5. MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4102-4106, 1998.
6. PIZA JÚNIOR, C. T. **A cultura do maracujá**. São Paulo: CATI, 1993. 71 p.
7. MELETTI, L. M. M. **Maracujá: produção e comercialização no estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1996. 26 p.
8. PARIS, F.; PETRY, R. D.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J. B.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G. G.; SCHENKEL, E. P. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.
9. SOULIMARI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 11-20, 1997.
10. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2008.
11. MELETTI, L. M. M; MAIA, M. L. **Maracujá: produção e comercialização**, Campinas: Instituto Agrônomo, 1999. 64 p.
12. MEIRELLES, M. C. 2008. Maracujá maravilha. http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=14582. Acesso em: 10 dez. 2009.
13. GIORIA, R.; BOSQUE, G. G.; REZENDE, J. A. M.; AMORIM, L.; KITAJIMA, E. W. Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista- SP e danos causados pelo *Passion fruit woodiness virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 182-189, 2000.

14. SAMPAIO, A. C.; SCUDELLER, N.; FUMIS, T. F.; ALMEIDA, A. M.; PINOTTI, R. N.; GARCIA, M. J. M.; PALLAMIN, M. L. Manejo cultural do maracujazeiro-amarelo em ciclo anual visando à convivência com o vírus do endurecimento dos frutos: um estudo de caso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 343-347, 2008.
15. ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H.; BICCHI, C. Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 159-166, 2003.
16. COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL (CATI). **Pragas e doenças do maracujá**. Campinas: SAA/CATI,1992. 1v.
17. MARECK, U.; GALENSA, R.; HERRMANN, K. Identifizierung von Passionsfruchtsaft in Fruchtprodukten mittels HPLC. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung**, v. 191, p. 269-274, 1990.
18. SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 254-258, 2002.
19. CHAN, H. T.; CHANG, T. S. K.; CHENCHIN, E. Nonvolatile acids of passionfruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 110-112, 1972.
20. ARAÚJO, C. L.; BEZERRA, I. W. L.; DANTAS, I. C.; LIMA, T. V. S.; OLIVEIRA, A. S.; MIRANDA, M. R. A.; LEITE, E. L.; SALES, M. P. Biological activity of proteins from pulps of tropical fruits. **Food Chemistry**, v. 85, n.1, p. 107-110, 2004.
21. VINCI, G.; BOTRÈ, F.; MELE, G.; RUGGIERI, G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 211-214, 1995.
22. ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Journal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
23. COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D.; O maracujá e suas propriedades medicinais-estado da arte. In: MARACUJÁ: Germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 475-506.
24. MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
25. LAJOLO, F. M. Alimentos funcionais. **Revista Racine**, v. 62, p.18-24, 2001.
26. ANGELIS, R. C. Novos conceitos em nutrição. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 4, p. 269-271, 2001.
27. ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. 105-110, 2002.

28. NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requirements for “functional foods” claims. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 19-24, 2004.
29. SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**, v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.
30. PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims, e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.
31. ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v. 75, p. 1-6, 2009.
32. ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2010. No prelo.
33. LUTOMSKI, J.; MALEK, B.; RYBACKA, L. Pharmacochemical investigation of the raw materials from *Passiflora* genus. 2. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* forma *flavicarpa*. **Planta Medica**, v. 27, p. 112-121, 1975.
34. PURICELLI, L.; DELL’AICA, I.; SARTOR, L.; GARBISA, R.; CANIATO, R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 3, p. 302-304, 2003.
35. KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutas tropicais e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.
36. VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v.111, n. 4, p. 816-823, 2008.
37. ZERAIK, M. L.; LIRA, T. O.; VIEIRA, A. E.; YARIWAKE, J. H. Comparação da capacidade antioxidante do suco de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), da garapa (*Saccharum officinarum*) e do chá mate (*Ilex paraguariensis*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóia. **Livro de resumos...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2008, 1 CD-Rom.
38. HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
39. OLIVEIRA, L. F., NASCIMENTO, M. R. F., BORGES, S. V. RIBEIRO, P. C. N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3. p. 259-262, 2002.

40. Guertzenstein, Solange Miranda Junqueira. **Uso da casca de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, DEG) cv. amarelo com fonte de fibra solúvel na alimentação de ratos diabéticos.** 1998. 116 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição)- Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.
41. YAPO, B. D.; KOFFI, K. L. K. Yellow passion fruit rind a potential source of low-methoxyl pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2738-2744, 2006.
42. SCHWEIZER, T. F.; WURSCH, P. The physiological and nutritional importance of dietary fiber. **Experientia**, v. 47, p. 181-186, 1991.
43. TURANO, W.; LOUZADA, S. R. N.; DEREVI, S. C. N.; MENDEZ, M. H. M. Estimativa de consumo diário de fibra alimentar na população adulta, em regiões metropolitanas do Brasil. **Nutrição Brasil**, v. 3, p. 130-135, 2002.
44. GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 825-827, 2005.
45. OTAGAKI, K. K.; MATSUMOTO, H. Nutritive values and utility of passion fruit by products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, p. 54-57, 1958.
46. TOGASHI, C. K.; FONSECA, J. B.; SOARES, R. T. R. N.; GASPAR, A.; DETMANN, E. Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 2063-2068, 2007.
47. PAIVA, R. Leite com maracujá. **Revista Globo Rural**, v. 152, p. 9-15, 1998.
48. KRAHN, C. L.; BRAGA, A.; ZIMMER, A. R.; ARAÚJO, B. V. Avaliação do efeito da casca desidratada do maracujá (*Passiflora edulis*) e seu extrato aquoso na redução da glicemia em ratos diabéticos induzidos por aloxano. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 1, p. 32-34, 2008.
49. GUERTZENSTEIN, S. M. J.; SABAA-SRUR, A. U. O. Uso da casca do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG) cv amarelo como fonte de fibra na alimentação de ratos (*rattus norvegicus*) normais e diabéticos. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3., 1999, Campinas. **Livro de resumos...** Campinas: [s.n.], 1999.
50. Ramos, Erika Ravazzi Franco. **O uso de *Passiflora* sp. no controle do Diabetes mellitus: estudo qualitativo preliminar.** 2004. 36f. Monografia (Bacharelado)- Universidade CESUMAR, Centro Universitário de Maringá, Maringá, 2004.
51. AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

52. RAMOS, A. T.; CUNHA, M. A. L.; SABAA-SRUR, A. U. O.; PIRES, V. C. F.; CARDOSO, M. A. A.; DINIZ, M. F. M.; MEDEIROS, C. C. M. Uso de *Passiflora edulis flavicarpa* na redução do colesterol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 592-597, 2007.
53. ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 718 -721, 2006.
54. ABDALLA, D. S. P. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2003. 474 p.
55. HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.
56. ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p.183-198, 2002.
57. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
58. BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
59. BENZIE, I. F. F. Evolution of dietary antioxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology Parte A**, v. 136, n. 1, p. 113-126, 2003.
60. PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
61. HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, n. 9, p.937-942, 1999.
62. COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.
63. HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 141-1148, 1983.
64. MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113p.
65. MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic identification of flavonoids**. New York: Springer, 1970. 354 p.

66. HARBORNE, J.B.; MABRY, J.J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1975. p. 5-39
67. BEECHER, G. R. Flavonoids in foods. In: **ANTIOXIDANT food supplements in human health**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 269-281.
68. ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J. R.; KHAN, I. A. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants - Application to *Passiflora* Flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 2, p. 81-91, 2002.
69. Zucolotto, Silvana Maria. **Estudo fitoquímico das folhas, frutos e raízes de *P. edulis* forma flavicarpa Degener**. 2005. 127 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
70. WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 1996. 384 p.
71. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 1987. p. 57-70.
72. LANÇAS, F. M. **Métodos cromatográficos**. São Carlos, Universidade de São Paulo, 1987./Apostila/
73. BAYER, W. R. G.; LING, B. L. Thin layer chromatography applications with fluorodensitometric detection. **Journal of Planar Chromatography**, v. 1, p. 198-213, 1988.
74. SHERMA, J.; FRIED, B. **Handbook of thin-layer chromatography**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 131-132.
75. ERIC-JOVANOVIC, S.; AGBABA, D.; ZIVANOV-STAKIC, D.; VLADIMIROV, S. HPTLC determination of ceftriaxone, cefixime and cefotaxime in dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 893-898, 1998.
76. BERTSCH, W. HARA, S.; KAISER, R. E.; ZLATKIS, A. **Instrumental HPTLC**. Heidelberg: Huthig, 1980. 390 p.
77. JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WINNER, H. **Thin-layer chromatography**. Weinheim: VCH, 1990. 464 p.
78. NETO, A.; RADLER, F.; SOUZA, D. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. p. 31-41.
79. POOLE, C. F. Planar chromatography at the run of the century. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 399-427, 1999.
80. MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

81. MCNAIR, H. M.; LANÇAS F. M. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista de Química Industrial**, p. 21-26, 1985.
82. CASS, Q. B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos de HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: UFSCar, 2001. 76 p.
83. LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. **High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice**. London: Chapman & Hall, 1996. 276 p.
84. LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
85. WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance- mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 437-455, 2003.
86. HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. **Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation**. 2.ed. Berlin: Springer, 1998. 244p.
87. CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.
88. CARERI, M.; BIANCHI, F.; CORRADINI, C. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 970, n. 1-2, p.3-64, 2002.
89. STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 54, p. 237-256, 2000.
90. PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 295-301, 2005.
91. ARDREY, R. E.; **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. Wiley: Huddersfield, 2003. 296p.
92. CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
93. NIESSEN, W. M. A. Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 794, p. 407-435, 1998.

94. NIWA, T. Clinical mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 242, p.15-71, 1995.

CAPÍTULO 2- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS FLAVONOIDES DA POLPA DOS FRUTOS DE *P. EDULIS* E *P. ALATA*

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Planejamento Fatorial

Nas indústrias ou nas pesquisas comumente depara-se com problemas em que se necessita avaliar a influência de diversas variáveis (fatores) em relação a uma determinada resposta. O objetivo é encontrar valores (níveis) para estes fatores de forma que a resposta obtida seja maximizada ou minimizada, dependendo do sistema.¹

A utilização de técnicas multivariadas, como o planejamento fatorial, vem sendo cada vez mais descrita na literatura²⁻⁴ para a otimização de diversos sistemas, devido às suas vantagens frente à tradicional otimização univariada. Quando se variam todos os fatores ao mesmo tempo são explorados os efeitos de interação entre as variáveis e os números de experimentos executados são menores, tornando o procedimento analítico mais rápido e mais econômico.^{1,5}

A seguir, destacam-se alguns benefícios da utilização das técnicas multivariadas:⁶

- realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios;
- seleção das variáveis que influem num processo com número reduzido de ensaios;

- representação do processo estudado através de expressões matemáticas; elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.
- redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação;
- estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos;

Assim, a melhor maneira de otimizar um experimento é variar todos os fatores ao mesmo tempo, ou seja, avaliando simultaneamente as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta.⁷

Para executar um planejamento fatorial, deve-se escolher as variáveis a serem estudadas e efetuar-se experimentos em diferentes níveis destes fatores. De um modo geral, o planejamento fatorial pode ser representado por b^α , onde α é o número de fatores e b é o número de níveis escolhidos. Em um estudo que tenha 3 fatores e 2 níveis (2^3), o número total de experimentos é 8.

Nos planejamentos experimentais onde as variáveis são exploradas em 2 níveis, é comum codificá-los usando os sinais (+) e (-). A atribuição destes sinais aos níveis superiores ou inferiores é feita arbitrariamente e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, além de permitir esquematizar o planejamento na forma de matrizes de planejamento.⁸

Os efeitos obtidos em cada um dos experimentos avaliados são, posteriormente, utilizados para gerar informações a respeito das tendências de cada fator estudado. Os efeitos podem ser de dois tipos: principais e de interação.

O efeito principal é aquele causado no sistema químico, por uma das variáveis, quando seus níveis passam de um valor para outro. Já o efeito de interação é aquele causado no sistema em estudo pela interação de variáveis, podendo ser de segunda, de terceira ou de ordem superior, de acordo com o número de fatores considerados na otimização.

Neste trabalho foi realizada a otimização das etapas de extração dos flavonoides dos frutos de maracujá utilizando-se o planejamento fatorial completo, no qual realizam-se experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores, apresentando a vantagem de se poder estimar os efeitos principais e todos os efeitos de interação de todos os fatores nas respostas.¹

2.1.2 Validação do método analítico

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos procedimentos cromatográficos mais utilizados na análise de flavonoides em plantas e alimentos, devido à alta eficiência de separação destas substâncias, sensibilidade alcançada, além de possibilitar a obtenção de um perfil cromatográfico característico e a determinação quantitativa das substâncias a serem estudadas.⁹

Utilizando-se a técnica CLAE há necessidade de se avaliar a qualidade das medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado.¹⁰

A validação tem por objetivo assegurar que o método utilizado seja adequado ao que se propõe identificar ou quantificar, assegurando a confiabilidade dos resultados.^{11,12} Esta etapa é muito importante e necessária para que o método desenvolvido possa ser utilizado.¹³

O primeiro passo no procedimento de validação deve ser a identificação do problema analítico e o que é analiticamente viável. Deve ser levado em consideração quando o método será utilizado, qual o tipo de resposta que é exigido (qualitativa ou quantitativa) e em qual estado estará o analito. É essencial que os

estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados.¹⁴

Para validar o método desenvolvido neste trabalho foi utilizado o protocolo da *International Conference on Harmonisation (ICH)*,¹⁵ segundo o qual os parâmetros analíticos que devem ser considerados são:

- Especificidade: é a capacidade que o método possui de medir exatamente o analito em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.
- Linearidade: é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.
- Exatidão ou Recuperação: é a proximidade dos resultados encontrados pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro convencional.
- Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta avaliação deve ser considerada em três níveis:
 - Repetibilidade (precisão intra-corridas): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.
 - Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes.
 - Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de métodos analíticos (por exemplo, para inclusão de métodos em farmacopeias).

- Limite de detecção: é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada.
- Limite de quantificação: é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com apropriada precisão e exatidão.

2.2 OBJETIVOS

O objetivo desta parte do trabalho foi desenvolver um método validado por CLAE-UV/DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta por arranjo de diodos) para a determinação quantitativa dos flavonoides da polpa dos frutos de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, para avaliar a sua possível utilização como alimento funcional, visto que não há na literatura nenhum estudo sobre a quantificação de flavonoides totais em frutos de *P. edulis*, fruto muito consumido no Brasil, principalmente na forma de suco. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- Desenvolvimento e otimização de um método de extração dos flavonoides dos frutos de maracujá utilizando planejamento fatorial completo 2³.
- Validação de um método analítico para quantificação da flavona isoorientina presente na polpa de *P. edulis* (usando o método de adição de padrão) e quantificação dos flavonoides totais desta espécie (expressos em rutina, usando o método do padrão externo) por CLAE-UV/DAD.

Além disso, foi realizada a identificação de alguns dos flavonoides na polpa de *P. edulis* por CL-EM/EM (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem).

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Materiais, reagentes e padrões analíticos

Materiais: cartuchos com fase C₁₈ e 400,0 mg de adsorvente (Sep-Pak, Waters Associates, Milford, MA, EUA); membranas hidrofílicas para filtração Millipore Millex-HV PVDF (polivinilideno fluorado), com poros de 0,45 µm, diâmetro de 25,0 mm e não estéril (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Solventes: etanol p.a. (Quemis, Diadema, Brasil), metanol grau HPLC (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), éter dietílico, acetato de etila, n-butanol e ácido fórmico p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha), acetonitrila (Tedia, Fairfield, OH, EUA) grau HPLC e água deionizada purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Padrões: rutina 95% (Sigma, St. Louis, EUA), isoorientina e isovitexina 99% (Carl Roth, Karlsruhe, Alemanha).

2.3.2 Amostras dos frutos

Os frutos de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener foram coletados em 15 de janeiro de 2008 na Fazenda São Luiz, município de Bauru, São Paulo. Os frutos da espécie *P. alata* Dryander foram coletados em 20 de abril de 2008, na Fazenda Morada da Paz, município de Arealva, São Paulo. As espécies foram identificadas pelo Dr. Luís Carlos Bernacci do Herbário IAC, Instituto Agrônomo de Campinas-SP: a espécie *P. edulis* foi catalogada sob o número de voucher IAC 49929 e a espécie *P. alata* com o IAC 50283.

As polpas dos frutos foram separadas das sementes por meio de peneiração, posteriormente foram armazenadas em frascos hermeticamente fechados e congeladas em freezer a - 20 °C.

2.3.3 Preparo dos extratos de flavonoides da polpa do maracujá para análise por CLAE-UV/DAD

Foi realizado o seguinte procedimento de extração: 30,0 mL de etanol ou de metanol em diferentes proporções foram adicionados a 10,0 mL da polpa de maracujá (livre de sementes); a seguir colocou-se a amostra em ultrassom e logo após na centrífuga, por 20 minutos a 10000 rpm e 25 °C; o sobrenadante foi retirado e concentrado no rotaevaporador até um volume de aproximadamente 2,0 mL.

O extrato concentrado foi então submetido à etapa de “clean-up” por extração em fase sólida (SPE), empregando-se cartucho Sep-Pak Waters de fase reversa (C₁₈). Primeiramente efetuou-se o condicionamento do cartucho (400,0 mg de adsorvente) com 5,0 mL de metanol seguido de 5,0 mL de água; o extrato concentrado foi introduzido no cartucho e eluído com 2,0 mL de metanol 60% (eluição dos flavonoides), o volume foi ajustado em balão volumétrico de 2,0 mL com metanol 60% para posterior análise quantitativa. Foi utilizada vazão gravitacional. Os extratos foram filtrados utilizando-se membranas hidrofílicas Millipore Millex-HV PVDF (0,45 µm; 25,0 mm) e posteriormente analisados por CLAE-UV/DAD.

2.3.4 Otimização da extração de flavonóides

Foi realizada a otimização das etapas de extração utilizando-se o planejamento fatorial completo 2^3 . O planejamento fatorial tem o objetivo de selecionar os fatores e suas interações que interferem significativamente na resposta obtida.

Elaborou-se um planejamento experimental, no qual as três variáveis independentes (fatores) foram: tipo de solvente, proporção do solvente e tempo de sonicação; e a variável dependente (resposta) foi a porcentagem de área relativa do pico de isoorientina, ou seja, (área da flavona isoorientina/ área de flavonoides totais) x 100. As respostas foram obtidas analisando os cromatogramas por meio do programa Empower (Waters).

No planejamento fatorial completo 2^3 , de dois níveis e 3 fatores, há um total de oito experimentos, os quais foram iniciados escolhendo-se os níveis inferior e superior para cada variável, representados pelos sinais (-) e (+), respectivamente (Tabela 2). Os oito experimentos foram realizados em triplicata, sendo cada replicata realizada em um dia diferente, de maneira aleatória.

O software Statistica 7.0 foi usado para o cálculo dos efeitos e suas interações, além da construção do gráfico de Pareto e estimativa da superfície de resposta.

Tabela 2. Níveis e fatores avaliados no planejamento fatorial 2³

Fatores	Níveis	
	Inferior (-)	Superior (+)
Tipo de Solvente	Metanol	Etanol
Proporção de Solvente	60%	100%
Tempo de sonicação (minutos)	1,5	3,0

2.3.5 Preparo dos extratos de flavonoides da polpa do maracujá para análises por CL-EM/EM

Foi realizada uma extração líquido-líquido com a polpa de *P. edulis* e analisadas as frações obtidas. Seguiu-se o procedimento descrito por Mareck et al. (1990):¹⁶ adicionou-se 500,0 mL de metanol em 100,0 mL de polpa (livre de sementes), a seguir foi realizada agitação por 15 minutos a 40 °C, seguido de filtração e lavagem do filtro com 200,0 mL de metanol 70%, e o extrato filtrado foi concentrado no rotaevaporador até eliminação do metanol ($v_f = 80,0$ mL).

O extrato concentrado foi colocado em um funil de separação e adicionados 50,0 mL de éter dietílico, a mistura foi agitada e deixada em repouso, a seguir foi recolhida a fase orgânica e filtrada com o agente secante Na₂SO₄. A extração foi realizada em triplicata, o volume total recolhido da fase orgânica foi concentrado no rotaevaporador até a secura, e então resuspenso em metanol a fim de obter a concentração final de 10,0 mg mL⁻¹ para análise. O mesmo procedimento foi realizado com a fase aquosa restante (após extração com éter dietílico), utilizando-se como solventes extratores acetato de etila e n-butanol saturado com água, e as três frações obtidas foram analisadas separadamente por CL-EM/EM.

2.3.6 Análises dos flavonoides presentes nos extratos de maracujá

2.3.6.1 Análise por CCD

Foram aplicados com micropipeta graduada (Eppendorf) 3,0 μL dos extratos concentrados (itens 2.3.3 e 2.3.5) e dos padrões rutina e isoorientina (ambos na concentração de 200,0 mg L^{-1} em metanol) em placa comercial de sílica gel 60 (sem indicador de fluorescência), espessura da camada de 0,2 mm (Merck, Art. 1.05553). Utilizou-se como eluente: acetato de etila/ácido fórmico/água (82:9:9 v/v)¹⁷ e, após secagem, foi realizada a revelação com um reagente específico para revelação de flavonoides: difenilborato de aminoetanol/ polietilenoglicol 400 (NP/PEG- 400).^{18,19} A solução reveladora foi preparada dissolvendo-se 100,0 g de difenilborato de aminoetanol em 500,0 mg de PEG-400, adicionando em seguida 10,0 mL de metanol. Após a secagem das placas, a visualização das manchas fluorescentes foi feita sob luz UV ($\lambda = 366 \text{ nm}$).

2.3.6.2 Análise por CLAE-UV/DAD

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido (Waters 2695) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (Waters, PDA 2996), usando sistema de aquisição e tratamento de dados Empower (Waters). Foi utilizada coluna Symmetry[®] C₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) com pré-coluna Symmetry[®] C₁₈ (2,0 cm x 4,0 mm x 5 μm), ambas Waters.

A fase móvel utilizada foi acetonitrila (solvente B) e água deionizada em sistema Milli-Q (solvente A), sendo as duas fases acidificadas com 0,2% de ácido

fórmico. Visando a melhor separação das substâncias presentes na amostra, foram realizados vários estudos de otimização, modificando-se o gradiente de eluição, a vazão ($0,8 \text{ mL min}^{-1}$, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $1,2 \text{ mL min}^{-1}$) e a temperatura do forno da coluna (35° C , 40° C e 45° C).

2.3.6.3 Análise por CL-EM/EM

As análises por CL-EM/EM foram realizadas na Universidade de Liège (Laboratório de Espectrometria de Massas, Bélgica) em um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo Quattro Ultima Platinum, Waters-Micromass (Manchester, UK) equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI) operando no modo negativo, acoplado com um cromatógrafo líquido Alliance 2690 (Waters, Milford, MA, EUA). A coluna e condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas nas análises por CLAE-UV/DAD (item 2.3.6.2). As análises foram feitas segundo condições anteriormente estabelecidas no laboratório de Farmacognosia da Universidade de Liège para análises de flavonoides: o efluente da CL foi dividido usando um *T-splitter* resultando na vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, e a energia de colisão utilizada foi de 18 eV. As voltagens do capilar e do cone de amostragem foram de 3,2 kV e 50 V, respectivamente. A temperatura da fonte foi mantida a 125° C , enquanto que a temperatura de desolvatação foi de 250° C . O nitrogênio foi usado como cone e gás de desolvatação à vazão de 88 L h^{-1} e 502 L h^{-1} , respectivamente.

As soluções-padrão de isoorientina e isovitexina foram preparadas na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol para análise por CL-EM/EM.

2.3.7 Parâmetros analíticos avaliados na validação

Os parâmetros avaliados para a validação dos métodos de quantificação da flavona isoorientina e flavonoides totais na polpa de *P. edulis* foram: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação, segundo os protocolos da *International Conference on Harmonisation (ICH)*.¹⁵

2.3.7.1 Especificidade

Foram realizados testes de pureza dos picos por meio dos espectros obtidos com o detector de arranjo de fotodiodos ($\lambda = 200-400$ nm), obtendo-se espectros em diferentes pontos de cada pico.

2.3.7.2 Linearidade

Foi usado no processo de validação o padrão isoorientina. As curvas analíticas foram obtidas em triplicata pelo método da adição de padrão: alíquotas da solução-padrão de isoorientina ($300,0 \text{ mg L}^{-1}$ em metanol 80%) foram adicionadas aos extratos, a fim de obter as concentrações finais de 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 mg L^{-1} em metanol 80%.

Para a quantificação de flavonoides totais, foi utilizado o método do padrão externo: a curva analítica foi construída a partir da solução-estoque de rutina de $500,0 \text{ mg L}^{-1}$ em metanol 80%, preparando-se soluções nas seguintes concentrações: 50,0; 100,0; 150,0; 200,0 e 250,0 mg L^{-1} em metanol 80%; cada ponto foi analisado em triplicata.

Em ambos os métodos, a linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear das curvas analíticas.

2.3.7.3 Exatidão

Foram adicionadas quantidades conhecidas do padrão isoorientina à polpa de *P. edulis* no início da extração dos flavonoides, a fim de se obter três níveis de concentração: 20,0; 45,0 e 70,0 mg L⁻¹ (baixo, intermediário e alto da curva analítica). Foram realizadas 9 determinações, ou seja, 3 concentrações com 3 réplicas cada.

O mesmo procedimento foi realizado com o padrão rutina para os ensaios de exatidão do método de quantificação de flavonoides totais, os níveis de concentrações utilizados foram: 70,0; 150,0; 250,0 mg L⁻¹.

A exatidão foi determinada pela equação 1.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \cdot 100 \quad (1)$$

2.3.7.4 Precisão

A repetibilidade (precisão intra-corrída) foi avaliada em um mesmo dia, com o mesmo equipamento, mediante análises em triplicata de 3 extratos com diferentes níveis de concentração do padrão isoorientina: 20,0; 45,0 e 70,0 mg L⁻¹ (baixa, média e alta).

O mesmo procedimento foi realizado com o padrão rutina com as seguintes concentrações: 70,0; 150,0; 250,0 mg L⁻¹ (nível baixo, médio e alto da curva analítica).

A precisão intermediária (precisão inter-corridas) foi avaliada em 3 dias diferentes, com o mesmo equipamento, mediante análises em triplicata de 3 extratos com diferentes níveis de concentração do padrão isoorientina: 20,0; 45,0 e 70,0 mg L⁻¹ (baixa, média e alta).

Para o ensaio de precisão intermediária com o padrão rotina foram analisados os extratos com os seguintes níveis de concentrações do padrão: 70,0; 150,0; 250,0 mg L⁻¹.

A precisão foi determinada a partir do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), segundo a equação 2.

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \cdot 100 \quad (2)$$

2.3.7.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção foi estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes dos padrões, até o valor da razão de 3:1 entre o sinal e o ruído da linha de base.

O limite de quantificação foi determinado analisando-se soluções de concentrações conhecidas e decrescentes dos padrões. Para o limite de quantificação foi utilizada a razão 10:1 entre o sinal e o ruído da linha de base.

2.3.8 Análise quantitativa dos flavonoides presentes nos maracujás (*P. edulis* e *P. alata*)

A quantificação específica da flavona isoorientina na polpa do fruto de *P. edulis* foi realizada por meio do método de adição de padrão. Foram adicionadas aos extratos alíquotas da solução-estoque de isoorientina (300,0 mg L⁻¹ em metanol 80%) a fim de obter as concentrações finais: 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80 mg L⁻¹, as curvas analíticas foram construídas em triplicata. A quantidade de isoorientina foi obtida analisando-se as triplicatas dos cromatogramas dos extratos obtidos em $\lambda = 330$ nm.

As análises quantitativas para determinação dos flavonoides totais nos extratos de *P. edulis* e *P. alata* foram realizadas através do método do padrão externo, utilizando-se a curva analítica construída com o padrão rutina. A curva analítica foi construída a partir da solução-estoque de rutina de 500,0 mg L⁻¹ em metanol 80%. Foram preparadas soluções nas concentrações: 50,0; 100,0; 150,0; 200,0 e 250,0 mg L⁻¹ em metanol 80%. A quantidade de flavonoides totais foi obtida analisando-se as triplicatas dos cromatogramas dos extratos de cada espécie obtidos em $\lambda = 330$ nm: os valores de área de cada um dos picos identificados como flavonoides (através dos espectros UV/DAD) foram somados e aplicados na curva analítica para obtenção do valor correspondente de concentração de flavonoides.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Otimização da extração através de planejamento fatorial

O planejamento fatorial completo 2^3 foi usado para avaliar os fatores ou variáveis independentes que possuem influencia significativa sobre a variável dependente ou resposta.

Segundo a literatura,²⁰ a escolha do solvente influencia na eficiência da extração, e devido a alterações na seletividade pode-se extrair maior quantidade das substâncias desejadas. Os flavonoides são compostos polares, contendo açúcares e grupos OH fenólicos, assim os solventes mais indicados são metanol e etanol, que podem ser utilizados diluídos em água, o que seria mais interessante do ponto de vista econômico e ambiental. Além disso, o uso destes solventes em misturas com água é descrito nas Farmacopeias Francesa,²¹ Europeia²² e Brasileira²³ para extração de flavonoides das folhas de *P. incarnata* e *P. alata*.

A capacidade do solvente em atrair as substâncias de interesse (coeficiente de difusão) influencia no tempo necessário para o contato com a amostra. Neste caso, o emprego de banhos de ultrassom (sonicação) promove efeito sinérgico com as propriedades do solvente graças ao fenômeno de cavitação acústica, caracterizado pela formação, crescimento e colapso de bolhas de ar, que ocasiona um aumento da temperatura e pressão. Desse modo, o tempo de sonicação torna-se também relevante na determinação das condições de extração.²⁴

O tempo de sonicação, o tipo de solvente e sua proporção propostos neste trabalho, estão de acordo com a literatura.^{17,25,26} Os 8 experimentos do planejamento fatorial foram realizados em triplicata. A Tabela 3 apresenta os valores dos 3 fatores

selecionados (tipo de solvente, proporção de solvente e tempo de sonicação) e a média das respostas, com seus respectivos desvios.

Tabela 3. Respostas dos experimentos do planejamento fatorial completo 2³

Experimento	Solvente	Proporção de solvente (%)	Tempo de sonicação (minutos)	Média das respostas (% Área do pico de isoorietina/área flavonoides totais)	Desvio Padrão
1	Metanol	60	1,5	18,12	0,11
2	Etanol	60	1,5	19,40	0,12
3	Metanol	100	1,5	17,82	0,16
4	Etanol	100	1,5	17,99	0,14
5	Metanol	60	3,0	18,08	0,09
6	Etanol	60	3,0	19,13	0,14
7	Metanol	100	3,0	18,38	0,12
8	Etanol	100	3,0	18,39	0,11

As respostas do planejamento fatorial completo 2³ foram obtidas analisando os cromatogramas de diferentes formas. Primeiramente foram analisadas como respostas a área total dos picos dos cromatogramas e a área total dos flavonoides: foram calculados todos os efeitos, porém concluiu-se que nenhuma variável era significativa no processo de extração. Assim, optou-se por analisar a área dos picos dos possíveis flavonoides separadamente.

Foi obtida resposta significativa a partir dos valores percentuais de área relativa do pico da flavona isoorientina (área da flavona/área flavonoides totais presentes no extrato de *P. edulis*) (Figura 11). A isoorientina apresenta duas bandas de absorção no UV (Figura 12), características das flavonas: banda I em 300-380 nm e banda II em 240-280 nm.²⁷

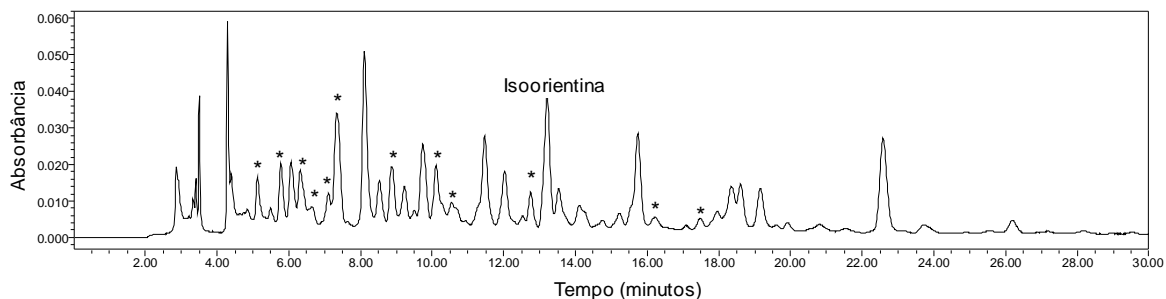


Figura 11. Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm da fração flavonoídica de *P. edulis*. (*) Picos identificados como flavonoides. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B); 0-10 minutos, 12%-16% de B em A e 10-30 minutos, 16-20% de B em A, vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno= $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (item 2.4.2.2).

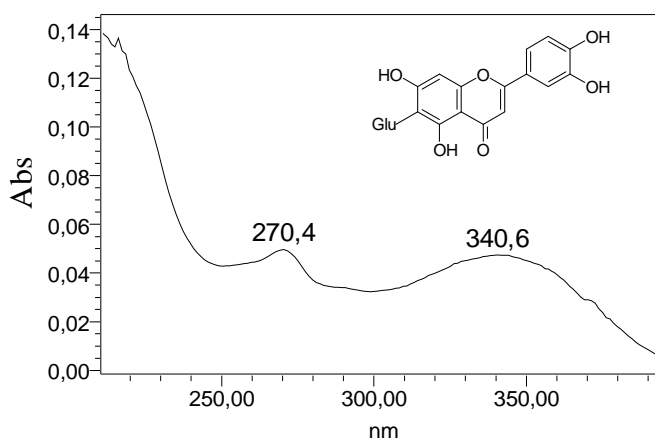


Figura 12. Espectro UV/DAD e estrutura da isoorientina (pico com $t_r = 13,217$ minutos no cromatograma da Figura 11) presente na fração flavonoídica do extrato de *P. edulis*.

Utilizando o programa STATISTICA 7.0, foram calculados os efeitos primários de cada variável (1, 2 e 3) e os efeitos de interação secundários (1 e 2, 1 e 3, 2 e 3), totalizando 6 efeitos (Tabela 4).

Tabela 4. Valores dos efeitos do planejamento fatorial completo

Fatores	Valores dos efeitos	Nível de significância (p)	Distribuição de Student (t)
(1) Solvente	0,6325	0,0176	36,143
(2) Proporção de solvente	-0,5325	0,0209	-30,429
(3) Tempo de sonicação	0,1625	0,0683	9,286
1 e 2	-0,5375	0,0207	-30,714
1 e 3	-0,0975	0,1131	-5,571
2 e 3	0,3175	0,0350	18,143

A significância dos efeitos ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) pode ser melhor visualizada pelo gráfico de Pareto (Figura 13).

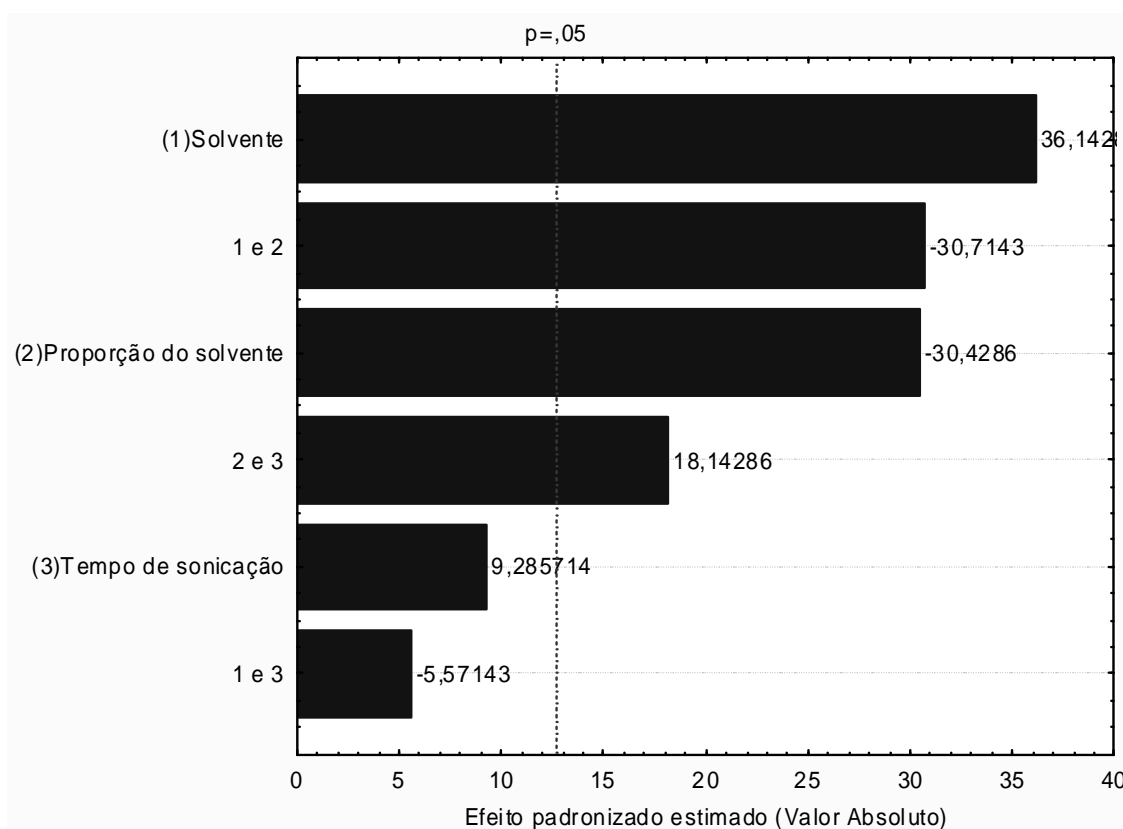


Figura 13. Gráfico de Pareto, indicando os valores dos efeitos padronizados.

Pode-se observar na Figura 3 que os efeitos 1, 1 e 2, 2 e 2 e 3 são significativos, ou seja, que neste planejamento as variáveis 1 (tipo de solvente) e 2 (proporção de solvente) são significativas (no intervalo de confiança de 95%) para o procedimento de extração dos flavonoides dos frutos de *P. edulis*, enquanto que a variável 3 (tempo de sonicação) não apresentou relevância na extração dentro do intervalo de tempo considerado.

A análise estatística também mostrou um efeito significativo antagônico para o solvente (0,6325) e para a proporção de solvente (-0,5325), ou seja, que o etanol tem maior capacidade de extração do que o metanol, e que a proporção de 60% é mais eficiente na extração do que 100% de solvente orgânico. A interação entre estas duas variáveis apresentou efeito significativo, demonstrando que a extração com etanol 60% proporciona uma maior área relativa de isoorientina.

Esta análise pode ser confirmada pela superfície de resposta (Figura 14), que mostra o nível ótimo para cada variável, apresentando um valor mais alto de resposta (em vermelho) para valores positivos da variável 1 e negativos da variável 2.

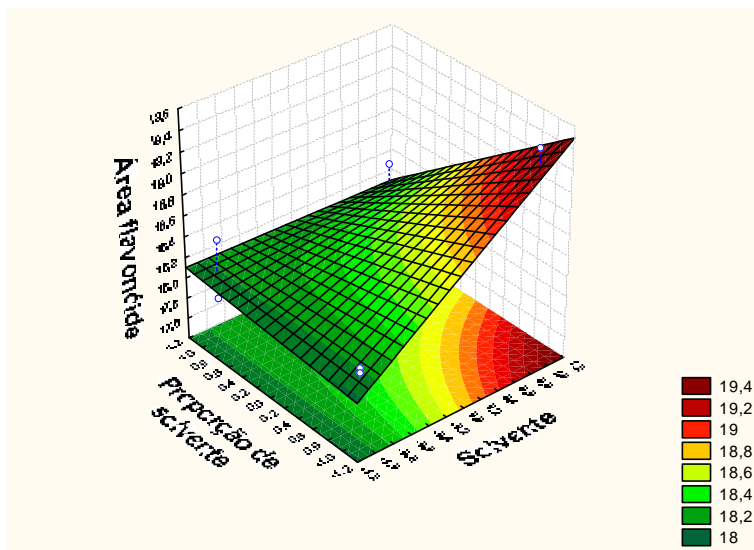


Figura 14. Superfície de resposta estimada para área relativa da flavona isoorientina em função do tipo e proporção de solvente.

Os valores do gráfico de contorno foram normalizados para facilitar a interpretação e visualização dos resultados (Figura 15).

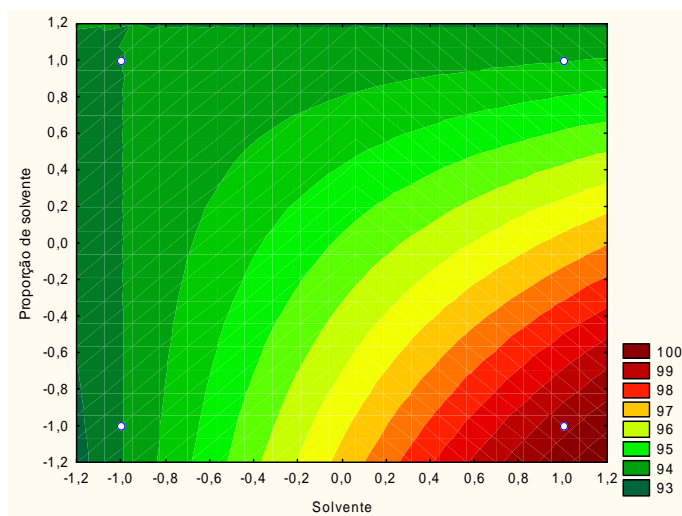


Figura 15. Gráfico de contorno para a área relativa da isoorientina em função do tipo e proporção de solvente.

Por meio do gráfico de contorno nota-se uma diferença de 7% entre o experimento de maior e menor valor de resposta. Com estes resultados foi possível determinar as condições ótimas de extração: solvente etanol 60% e tempo de sonicação de 1,5 minutos.

2.4.2 Análise cromatográfica dos flavonoides presentes nos extratos de polpa de *P. edulis* e *P. alata*

2.4.2.1 Análise por CCD

Visando a obtenção de informações estruturais dos flavonoides presentes no maracujá, foram realizadas comparações dos extratos com padrões, visualizando as manchas de fluorescência e o R_F dos flavonoides do maracujá e dos padrões analíticos. O R_F dos padrões e de cada flavonoide da amostra foi calculado de acordo com a equação (3).

$$R_F = \frac{\text{distância (cm) percorrida pela substância}}{\text{distância (cm) percorrida pelo eluente}} \quad (3)$$

Após o desenvolvimento cromatográfico e secagem das placas, foi feita a revelação com o reagente difenilborato aminoetanol/PEG 400 (NP/PEG 400) e visualização sob luz UV de $\lambda = 366$ nm. O extrato de *P. edulis* (item 2.3.3) apresentou uma mancha de fluorescência amarela ($R_F = 0,36$) semelhante ao padrão isoorientina (fluorescência amarela) com $R_F = 0,35$, sugerindo a presença desta flavona no extrato (Figura 16). Esta coloração é característica de flavonoides C-glicosídeos, sendo que a presença de dois grupos OH nas posições 3' e 4', como nos derivados de luteolina (orientina (4) e isoorientina (3)), causa esta fluorescência de cor amarela.¹⁸ O extrato de *P. alata* não apresentou manchas características de nenhum padrão de flavonoide testado, até o limite de detecção por CCD ($50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), conforme a literatura.²⁸

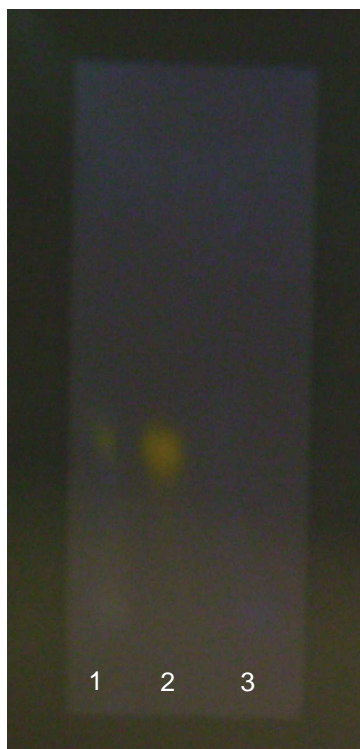


Figura 16. Placas CCD reveladas com NP/PEG 400 e visualizadas sob luz UV ($\lambda= 366$ nm). 1- extrato de *P. edulis* ($R_F= 0,36$); 2- solução-padrão de isoorientina ($R_F= 0,35$); 3- extrato de *P. alata*. Fase móvel: acetato de etila/ácido fórmico/água (82:9:9 v/v).

Foram analisadas também as frações de polpa de *P. edulis* e *P. alata* (Figura 17) obtidas após a extração líquido-líquido (item 2.3.5): a fração do extrato de *P. edulis* extraída com o solvente acetato de etila apresentou manchas amarelas mais intensas comparada com as outras frações, sugerindo uma maior quantidade de flavonas derivados de luteolina (**8**), como a isoorientina (**3**) (fluorescência amarela) nesta fração (Figura 16), o extrato não apresentou manchas características dos padrões hiperosídeo e rutina (Figura 18). Esta fração foi posteriormente analisada por CL-EM/EM (item 2.4.2.3). Os extratos de *P. alata* apresentaram manchas azuis características de ácidos carboxílicos fenólicos, como por exemplo, o ácido caféico, o qual ocorre frequentemente em plantas com flavonoides.²⁹



Figura 17. Placas CCD reveladas com NP/PEG 400 e visualizadas sob luz UV ($\lambda=366$ nm). 1- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico; 2- extrato de *P. edulis* fração acetato de etila; 3- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico; 4- padrão de hiperosídeo (H) e de rutina (R); 5- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico, 6- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico, 7- extrato de *P. edulis* fração éter dietílico. Fase móvel: acetato de etila/ácido fórmico/água (82:9:9 v/v).

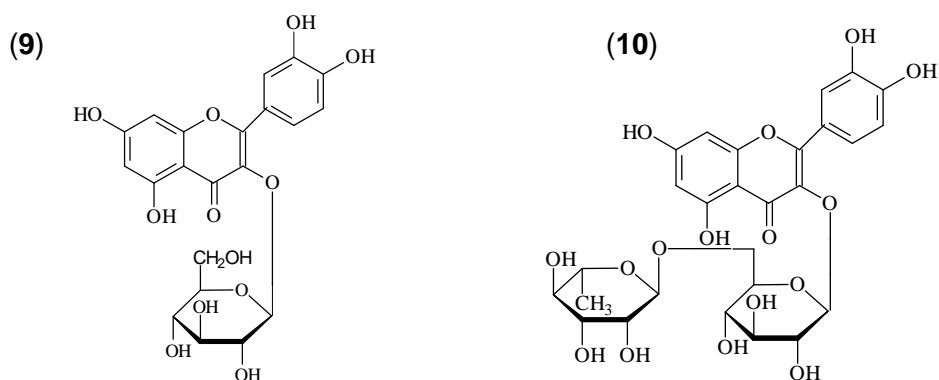


Figura 18. Estrutura dos flavonoides: (9) hiperosídeo (quercetina-3-O-galactosídeo), (10) rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo).

2.4.2.2 Otimização das condições de análise por CLAE

Para se obter a melhor separação dos flavonoides foram realizados vários estudos de otimização, alterando-se o gradiente de eluição, a vazão da fase móvel e a temperatura do forno.

A fase móvel utilizada foi escolhida baseada na literatura:¹⁷ a acetonitrila gera picos mais estreitos e mais separados, com um número maior de pratos teóricos devido à sua baixa viscosidade (0,37), quando comparada ao metanol (0,6). O ácido fórmico foi usado na fase móvel para eliminar a “cauda” dos picos devido à interação com os sítios residuais da sílica.³⁰

Iniciou-se a otimização do gradiente de eluição a partir das condições estabelecidas pela Dr. Cíntia A. M. Pereira para as folhas de *Passiflora*,¹⁷ sendo realizadas modificações, como a diminuição da porcentagem inicial de acetonitrila, e com isso diminuiu-se a força do eluente para uma melhor separação dos picos no início do gradiente; também foi diminuído o tempo de corrida e modificada a porcentagem de aumento da proporção de acetonitrila por unidade de tempo, obtendo-se uma boa resolução entre os picos. A vazão foi fixada em 0,8 mL min⁻¹ e a temperatura do forno da coluna em 35 °C. Após muitos testes variando-se a proporção da fase móvel, o gradiente que apresentou melhor resolução para a maioria dos picos foi: 0-10 minutos: 12%-16% de B em A, 10-30 minutos: 16-20% de B em A, de 30-40 minutos: 20-12% de B em A (lavagem); sendo o solvente A, 0,2% de ácido fórmico em água e o solvente B, 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila.

O próximo passo da otimização foi a modificação da vazão da fase móvel, testando-se: 0,8; 1,0 e 1,2 mL min⁻¹. O aumento da vazão da fase móvel tornou a análise mais rápida, aumentando a pressão ao longo da coluna, mas ocorreu a

perda na eficiência e diminuição na resolução entre a maioria dos picos; por outro lado, com a diminuição da vazão aumentou-se a eficiência e conseqüentemente o número de pratos teóricos da coluna; assim a melhor separação e eficiência foi obtida com vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

Também foram realizados testes com a temperatura do forno, fator importante para se obterem tempos de retenção reproduzíveis. Com o aumento da temperatura ocorre a diminuição da viscosidade dos solventes, reduzindo a pressão através da coluna, além de aumentar o valor da difusividade do soluto na fase móvel, permitindo melhor transferência de massa.³¹ Utilizando o gradiente otimizado e a vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, variou-se a temperatura de 35, 40 e 45 °C. A 40 °C, observou-se melhora na resolução para a maioria dos picos; já com a temperatura do forno a 45 °C ocorreu diminuição do tempo de retenção das substâncias, porém ocorreu a perda de resolução entre muitos picos. Conclui-se então que a melhor temperatura para análise é de 40 °C.

Para a escolha do melhor comprimento de onda para análise dos flavonoides do extrato foi realizado o monitoramento da faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, por meio do sistema de detecção de arranjos de fotodiodos, e assim foi possível determinar os espectros de absorção no UV de cada pico. Observou-se que todos os flavonoides apresentaram duas bandas de absorção, sendo uma com $\lambda_{\text{máx}}$ entre 240-280 nm e a outra em torno de 300-380 nm, mostrando que os flavonoides presentes na polpa do maracujá são predominantemente da classe das flavonas.²⁷ O comprimento de onda escolhido foi de 330 nm, no qual obteve-se boa sensibilidade para a maioria dos possíveis flavonoides presentes no extrato (Figura 19).

A Figura 19 mostra o cromatograma do extrato de *P. edulis* nas condições cromatográficas otimizadas.

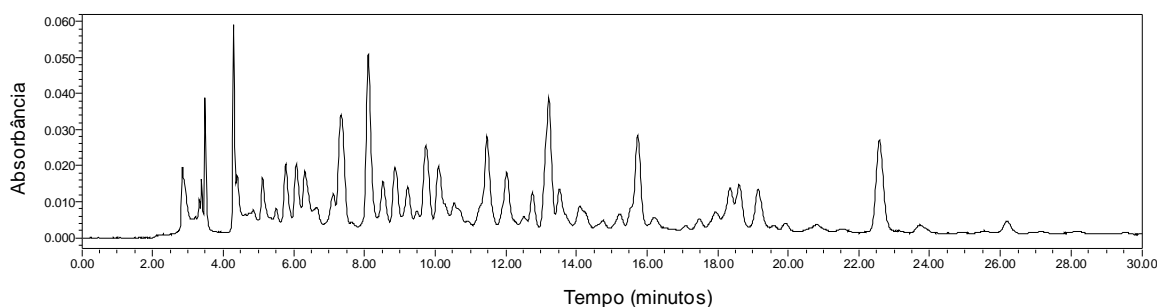


Figura 19. Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm da fração flavonoídica de *P. edulis* obtida por SPE em C_{18} (item 2.3.3). Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B); 0-10 minutos, 12%-16% de B em A e 10-30 minutos, 16-20% de B em A, vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno de $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foram analisados e comparados com as amostras de *Passiflora* os seguintes padrões de flavonoides: rutina (**10**), orientina (**4**), isorientina (**3**), apigenina e luteolina (**8**), nas mesmas condições cromatográficas. Foi encontrado no extrato de *P. edulis* apenas a flavona C-glicosídeo isorientina, baseado na comparação do tempo de retenção e no espectro de UV-Vis/DAD do padrão com o extrato (Figuras 20 e 21).

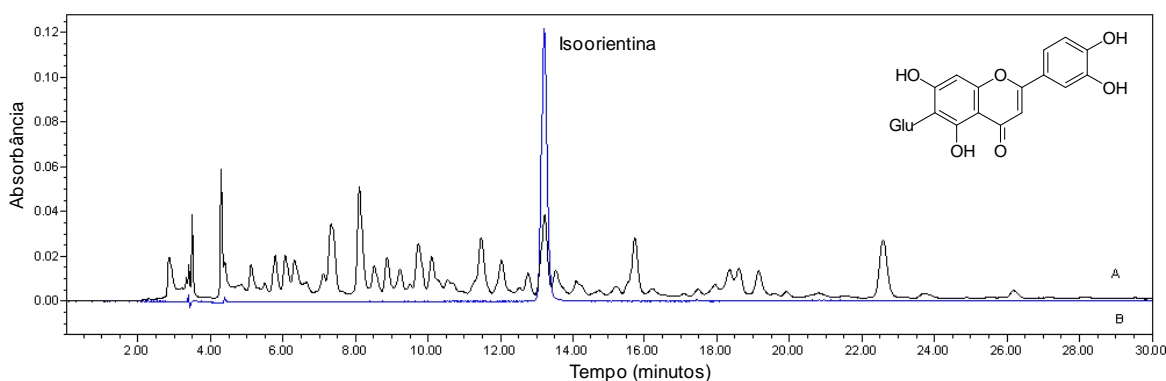


Figura 20. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD ($\lambda = 330$ nm) da fração flavonoídica de *P. edulis*, $t_r = 13,21$ minutos (A) e do padrão isorientina, $t_r = 13,20$ minutos (B).

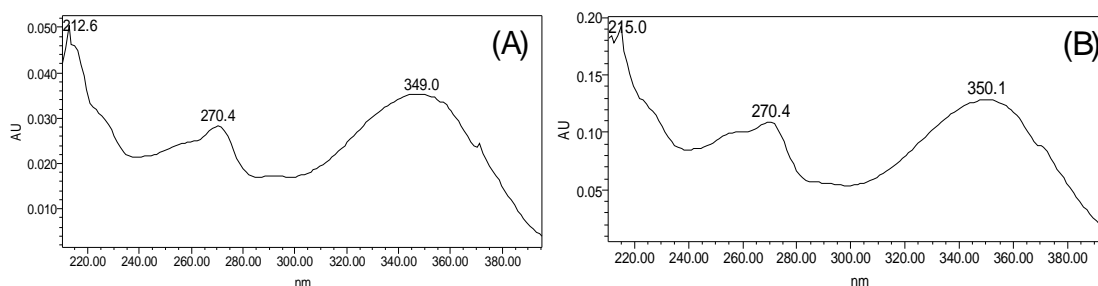


Figura 21. Espectros UV/DAD da fração flavonoídica de *P. edulis*, $t_r= 13,21$ minutos (A) e do padrão isorutinina, $t_r= 13,20$ minutos (B) (cromatograma da Figura 20).

O método desenvolvido e otimizado para *P. edulis* foi aplicado para a análise dos flavonoides de *P. alata*. Observou-se no cromatograma do extrato dos frutos do maracujá doce (Figura 22) que alguns picos apresentam alta absorvância em $\lambda= 330$ nm e boa separação com o gradiente otimizado para o extrato de *P. edulis*.

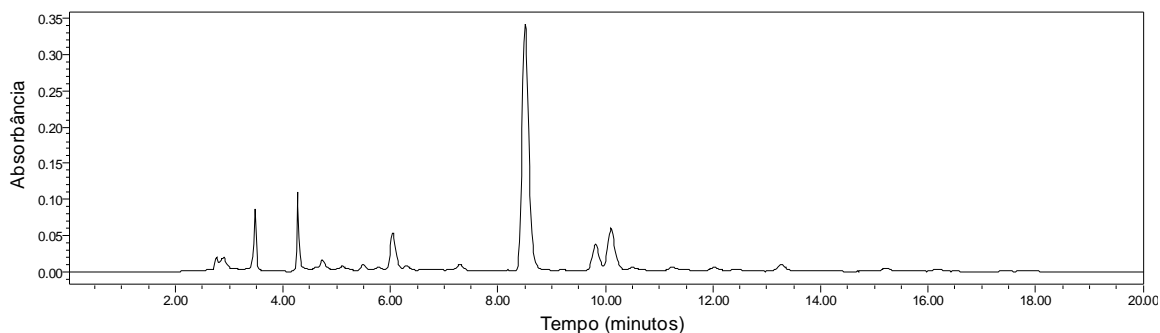


Figura 22. Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda= 330$ nm da fração flavonoídica de *P. alata*. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B); 0-10 minutos, 12%-16% de B em A e 10-30 minutos, 16-20% de B em A, vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno de $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.4.2.3 Análise por CL-EM/EM

A fim de identificar a estrutura de alguns flavonoides presentes na polpa do maracujá e também confirmar a presença de isoorientina em *P. edulis*, identificada por CLAE-UV/DAD (item 2.4.2.2), foram feitas análises por CL-EM/EM.

Inicialmente foram realizadas as análises do extrato total da polpa de *P. edulis* (item 2.3.3) por CL-EM, com energia de colisão de 2,0 eV, no modo de ionização negativo, obtendo-se assim o cromatograma do íon total (TIC) (Figura 23).

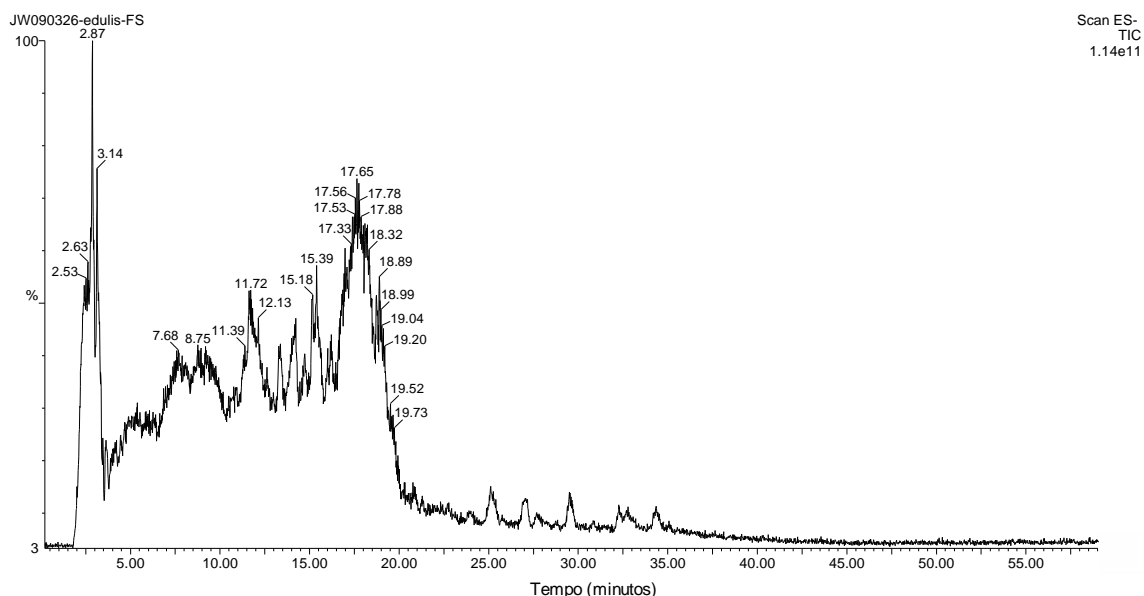


Figura 23. Cromatograma do íon molecular (TIC) do extrato total de *P. edulis* obtido por CL-EM, ionização eletrospray, modo negativo. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A), 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B). Demais condições cromatográficas descritas no item 2.4.2.2.

O cromatograma da Figura 23 mostra a complexidade da amostra e a dificuldade de separação dos picos. Por isso, foi realizado o processo de extração de flavonoides de *P. edulis* através da partição líquido-líquido, e as três frações obtidas a partir da extração sequencial com éter dietílico, acetato de etila e n-butanol (item 2.3.5) foram analisadas por CL-EM. Verificou-se que a fração obtida com

acetato de etila apresentou maior quantidade de flavonoides, conforme observado por CCD (item 2.4.2.1), assim foi realizada a análise deste extrato obtendo-se o TIC desta fração (Figura 24).

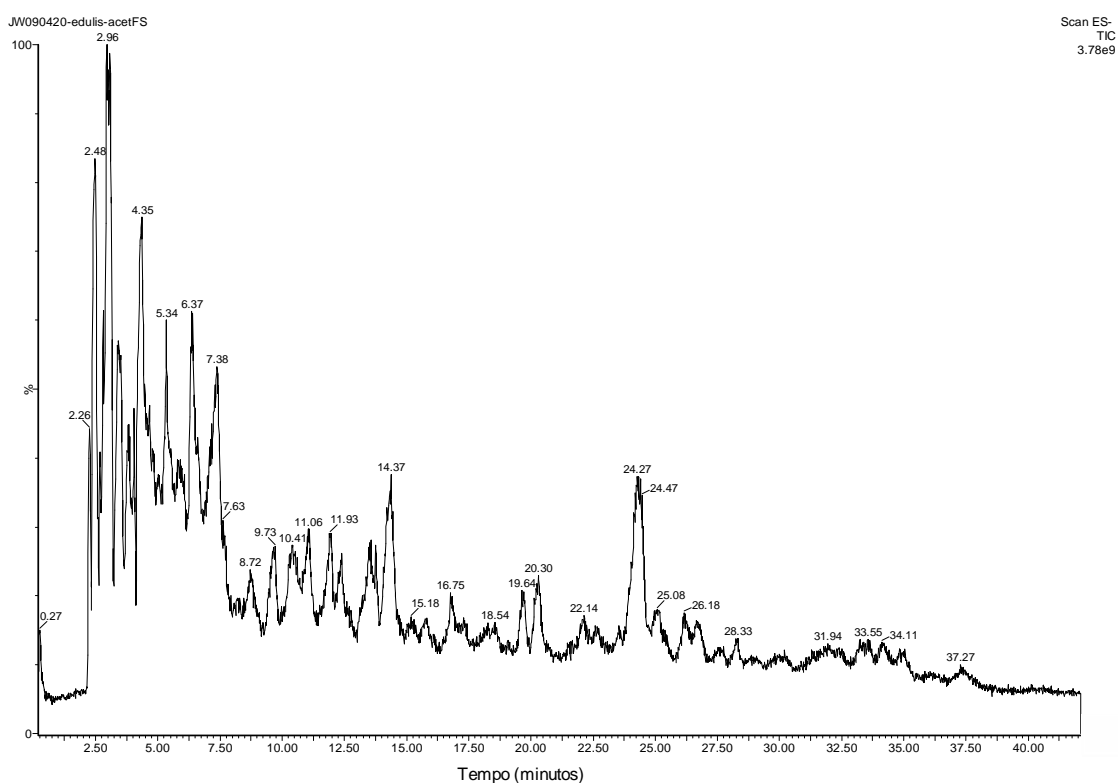


Figura 24. Cromatograma do íon total (TIC) da fração acetato de etila de *P. edulis* obtido por CL-EM, ionização eletrospray, modo negativo. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A), 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B). Demais condições cromatográficas descritas no item 2.4.2.2.

Foram comparados os cromatogramas da fração da polpa de *P. edulis* com vários padrões de flavonoides: luteolina (**8**), apigenina, orientina (**4**), isoorientina (**3**), vitexina e isovitexina (**5**). Verificou-se similaridade entre os tempos de retenção, espectros no UV e cromatogramas com seleção dos íons *quasi*-moleculares $[M-H]^-$ (moléculas desprotonadas) correspondentes aos padrões isoorientina ($m/z= 447$) e isovitexina ($m/z= 431$) (Figura 25).

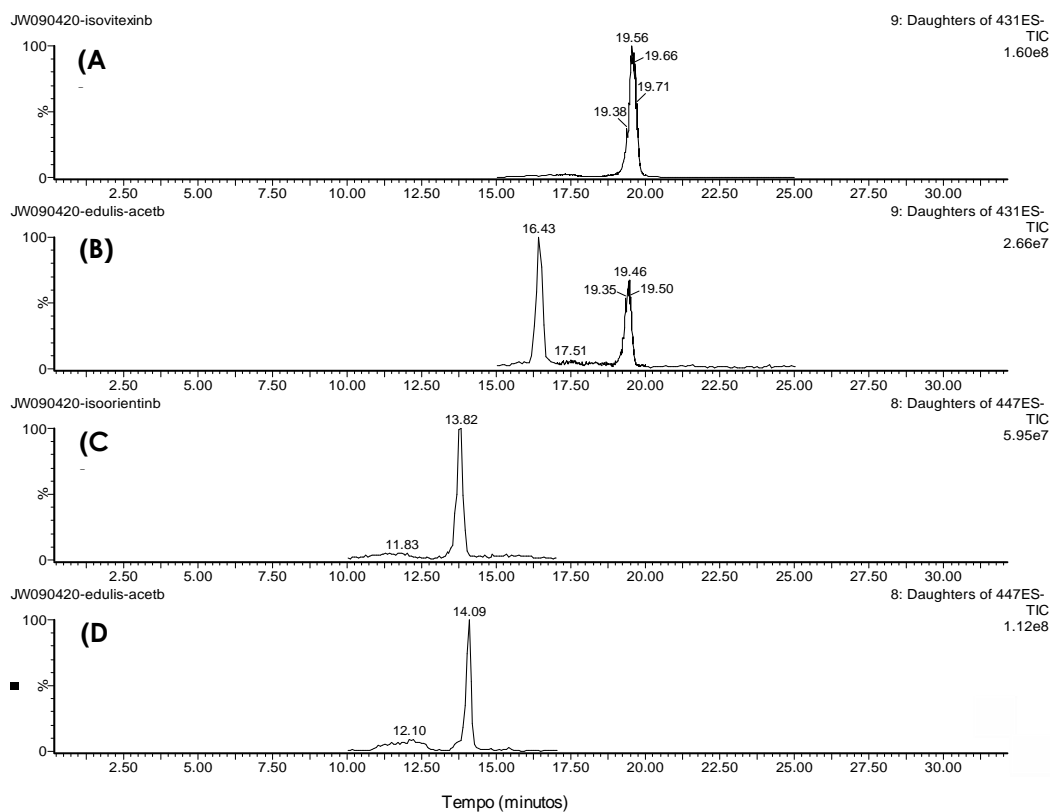


Figura 25. Cromatograma de massas (A) do íon m/z 431 do padrão de isovitexina, (B) do íon m/z 431 da fração acetato de etila de *P. edulis*, (C) do íon m/z 447 do padrão de isorientina, (D) do íon m/z 447 da fração acetato de etila de *P. edulis*.

Para confirmação da presença dos flavonoides isorientina e isovitexina na fração da polpa de *P. edulis* foram analisadas as fragmentações destes padrões e de alguns picos selecionados do cromatograma (TIC) por CL-EM/EM, através da técnica de dissociação induzida por colisão (DIC) (Figura 26).

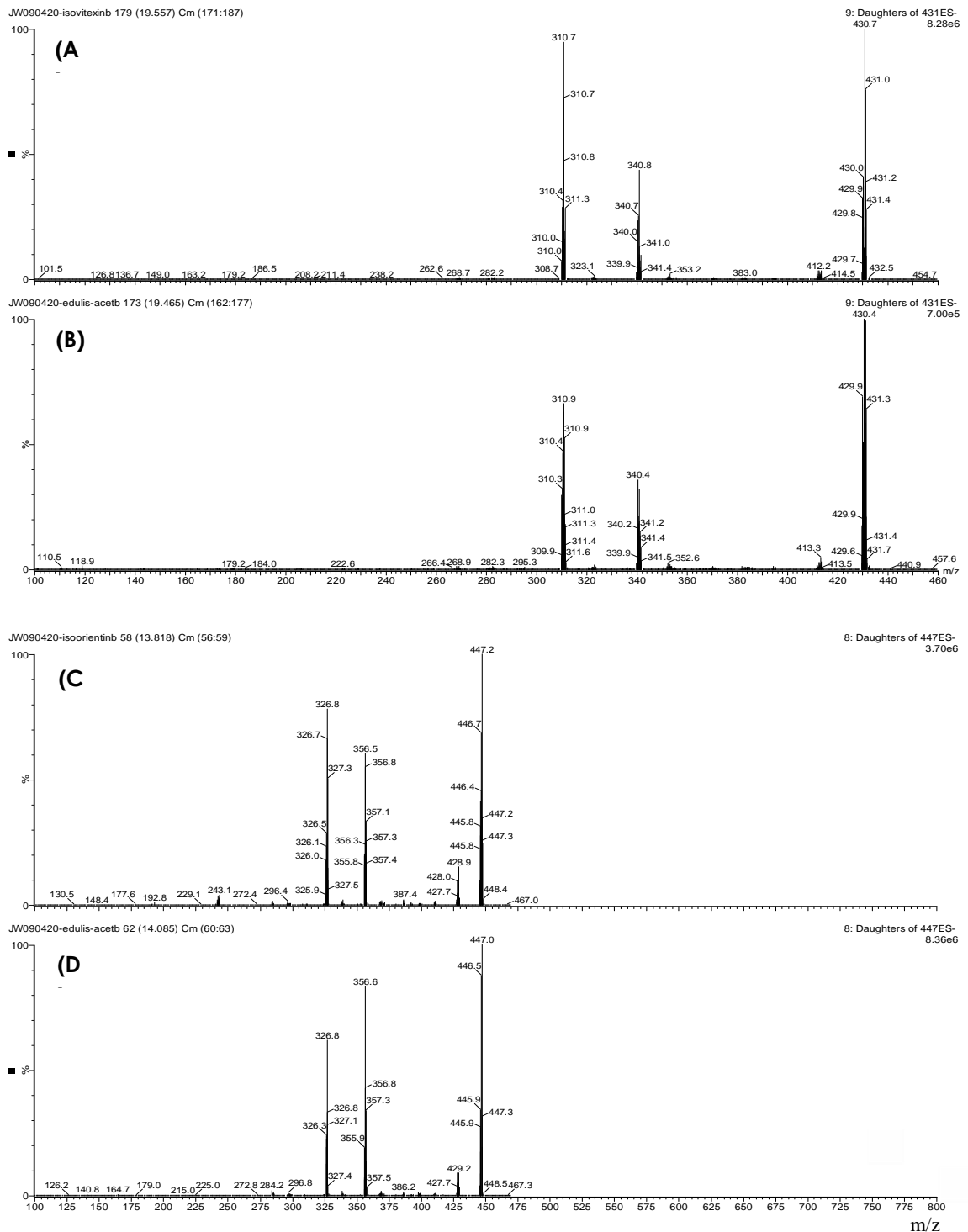


Figura 26. Espectros CL-EM/EM, ionização eletrospray, modo negativo, energia de colisão 18,0 eV: (A) do íon m/z 431 do padrão de isovitexina, (B) do íon m/z 431 do pico de $t_r = 19,46$ minutos da fração de *P. edulis* (Fig. 12), (C) do íon m/z 447 padrão isoorientina, (D) do íon m/z 447 do pico de $t_r = 14,09$ minutos de m/z 447 da fração de *P. edulis* (Fig. 22).

Constatou-se que os fragmentos dos picos de $t_r = 19,46$ e $t_r = 14,09$ minutos da fração de *P. edulis* são característicos das flavonas isovitexina e isoorientina, respectivamente. Estas flavonas já foram relatadas na literatura presentes nas folhas³² e frutos¹⁶ de *P. edulis*. A isovitexina apresenta o íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ em m/z 431 e os fragmentos mais abundantes $[M-H-90]^-$ com m/z 341 e $[M-H-120]^-$ com m/z 311. Já a flavona isoorientina apresenta o íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ em m/z 447 e os fragmentos mais abundantes $[M-H-90]^-$, m/z 357 e $[M-H-120]^-$, m/z 327, ambos originados da fragmentação do açúcar (glucose).

A rota de fragmentação proposta para os padrões de isovitexina e orientina está de acordo com a literatura^{33,34} (Figura 27).

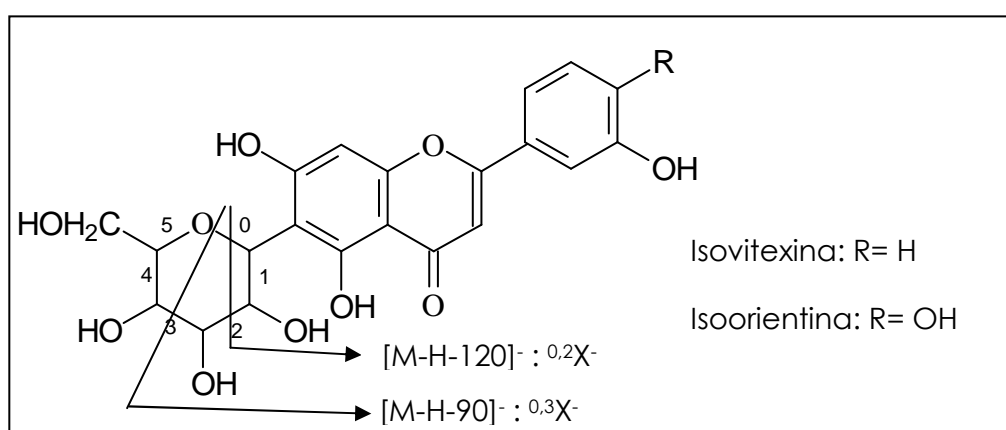


Figura 27. Caminhos de fragmentação para as flavonas isovitexina e isoorientina.

A fração acetato de etila do extrato de polpa de *P. alata* (Figura 28) também foi analisada e comparada com padrões de flavonoides por CL-EM/EM, porém não foi encontrado nenhum destes flavonoides no extrato e verificou-se somente a presença de alguns ácidos orgânicos, como o ácido málico (Figura 29).

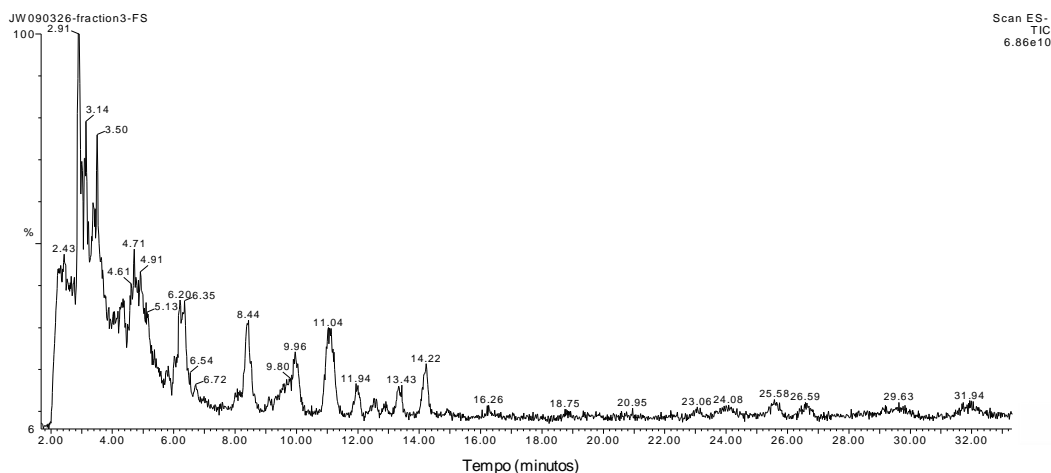


Figura 28. Cromatograma do íon total (TIC) da fração acetato de etila de *P. alata* obtido por CL-EM, ionização eletrospray, modo negativo. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A), 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B). Demais condições cromatográficas descritas no item 2.4.2.2.

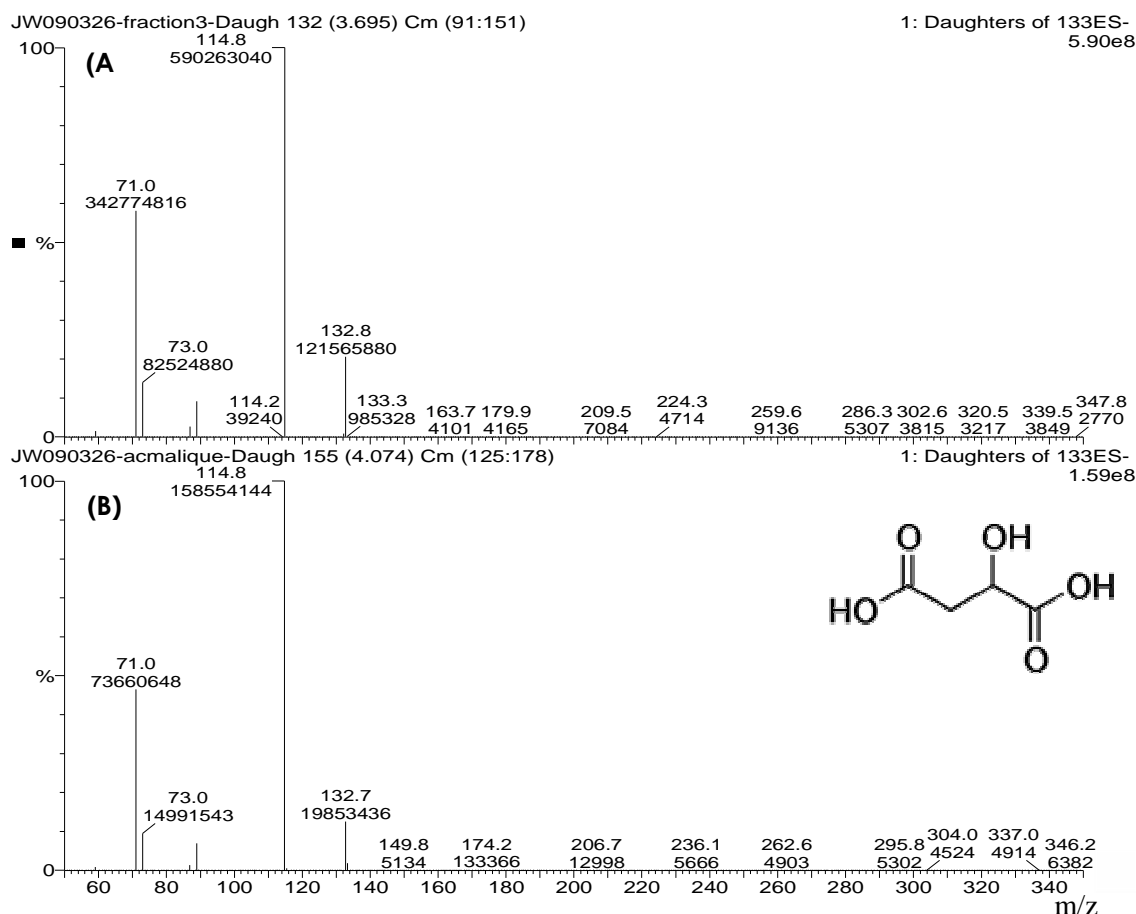


Figura 29. Espectros CL-EM/EM obtido com ionização eletrospray e modo negativo, energia de colisão de 18,0 eV: (A) do íon m/z 133 do pico de $t_r = 3,70$ minutos da fração de *P. alata*, (B) do íon m/z 133 do padrão de ácido málico.

Observou-se através da fragmentação (CL-EM/EM) do pico de $t_r = 3,70$ minutos da fração de *P. alata* os fragmentos característicos do ácido málico, que apresenta o íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ em m/z 133 e os fragmentos mais abundantes $[M-H-H_2O]^-$ com m/z 115, $[M-H-60]^-$ m/z 73 e $[M-H-62]^-$ m/z 71, com as abundâncias relativas de 100%, 10% e 50%, respectivamente.³⁵

2.4.3 Validação do método cromatográfico (CLAE)

O método otimizado para análise CLAE-UV/DAD de *P. edulis* (itens 2.4.1 e 2.4.2.2, Figura 18) foi validado segundo os protocolos da ICH¹⁵, os quais estabelecem os seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.

2.4.3.1 Especificidade

O pico cromatográfico da flavona isoorientina presente no extrato de *P. edulis* foi analisado por meio dos espectros UV/DAD obtidos em diferentes regiões do pico, que mostraram grande similaridade entre si, comprovando assim não haver co-eluição de interferentes (Figura 30).

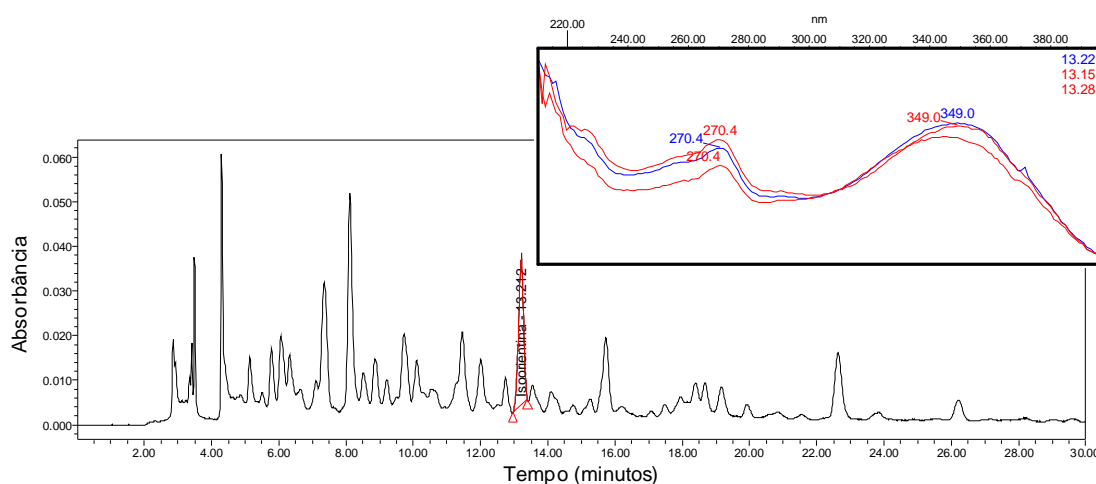


Figura 30. Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm da fração flavonoídica de *P. edulis* e espectro UV/DAD obtido em três diferentes regiões do pico de isoorientina ($t_r = 13,21$ minutos).

O mesmo procedimento foi realizado para todos os picos considerados na quantificação dos flavonoides totais e os espectros se apresentaram similares em

diferentes regiões do mesmo pico; houve a coeluição entre alguns possíveis flavonoides, o que não interferiu na quantificação de substâncias totais.

2.4.3.2 Linearidade

Foram escolhidos os padrões de isoorientina (presente na polpa de *P. edulis*) para a validação do método específico para esse flavonoide, e a rutina como padrão do método para quantificação de flavonoides totais (Figura 31). A rutina é um flavonol O-glicosídeo e apesar de não estar presente no extrato, é de fácil acesso e baixo custo: 5,0 mg de isoorientina tem um custo em torno de R\$ 270,00, enquanto que a mesma quantidade de rutina custa R\$ 0,04, sendo portanto viável para uso rotineiro em controle de qualidade.

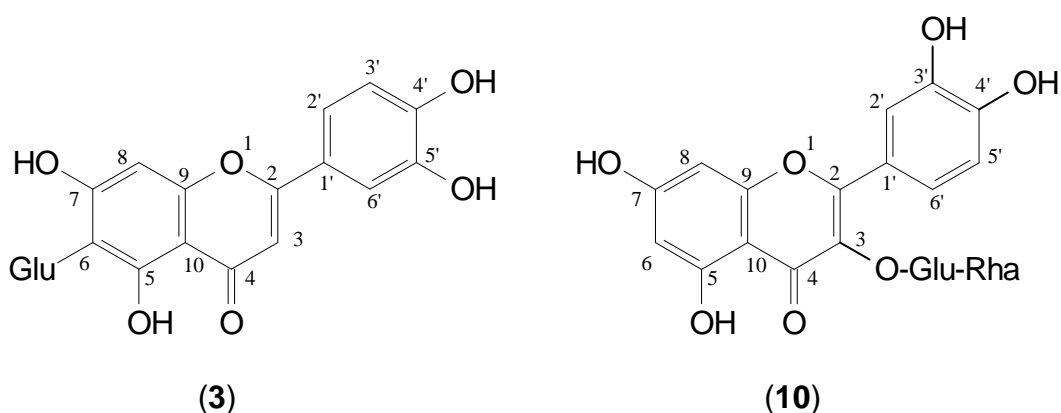


Figura 31. Estrutura dos flavonoides: (3) isoorientina, (10) rutina; Glu: glucose; Rha: ramnose.

A quantificação da flavona isoorientina na polpa dos frutos de *P. edulis* foi feita por meio do método de adição de padrão, que consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse a quantidades conhecidas da amostra.¹⁰ A quantificação de flavonoides totais foi feita por meio do método de padrão externo: neste método compara-se a área da substância a ser quantificada

na amostra com as áreas obtidas utilizando-se soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão.¹⁰ A linearidade do método foi determinada a partir de regressão linear das curvas analíticas construídas em triplicata e em 5 níveis de concentração.

Foram construídas também curvas analíticas com o padrão isoorientina em metanol 80% (sem a presença da matriz) nas concentrações de 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 mg L⁻¹ para verificação do efeito de matriz (Figura 32). Comparando-se as duas curvas analíticas verificou-se que elas não são perfeitamente paralelas, ou seja, há interferência da matriz na determinação da isoorientina, justificando assim, a escolha pelo método de adição de padrão para sua quantificação, devido à complexidade da amostra.

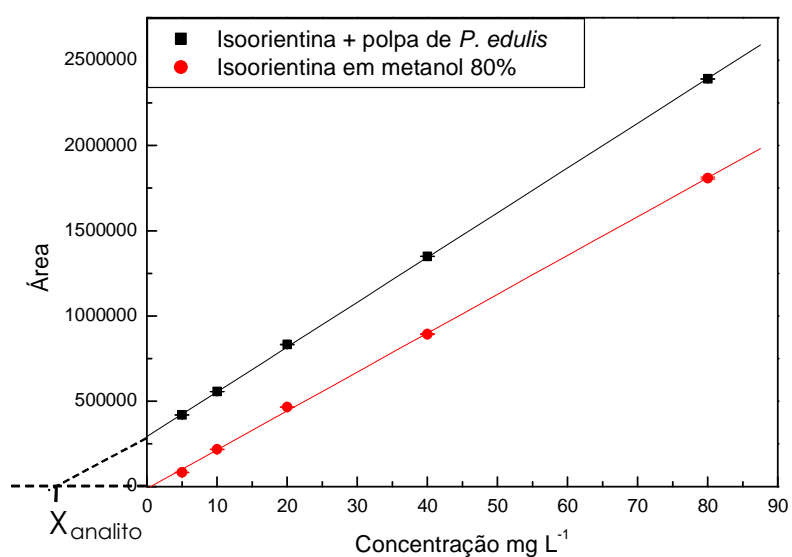


Figura 32. Curvas analíticas obtidas por diferentes métodos: adição de padrão (preto) e padrão externo (vermelho); $X_{analito}$ representa a concentração do analito na amostra.

A Figura 33 mostra a curva analítica construída utilizando o padrão rotina, para a quantificação dos flavonoides totais da polpa do maracujá por meio do método do padrão externo.

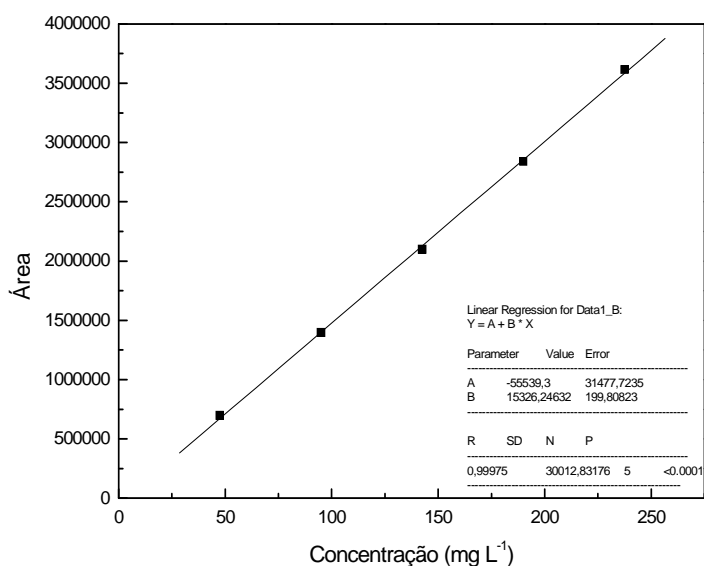


Figura 33. Curva analítica de rutina em metanol 80%.

A Tabela 5 apresenta as equações das curvas analíticas dos padrões, calculadas pelo método dos mínimos quadrados e também os coeficientes de correlação (r), que apresentaram valores superiores a 0,99, indicando grande correlação linear entre a concentração da substância e a área dos picos, comprovando assim a linearidade dos métodos nas faixas escolhidas.

Tabela 5. Parâmetros referentes às curvas analíticas dos padrões

Padrão	Concentração real (mg L ⁻¹) *	Área média	Equação da reta (y = a + bx)	Coeficiente de correlação (r)
Isoorientina (adição de padrão)	4,95	419971	y = 297697,9+ 26210,0 x	0,99995
	9,90	557279		
	19,8	833119		
	39,6	1350130		
	79,2	2390537		
Rutina (padrão externo)	47,5	695169	y = -55539,3+ 15326,2 x	0,99975
	95,0	1397039		
	142,5	2096714		
	190,0	2839320		
	237,5	3614012		

* Valores corrigidos considerando a pureza dos padrões: rutina 95% e isoorientina 99%.

2.4.3.3 Exatidão

A exatidão é determinada pela medida de quão próximo o valor experimental está do valor verdadeiro; para isto, foram adicionadas ao extrato quantidades conhecidas de solução-estoque do padrão de isoorientina no início da extração, para obter-se três níveis de concentração (baixo, intermediário e alto). Este ensaio foi repetido com adição do padrão rutina também em três níveis de concentração. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação do padrão, sendo o procedimento realizado em triplicata para cada concentração (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados dos ensaios de exatidão para os extratos de *P. edulis* fortificados com padrões de flavonoides

Padrão	Concentração final (mg L ⁻¹)	Exatidão (%) (n = 3)	Desvio Padrão Relativo (DPR %)
Isoorientina	20,0	87,04	0,65
	45,0	90,22	0,32
	70,0	91,13	0,78
Rutina	70,0	86,22	0,11
	150,0	84,10	0,25
	250,0	87,67	0,16

Pode-se observar que as recuperações estão entre 84 a 91%, estando dentro do intervalo aceitável de recuperação (70-120%),¹⁰ mostrando assim a exatidão dos dois métodos.

2.4.3.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos de uma mesma amostra; esta precisão é subdividida em repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada mediante 9 determinações em um mesmo dia, ou seja, com a adição de padrão à amostra em 3 concentrações diferentes, cada um em triplicata. A precisão intermediária foi avaliada verificando a concordância entre os resultados obtidos em 3 dias diferentes, porém com o mesmo equipamento e analista, e os resultados foram expressos em termos de desvio padrão relativo (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados dos ensaios de precisão para os extratos de *P. edulis* fortificados com padrões de flavonoide

Padrão	Concentração (mg L ⁻¹)	Repetibilidade	Precisão intermediária
		(mesmo dia, n= 9) DPR (%)	(3 dias diferentes, n=3) DPR (%)
Isoorientina	20,0	0,65	3,43
	45,0	0,32	2,32
	70,0	0,78	3,81
Rutina	70,0	0,11	2,25
	150,0	0,25	2,02
	250,0	0,16	3,73

DPR= Desvio Padrão Relativo

Todos os valores de DPR na repetibilidade e precisão intermediária foram abaixo de 5%, que é o valor preconizado pelos protocolos do ICH,¹⁵ e portanto os dois métodos foram considerados precisos.

2.4.3.5 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O LOD e LOQ foram estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes dos padrões na faixa de 1,0 a 0,1 mg L⁻¹. O critério adotado para o LOD foi a razão entre a altura do sinal e do ruído de 3:1 e para o LOQ esta razão foi de 10:1. Também foram realizados os cálculos considerando a massa molar dos padrões (Tabela 8).

Tabela 8. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) das soluções padrão *

Padrão	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	LOD (mmol L ⁻¹)	LOQ (mmol L ⁻¹)
Isoorientina	0,10	0,40	2,23.10 ⁻⁴	8,92.10 ⁻⁴
Rutina	0,14	0,57	2,29.10 ⁻⁴	9,34.10 ⁻⁴

* Isoorientina (MM= 448,38 g mol⁻¹) e rutina (MM= 610,50 g mol⁻¹).

Pode ser observado na Tabela 8 que os valores em mmol L⁻¹ dos LOD e LOQ dos padrões estão bem próximos. Os valores de áreas de picos dos flavonoides abaixo do LOQ não foram utilizados na quantificação dos flavonoides totais dos extratos.

2.4.4 Análise quantitativa dos extratos de *Passiflora*

2.4.4.1 Quantificação da isoorientina

A concentração de isoorientina nos extratos de *P. edulis* foi obtida por meio do método de adição de padrão, e a média do valor encontrado foi de $16,226 \pm 0,050 \text{ mg L}^{-1}$ (correspondente a $0,036 \pm 0,001 \text{ mmol L}^{-1}$). Observou-se também que o pico da flavona isoorientina apresenta a maior área, cerca de 19% dos flavonoides totais.

2.4.4.2 Quantificação dos flavonoides totais

Por meio do método do padrão externo, utilizando o padrão rutina, foi realizada a quantificação dos flavonoides totais na polpa dos frutos de *P. edulis* (Figuras 34 a 36) e *P. alata* (Figuras 37 a 39).

Os picos dos possíveis flavonoides das duas espécies estudadas foram identificados por seus espectros no UV devido às duas bandas de absorção características, uma com $\lambda_{\text{máx}}$ entre 240-280 nm e a outra banda em torno de 300-380 nm.²⁷ Através dos cromatogramas obtidos por CLAE ($\lambda = 330 \text{ nm}$) foram comparadas as áreas dos picos dos flavonoides das duas espécies com as áreas das soluções de concentrações conhecidas do padrão.

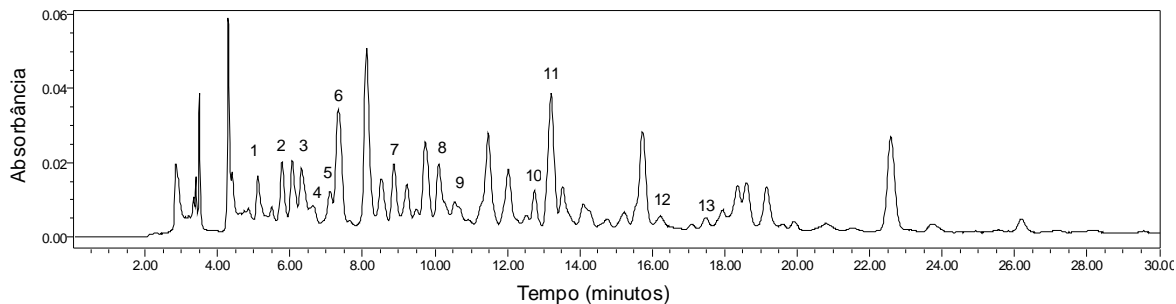


Figura 34. Cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm da fração flavonoídica de *P. edulis*. Os picos numerados foram identificados como possíveis flavonoides.

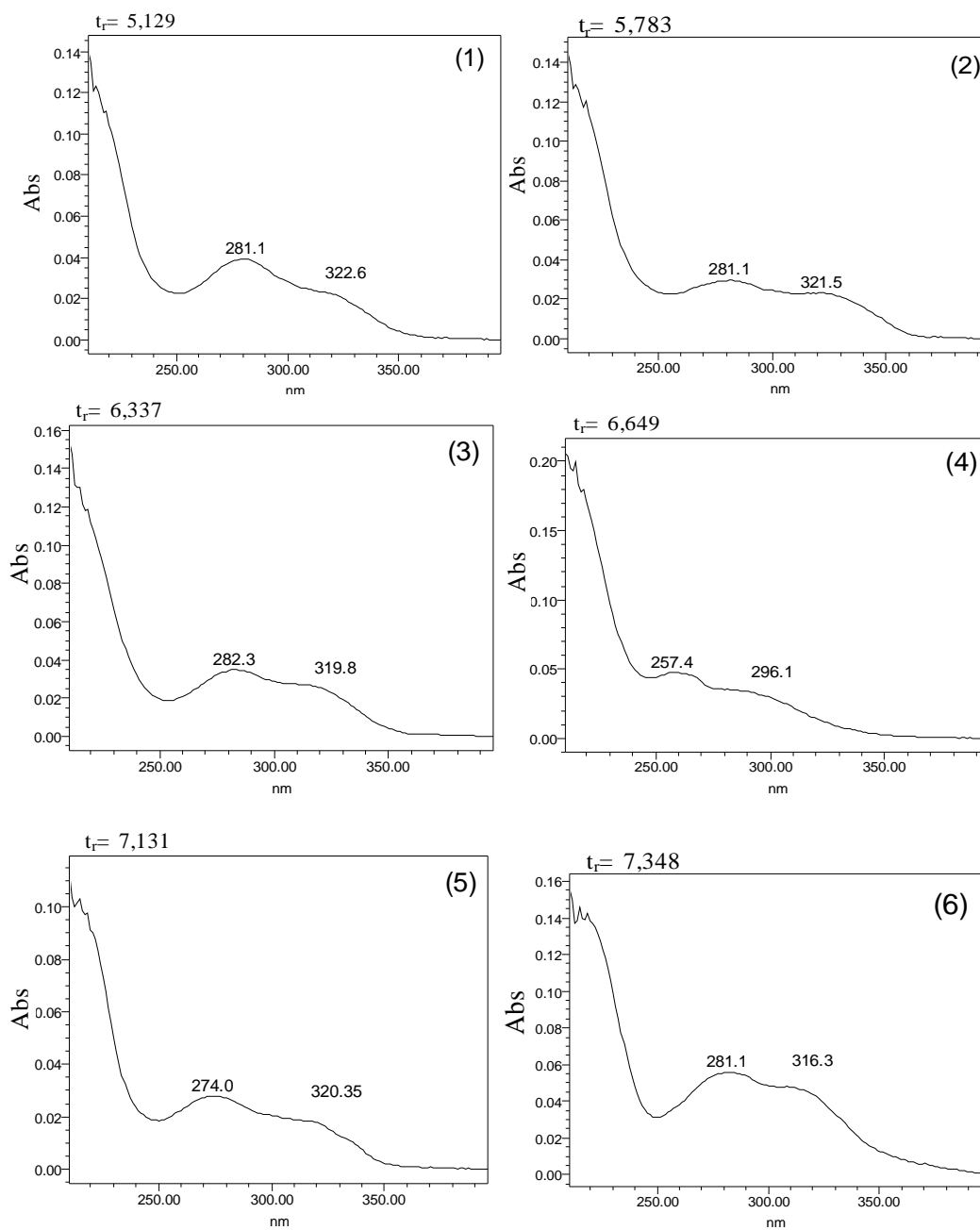


Figura 35. Espectros UV/DAD correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 34.

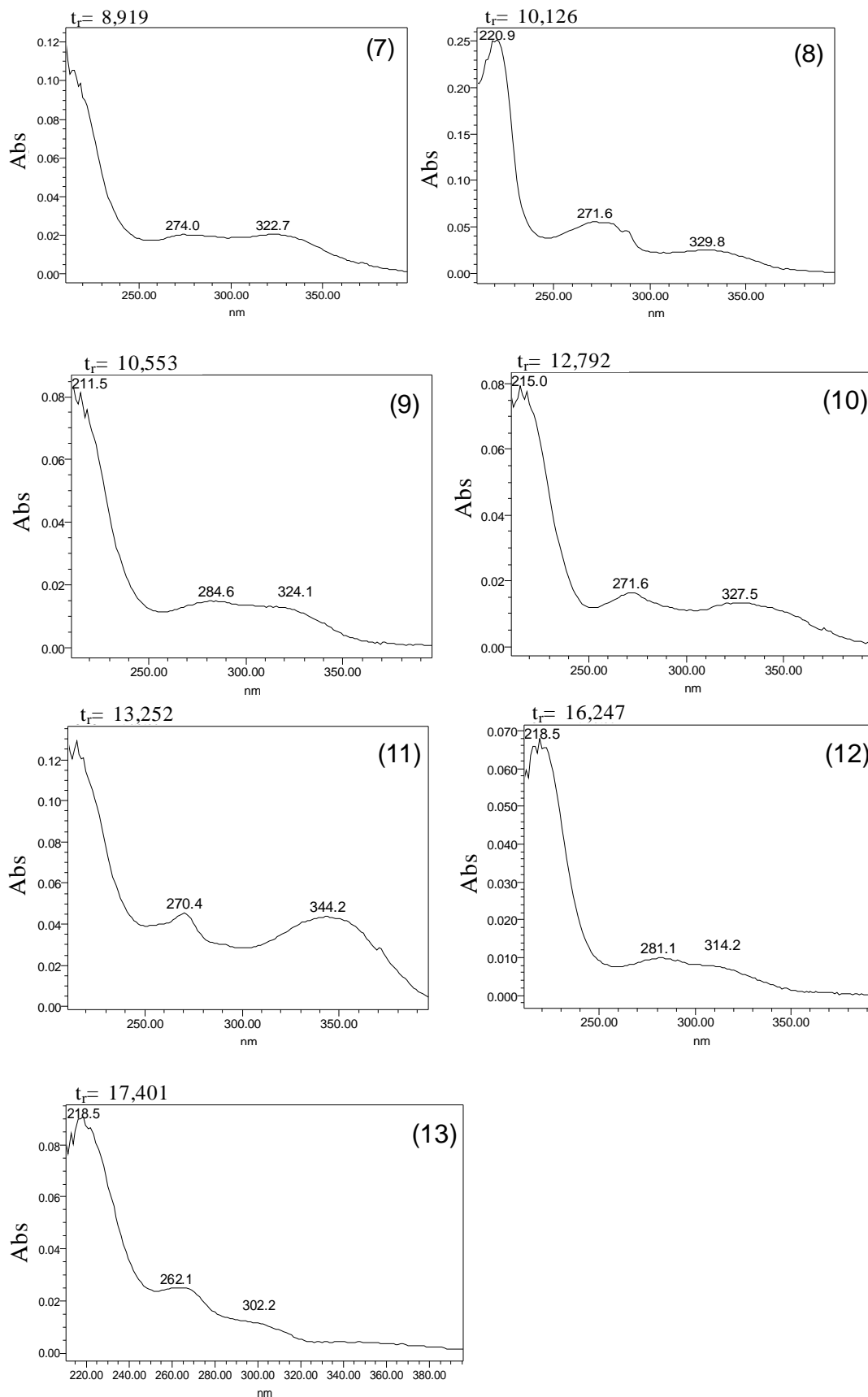


Figura 36. Espectros UV/DAD correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 34 (continuação).

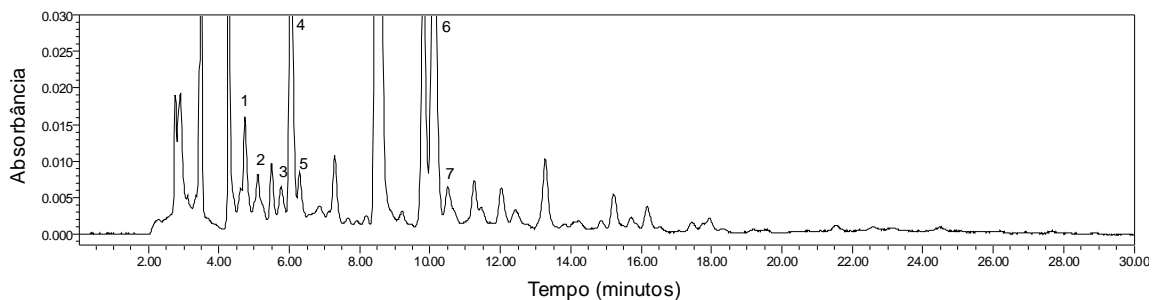


Figura 37. Ampliação do cromatograma (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm da fração flavonóidica de *P. alata*. Picos de possíveis flavonoides numerados de 1 a 7.

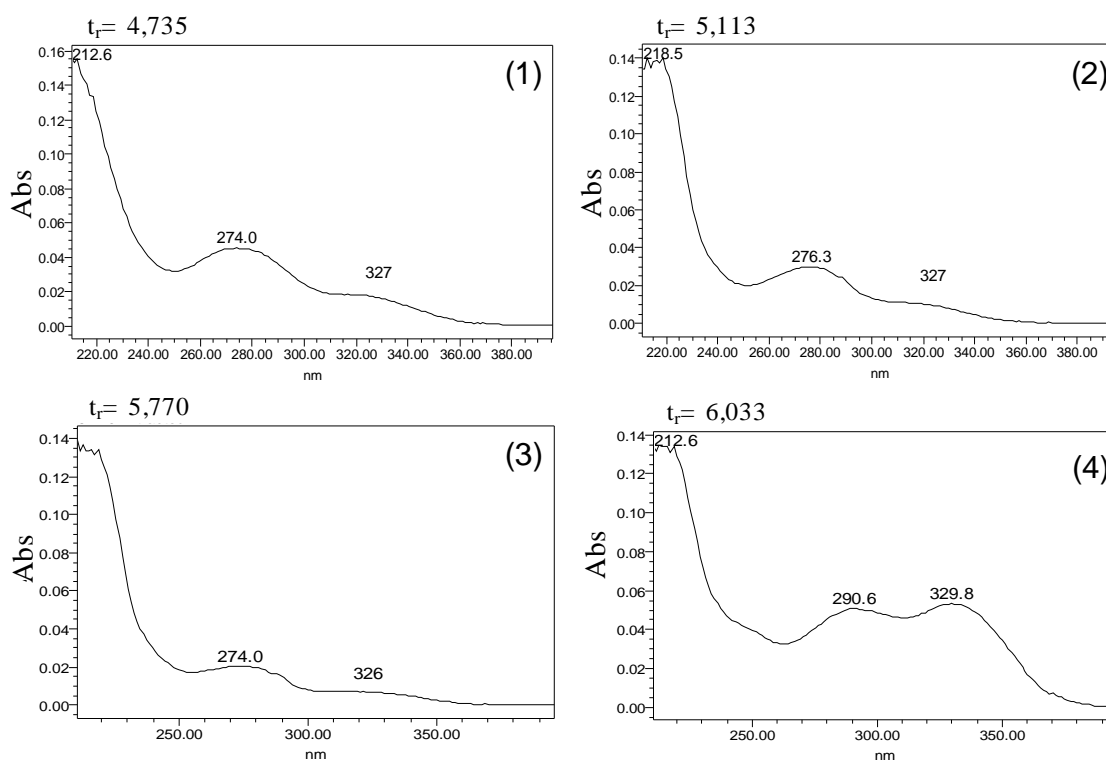


Figura 38. Espectros UV/DAD correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 37.

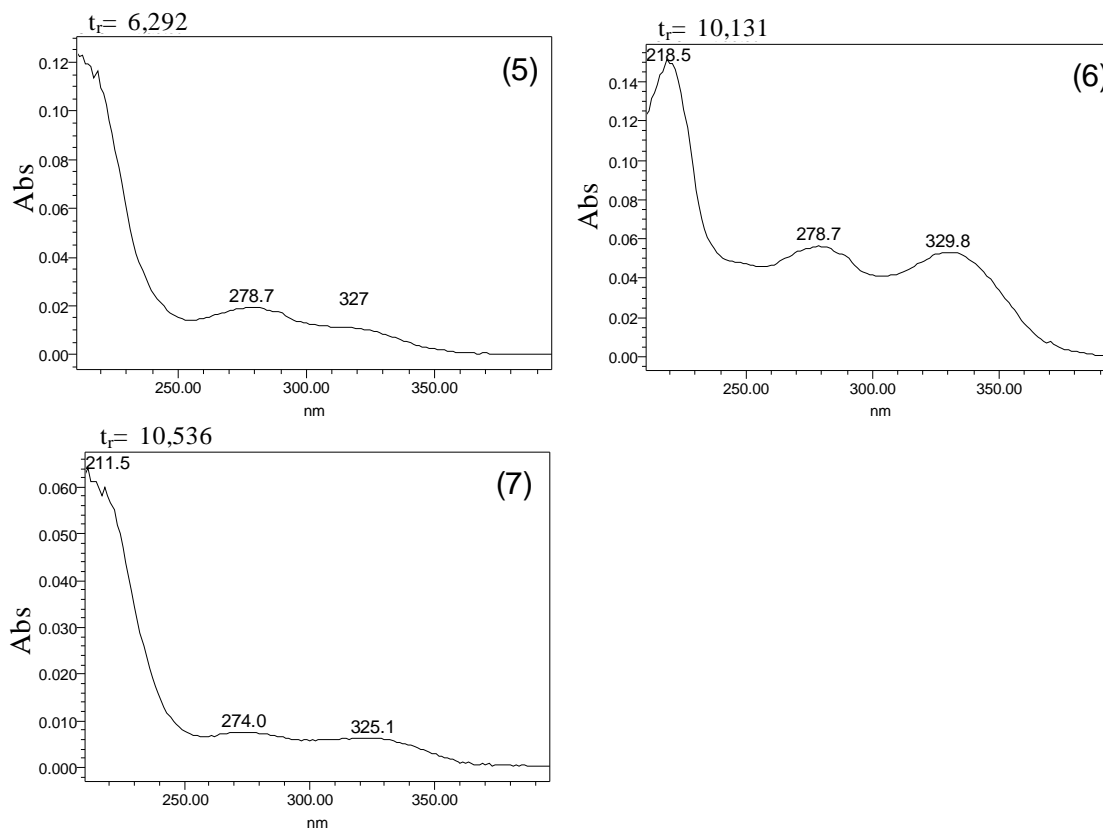


Figura 39. Espectros UV/DAD correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 37 (continuação).

As quantificações foram realizadas em triplicata e os flavonoides totais foram expressos em mg L^{-1} e mmol L^{-1} de rutina (Tabela 9). Foi também realizado o teste-*t* de Student ao nível de confiança de 95%, observando-se que não há diferença significativa para duas amostras de uma mesma espécie, ou seja, alíquotas armazenadas em frascos diferentes (*P. edulis* 1 e *P. edulis* 2).

Tabela 9. Determinação quantitativa por CLAE-UV/DAD dos flavonoides de duas espécies de *Passiflora**

Amostras	Flavonoides totais expressos em rutina	
	(mg L ⁻¹) ± d.p.	(mmol L ⁻¹) ± d.p.
<i>P. edulis</i> 1	158,04 ± 0,60 ^a	0,2589 ± 0,0009 ^b
<i>P. edulis</i> 2	157,24 ± 0,37 ^a	0,2576 ± 0,0006 ^b
<i>P. alata</i> 1	94,68 ± 0,06 ^c	0,1551 ± 0,0001 ^d
<i>P. alata</i> 2	94,76 ± 0,08 ^c	0,1552 ± 0,0001 ^d

* Amostras 1 e 2 = alíquotas armazenadas em frascos diferentes; n= 3, d.p.= desvio padrão
^{a,b,c,d} Pares são estatisticamente idênticos ao nível de confiança de 95%

Os dados da Tabela 9 mostram que a quantidade de flavonoides totais na amostra de *P. edulis* é maior do que em *P. alata*. Além disso, a polpa das duas espécies apresentaram quantidades de flavonoides comparáveis a outros alimentos como p. ex., a garapa que, segundo a literatura,³⁶ apresenta 0,241± 0,001 mg de flavonoides totais (expressos em diosmina/mL de suco), correspondente a 0,396 mmol L⁻¹.

2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

O método desenvolvido e validado por CLAE-UV/DAD mostrou-se adequado e confiável para a análise quantitativa da flavona isoorientina na polpa dos frutos de *P. edulis* e para a quantificação de flavonoides totais, utilizando o padrão rutina (como alternativa de baixo custo) nos extratos da polpa das espécies *P. edulis* e *P. alata*.

Os parâmetros analíticos avaliados mostraram que o método possui boa especificidade, linearidade na faixa escolhida, exatidão e precisão dentro dos limites aceitos, além de LOD e LOQ que indica a eficiência do método na quantificação de flavonoides em concentração mínima em torno de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$.

Verificou-se que a quantidade de flavonoides totais encontrada na polpa de *P. edulis* (a espécie de maracujá mais consumida no Brasil) é significativa e comparável a outros alimentos como o maracujá doce (*P. alata*) e a garapa. Além disso, foram identificadas as flavonas isoorientina e isovitexina na polpa de *P. edulis*, flavonas muito importantes por apresentarem diversas atividades farmacológicas.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da Unicamp, 2002. 401 p.
2. FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; BEZERRA, M. A.; LEMOS, V. A.; SENDRA-BOSQUE, J. M. Use of factorial design and Doehlert matrix for multivariate optimisation of an on-line preconcentration system for lead determination by flame atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 3, p. 443–449, 2003.
3. BANDEIRA, K. F.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Optimisation of conditions for the extraction of casearins from *Casearia sylvestris* using response surface methodology. **Phytochemical Analysis**, v. 17, n. 3, p. 168-175, 2006.
4. GARDA, J.; BADIALE-FURLONG, E. Otimização de metodologia para derivação de desoxinivalenol através de planejamento fatorial. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 270-274, 2008.
5. BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento experimental e análises de resultados**. Campinas: FEM, 2005 /Apostila/.
6. BRERETON, R. G. **Chemometrics**: data analysis for the laboratory and chemical plant. New York: John Wiley, 2003. 498 p.
7. PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 246-253, 2002.
8. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
9. MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.
10. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

11. PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação em métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.
12. CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADOR, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.
13. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: Editora da UFSCar, 2001. 77p. /Apostila/.
14. WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9/10, p. 624-632, 1999.
15. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)**, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html>>. Acesso em: 5 out. 2008.
16. MARECK, U.; GALENSA, R.; HERRMANN, K. Identifizierung von Passionsfruchtsaft in fruchtprodukten mittels HPLC. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung**, v. 191, p. 269-274, 1990.
17. PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J. N.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 241-248, 2004.
18. BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG400 – un intéressant réactif de revelation des flavonoïdes. **Journal of Chromatography**, v. 351, n. 2, p. 351-355, 1986.
19. BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Contribution a l'étude pharmacognostique de la *Passiflore*. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 39, n. 1, p. 15-22, 1984.
20. FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul: Editora da UFSC, 2001. p. 165-181.
21. PHARMACOPÉE Française. 10.ed. Paris: Adrapharm, 1980. 1898 p.
22. EUROPEAN Pharmacopoeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1996. Supplement.
23. FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1977. 1213 p.

24. KORN, M.; ANDRADE, M. AV. A. S.; BORGES, S. S. Procedimentos analíticos assistidos por ultra-som. **Revista Analytica**, n. 3, p. 34-39, 2003.
25. KITE, G. C.; PORTER, E. A.; DENISON, F. C.; GRAYER, R. J.; VEITCH, N. C.; BUTLER, I.; SIMMONDS, M. S. J. Data-directed scan sequence for the general assignment of C-glycosylflavone O-glycosides in plant extracts by liquid chromatography-ion. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, n. 1, p. 123-131, 2006.
26. KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.
27. MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic identification of flavonoids**. New York: Springer, 1970. 354 p.
28. VILA, F. C. **Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2006. 68f. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
29. WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2.ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.
30. BIDLINGMEYER, B. A. **Practical HPLC methodology and applications**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 452p.
31. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. 863 p.
32. PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 295-301, 2005.
33. DENG, X.; GAO, G.; ZHENG, S.; LI, F. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in leaves of *Isatis indigatica* Fort. by ultra-performance liquid chromatography with PDA and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 562-567, 2008.
34. MARCHA, R. E.; LEWARS, E. G.; STADEY, C. J.; MIAOB, X. S.; ZHAOB, X.; METCALFE, C. D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 248, p. 61-85, 2006.

35. BYLUND, D.; NORSTROM, S. H.; ESSÉN, S. A.; LUNDSTROM, U. S. Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1176, p. 89-93, 2007.
36. VILA, F. C.; COLOMBO, R.; LIRA, T. O.; YARIWAKE, J. H. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 903-908, 2008.

CAPÍTULO 3- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS FLAVONOIDES DAS CASCAS DE *P. EDULIS*

3.1 INTRODUÇÃO

A CCDAE tornou-se uma técnica de precisão, sensibilidade e reprodutibilidade comparáveis às da CLAE. A CCDAE é considerada uma técnica alternativa à CLAE no campo da padronização de fitoterápicos, sendo muito utilizada principalmente em laboratórios da Europa, apresentando a vantagem de não requerer etapa de *clean-up* nos extratos brutos de plantas, mesmo em análises quantitativas. Além disso, apresenta um baixo consumo de solventes e reagentes, minimizando a quantidade de resíduos gerados, sendo por isso sugerida na elaboração de novos métodos pelas Farmacopeias Americana e Europeia.^{1,2}

Apesar dos avanços da instrumentação e das vantagens que a técnica apresenta, esta ainda é pouco utilizada. Foram encontrados dois trabalhos que relataram o uso da CCDAE em análise qualitativa e quantitativa de flavonoides em espécies de *Passiflora*: o trabalho realizado por Pastene et al. (1997),³ que analisaram quantitativamente os flavonoides da espécie *P. caerulea*, considerando a isoorientina como marcador; e o estudo de Pereira et al. (2004),⁴ que desenvolveram um método por CCDAE para quantificação dos flavonoides das folhas de *P. alata*, *P. edulis*, *P. caerulea* e *P. incarnata*, determinando o conteúdo de orientina e isoorientina destas espécies.

Tanto em CCD quanto em CCDAE, a utilização de reagentes cromogênicos e fluorogênicos é descrita na literatura para análises quantitativas de substâncias presentes em extratos brutos de plantas, e a detecção por fluorescência é preferível

quando possível, devido às vantagens de apresentar alta especificidade e sensibilidade.⁵⁻⁷

O reagente utilizado neste trabalho para a análise de flavonoides do maracujá por CCDAE foi o NP/PEG 400. Segundo a literatura,^{8,9} a medida de fluorescência emitida por flavonas *in situ* em placas de CCDAE pode ser melhorada com a utilização de reveladores específicos, como o NP/PEG 400. O NP/PEG é amplamente descrito na literatura para revelação de flavonoides,^{3,10,11} inclusive pela Farmacopeia Europeia,¹² e permite a distinção das diferentes classes de flavonoides, pois a coloração da fluorescência dos produtos fornece informações sobre a natureza da aglicona.¹¹ Quando a placa cromatográfica é colocada em contato com o revelador e exposta a $\lambda = 360$ nm, os flavonóides fluorescem, emitindo diferentes cores, dependentes da estrutura. Este revelador é muito utilizado devido à sua sensibilidade e especificidade que é aumentada pelo polietilenoglicol 400 (PEG 400), intensificando a fluorescência das substâncias; após a utilização do PEG 400 deve-se esperar pelo menos 30 minutos para analisar a placa, pois só após este tempo é que a intensidade total da fluorescência se desenvolve.^{13,14}

A correlação entre a estrutura e a fluorescência dos flavonoides é descrita em detalhes por Homberg & Geiger (1980)¹⁵. O ganho de fluorescência após a aplicação do revelador é determinada pela natureza, número e posição dos substituintes dos flavonoides.¹³ A Figura 40 mostra uma das hipóteses propostas para a formação do complexo que apresenta a fluorescência característica dos flavonoides derivatizados.¹⁰

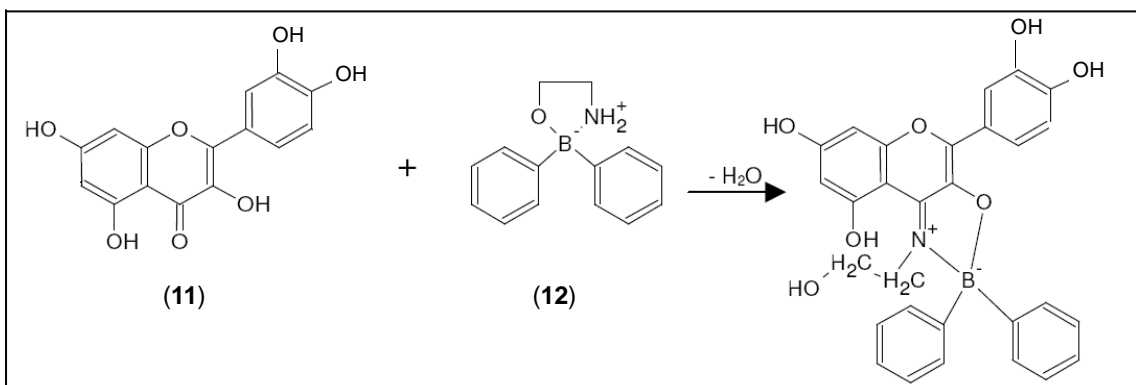


Figura 40. Reação de derivatização do flavonoide quercetina (11) com o éster 2-aminoetilico do ácido difenilbórico (12).

Devido à complexidade dos extratos estudados primeiramente por CLAE-UV/DAD, e também em busca de uma técnica alternativa com baixa produção de resíduos, foram realizadas as análises dos flavonoides do maracujá por CCDAE em parceria com o Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie, da Université de Liège, Bélgica, sob a supervisão do Prof. Dr. Luc Angenot.

3.2 OBJETIVOS

Os objetivos desta parte do trabalho foram a identificação e quantificação da flavona isoorientina, presente nas cascas de *P. edulis*, por CCDAE e análise densitométrica. Para isso, foi realizada a adaptação do método validado desenvolvido pela Dr. Cintia Pereira⁴ para quantificação dos flavonoides das folhas de *P. edulis*.

As amostras de cascas analisadas por CCDAE foram também analisadas por CLAE-UV/DAD, conforme método desenvolvido e validado para a polpa do maracujá (capítulo 2), a fim de verificar a aplicabilidade do método para outras partes dos frutos.

Além disso, foi realizada a comparação do desempenho das técnicas CCDAE e CLAE-UV/DAD na quantificação de isoorientina nas cascas.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Materiais, reagentes e padrões analíticos

Materiais: placas para CCDAE de vidro, cobertas com Sílica Gel 60, com espessura da camada de 0,2 mm, e indicador de fluorescência F₂₅₄ da Merck (Darmstadt, Alemanha); cartuchos com fase C₁₈ e 400,0 mg de adsorvente (Sep-Pak, Waters Associates, Milford, MA, EUA); membranas hidrofílicas para filtração Millex-HV PVDF (polivinilideno fluorado), com poros de 0,45 µm, diâmetro de 25,0 mm e não estéril (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Solventes: metanol grau HPLC (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), etanol p.a., acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico p.a. e metiletilacetona, todos provenientes da Merck (VWRI, Leuven, Bélgica), acetonitrila grau HPLC (Tedia, Fairfield, OH, EUA) e água deionizada purificada em sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA).

Reagentes: difenilborato de aminoetanol (Fluka, Buchs, Suíça), PEG 400 (Merck, VWRI, Leuven, Bélgica).

Padrões: rutina 95% da Sigma (St. Louis, EUA), isoorientina 99% e hyperosídeo 99%, da Carl Roth (Karlsruhe, Alemanha).

3.3.2 Preparo dos extratos de flavonoides das polpas e cascas do maracujá e das soluções-padrão para análise por CCDAE

As polpas congeladas dos frutos de *P. edulis* e *P. alata* analisadas no Laboratoire de Pharmacognosie, em Liège, Bélgica, foram provenientes da mesma safra dos frutos analisados no Brasil (capítulo 2, item 2.3.2).

Inicialmente também foram analisadas por CCDAE os extratos das polpas de *P. edulis* e *P. alata*, segundo procedimento otimizado e validado (capítulo 2, item 2.3.3): 10,0 mL de polpa de maracujá (livre de sementes) foram sonicados por 1,5 minutos com 30,0 mL de etanol 60% a temperatura ambiente; os extratos foram centrifugados por 20 minutos a 10000 rpm e 25°C, o sobrenadante foi retirado e concentrado no rotaevaporador até um volume de aproximadamente 2,0 mL. Os extratos concentrados foram então submetidos à etapa de *clean-up* por extração em fase sólida (EFS), segundo procedimento descrito no item 2.3.3 (capítulo 2). Estes extratos foram posteriormente analisados por CCDAE.

As cascas de *P. edulis* analisadas em Liège, Bélgica, foram provenientes da mesma plantação dos frutos analisados no Brasil (capítulo 2, item 2.3.2). Os frutos sadios e infectados com o vírus PWV foram coletados em 15 de dezembro de 2008 na Fazenda São Luiz, município de Bauru, São Paulo.

As cascas de *P. edulis* obtidas após separação da polpa e sementes foram lavadas, cortadas, e colocadas na estufa à temperatura em torno de 40-50 °C por 24 horas, para remoção da umidade. As cascas foram separadas em dois lotes: o primeiro lote com cascas sadias e o segundo composto por cascas com sintomas da doença PWV, como rugas, deformações e endurecimento das cascas. Em seguida, as cascas foram trituradas com um *mixer* para alimentos e tamizadas em uma

peneira de malha 16 mesh, separando-se o material com granulometria de 1,0 mm. As cascas foram armazenadas em recipientes de plástico protegidos da umidade e do calor.

A extração dos flavonoides nas cascas dos frutos de *P. edulis* infectados ou não com o vírus PWV foi realizada de acordo com a literatura:¹⁶ 20,0 mL de metanol foi adicionado a 1,0 g de cascas de maracujá secas e trituradas (granulometria de 1,0 mm), os extratos foram agitados por 60 minutos, filtrados e então concentrados em rotaevaporador até um volume de aproximadamente 2,0 mL. Para expressar o resultado em relação à massa seca de extrato, os extratos foram secos por meio do rotaevaporador, deixados em estufa a vácuo por 24 horas, para remoção da umidade, e então pesados para o cálculo de massas.

Foi preparada uma solução-estoque do padrão isoorientina na concentração de 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. As soluções de hiperosídeo e rutina foram preparadas ambas na concentração de 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol.

3.3.3 Escolha da fase móvel

Foram avaliadas 4 fases móveis diferentes descritas na literatura para a separação de flavonoides: acetato de etila: ácido fórmico: água (82:9:9);⁴ acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26);¹⁷ acetato de etila: ácido fórmico: água (6:1:1);⁸ acetato de etila: metiletilacetona: ácido fórmico: água (50:30:10:10).¹²

3.3.4 Análises por CCDAE

As análises qualitativas foram realizadas em placas de sílica gel F₂₅₄ (10 x 10 cm). Alíquotas de 8,0 µL dos extratos e 10,0 µL das soluções-padrão de hiperosídeo e rutina (500,0 µg mL⁻¹) foram aplicadas nas placas por meio de aplicador automático Desaga AS 30 (Heidelberg, Alemanha). A largura das bandas foi de 8,0 mm e a distância entre o meio das bandas de 12,0 mm, o volume fixo aplicado foi de 1,0 µL, a velocidade de aplicação de 15 s µL⁻¹ e o tempo entre cada aplicação de 15 s.

Nas análises quantitativas, foi utilizado o método do padrão externo: a curva analítica foi construída por meio da aplicação automática de alíquotas da solução-estoque de isoorientina (400,0 µg mL⁻¹) de 0,8; 1,6; 2,4; 3,2; 4,0 µL, em placas de sílica gel F₂₅₄ (10 x 20 cm). Alíquotas de 8,0 µL do extrato de cascas de *P. edulis* sadias e 16,0 µL do extrato de cascas contaminadas com o vírus PWV também foram aplicadas na mesma placa de CCDAE. A largura das bandas foi de 5,0 mm e a distância entre o meio das bandas de 9,0 mm, o volume fixo aplicado em cada ciclo foi de 0,8 µL, a velocidade de aplicação de 30 s µL⁻¹ e o tempo entre cada aplicação de 15 s. Após a secagem das bandas, a separação foi realizada em uma cuba (Camag, Muttenz, Suíça) saturada por 1 hora à temperatura ambiente com a fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: água (6:1:1). O desenvolvimento foi de aproximadamente 70 mm; e após a secagem da placa em corrente de ar frio, ocorreu a revelação por imersão da placa em uma cuba de imersão 20 x 10 cm (Camag, Muttenz, Suíça) com um reagente específico para revelação de flavonoides: NP/PEG- 400.^{8,18} A solução reveladora foi preparada dissolvendo-se 100,0 g de difenilborato de aminoetanol em 500,0 mg de PEG-400, adicionando em

seguida 10,0 mL de metanol. Após a secagem, as placas foram submetidas à análise densitométrica e fotografadas.

3.3.5 Análise densitométrica

As placas de CCDAE foram escaneadas após 1 hora de derivatização, usando um densitômetro Desaga CD 60 (Heidelberg, Alemanha). Os parâmetros de análise densitométrica utilizados foram aqueles otimizados pela Dr. Cintia A. M. Pereira:⁴ modo varredura; remissão; fluorescência usando lâmpada de mercúrio, $\lambda_{\text{excitação}}$ de 300 e filtro *cut-off* $\lambda_{\text{emissão}}= 550$ nm; sinal positivo; largura da fenda 0,04 mm; altura da fenda 6,0 mm; leitura por otimização do *spot*; resolução 0,025 mm; número de medidas por posição: 32; fator do sinal: 15. Foi utilizada a medida da altura dos picos nas análises quantitativas.

As placas de CCDAE foram fotografadas após 1 hora de derivatização, utilizando-se um VD40-Video Documentation System (Desaga, Heidelberg, Alemanha), $\lambda_{\text{excitação}}= 366$ nm, sendo as fotos analisadas no *software* Doct (Desaga, Heidelberg, Alemanha).

3.3.4 Análises por CLAE-UV/DAD

As análises dos extratos das cascas de *P. edulis* foram realizadas no Laboratoire de Pharmacognosie, Liège, Bélgica, em um cromatógrafo líquido da Agilent Hewlett Packard modelo HP G1311A (Palo Alto, CA, EUA) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos modelo HP 1040 M-series 2. Foi utilizada coluna Symmetry[®] C₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5,0 µm) com pré-coluna Symmetry[®] C₁₈ (2,0 cm x 4,0 mm x 5,0 µm), ambas Waters.

A quantificação da flavona isoorientina nas cascas de *P. edulis* foi realizada seguindo as condições cromatográficas do método validado para a quantificação de isoorientina em polpa de *P. edulis* (capítulo 2, item 2.4.2.2): gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B); 0-10 minutos, 12%-16% de B em A e 10-30 minutos, 16-20% de B em A, vazão da fase móvel 0,8 mL min⁻¹ e temperatura do forno 40 °C. Todas as amostras foram filtradas com membranas hidrofílicas Millex-HV PVDF (0,45 µm; 25,0 mm) antes da injeção automática de 10,0 µL no sistema de CLAE-UV/DAD.

A quantificação de isoorientina foi realizada por meio do método do padrão externo, analisando-se as triplicatas dos cromatogramas dos extratos obtidos em $\lambda = 330$ nm, e a curva analítica foi construída a partir de diluições da solução-estoque de isoorientina (400,0 mg L⁻¹ em metanol) nas concentrações de 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 mg L⁻¹ em metanol.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Análise dos extratos e padrões por CCDAE

Foram testadas várias fases móveis a fim de obter a melhor separação dos flavonoides em CCDAE, visando a avaliação densitométrica (Figuras 41 e 42).

A pior separação das substâncias dos extratos foi observada com a fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26) (Figura 41b), havendo a sobreposição de muitas bandas, principalmente dos possíveis ácidos carboxílicos fenólicos (mancha azul) e flavonas derivadas de luteolina (manchas amarelas), o que dificultaria a quantificação.

A melhor separação das substâncias foi obtida com a fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: água (6:1:1), Figura 42a. Pode-se observar que as manchas das amostras estão melhor separadas, principalmente as com R_f acima da rutina. Brausseau & Angenot (1986)⁸ relatam esta como sendo a mais eficiente fase móvel para separação de flavonoides, obtendo-se manchas mais estreitas e bem separadas.

A fluorescência de cor amarela é característica dos derivados de luteolina: isoorientina (3) e orientina (4), devido à presença de dois grupos OH nas posições 3' e 4'.⁸ Observou-se que as cascas de *P. edulis* possuem maior quantidade de flavonas derivadas de luteolina comparada à polpa desta espécie (Figuras 41 e 42). Já as manchas azuis presentes nas amostras, principalmente no extrato de *P. alata*, indicam a presença de ácidos carboxílicos fenólicos (por exemplo, o ácido caféico), os quais não são derivatizados pela reação com o éster 2-aminoetílico do ácido

difenilbórico (revelador), mas apresentam fluorescência nativa; estes ácidos fenólicos ocorrem frequentemente em plantas com flavonoides.¹⁷

De acordo com Kartnig & Göbel (1996)¹³ a molécula de açúcar é importante para o comportamento de fluorescência dos flavonoides glicosilados: mesmo quando os açúcares não impedem a formação do complexo demonstrado na Figura 40, eles influenciam o comportamento da fluorescência. Por exemplo, comparando-se a vitexina e sua respectiva aglicona apigenina, estas apresentam nítida diferença na intensidade da fluorescência, que não pode ser explicada somente pela diferença de massa molecular; outro exemplo é a flavona orientina, que emite fluorescência de intensidade 6 vezes maior que sua aglicona.

Pode-se observar nas Figuras 41 e 42 que não há diferença significativa entre as polpas dos frutos de *P. edulis* infectados com vírus PWV e a polpa dos frutos sadios, optando-se assim pelo estudo somente da diferenciação dos flavonoides das cascas de *P. edulis* contaminadas e sadias.

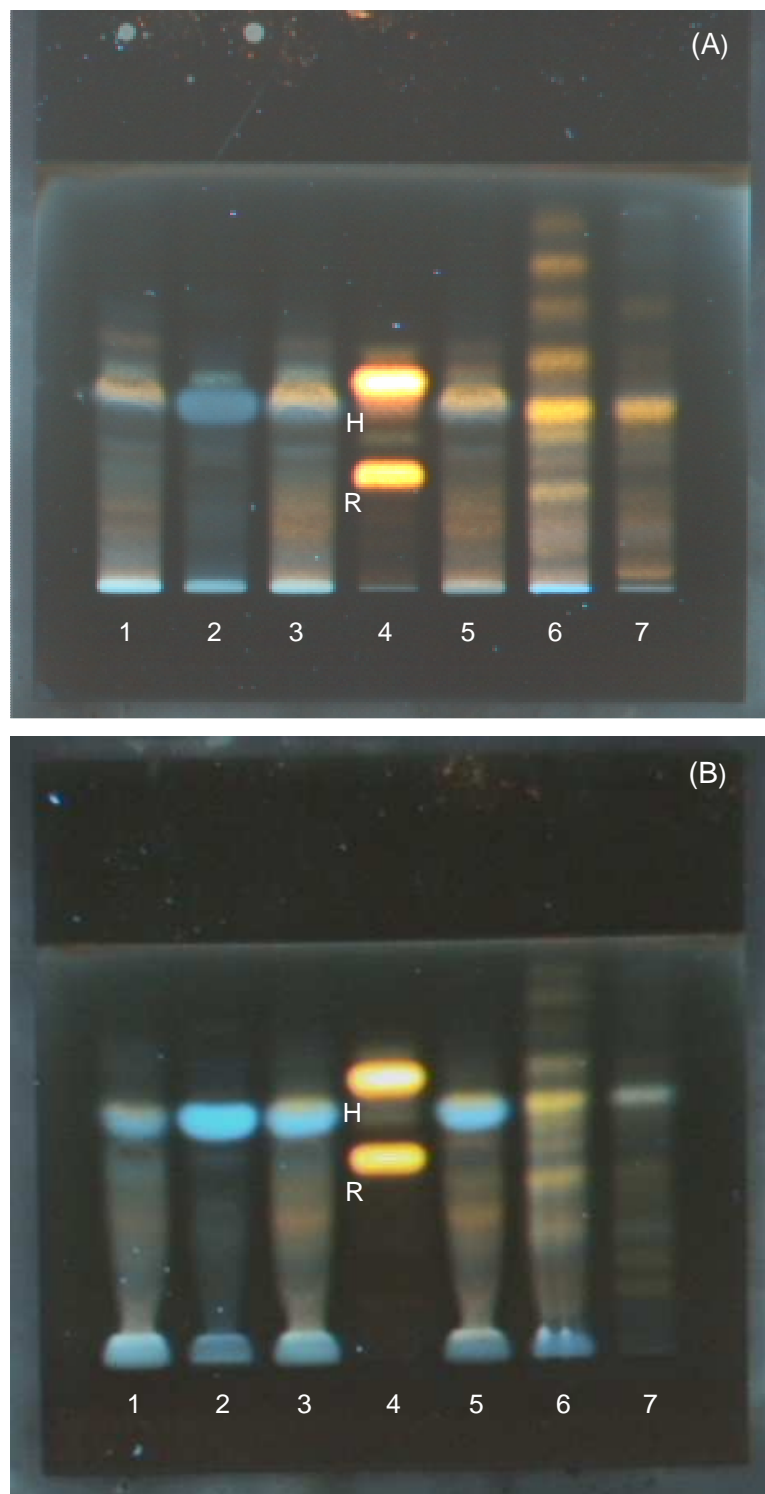


Figura 41. Fotos das placas de CCDAE revelada com NP/PEG-400 ($\lambda_{\text{excitação}} = 366$ nm). 1- Polpa *P. edulis* (safra 15/01/08), 2- Polpa *P. alata*, 3- Polpa *P. edulis* sadia (safra 15/12/08), 4- Padrão hiperosídeo (H) e rutina (R), 5- Polpa *P. edulis* infectada (vírus PWV) (safra 15/12/08), 6- Casca *P. edulis* sadia, 7- Casca *P. edulis* infectada (vírus PWV); **A)** fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: água (82:9:9); **B)** fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26).

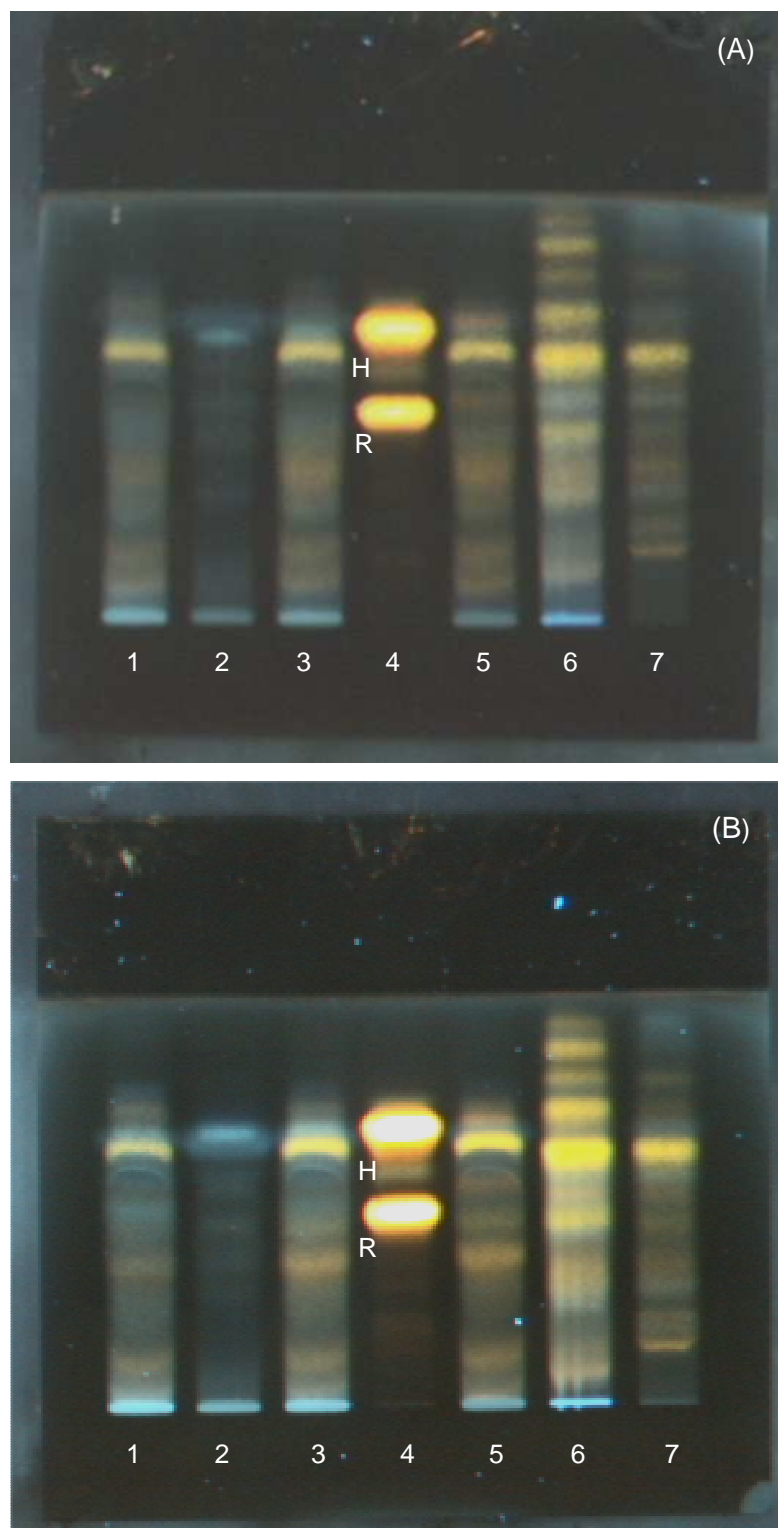


Figura 42. Fotos das placas de CCDAE revelada com NP/PEG-400 ($\lambda_{\text{excitação}} = 366$ nm). 1- Polpa *P. edulis* (safra 15/01/08), 2- Polpa *P. alata*, 3- Polpa *P. edulis* sadia (safra 15/12/08), 4- Padrão hiperosídeo (H) e rutina (R), 5- Polpa *P. edulis* infectada (vírus PWV) (safra 15/12/08), 6- Casca *P. edulis* sadia, 7- Casca *P. edulis* infectada (vírus PWV); **A**) fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: água (6:1:1); **B**) acetato de etila: metiletilacetona: ácido fórmico: água (50:30:10:10).

Por meio de comparações com padrões, foi observada a presença da flavona monoglicosilada isoorientina (**3**) nos extratos de cascas e polpa de *P. edulis* (Figura 43), sendo este o padrão utilizado para as análises densitométricas. Não foi possível realizar por esta técnica a quantificação de isoorientina na polpa de *P. edulis*, devido à baixa concentração desta flavona no extrato, ocasionando erros nas análises densitométricas. Tentou-se realizar a deposição dos extratos em maior quantidade, testando diferentes alíquotas de extratos de polpa e cascas dos frutos de *P. edulis* (Figura 43) (para aumento de massa dos flavonoides), porém ocorreram problemas práticos somente com os extratos de polpa do maracujá, devido à sua viscosidade, secagem incompleta após deposição automática e danificação da placa.

Assim, optou-se por realizar a quantificação de isoorientina por CCDAE somente das cascas de *P. edulis* infectadas ou não com o vírus PWV.

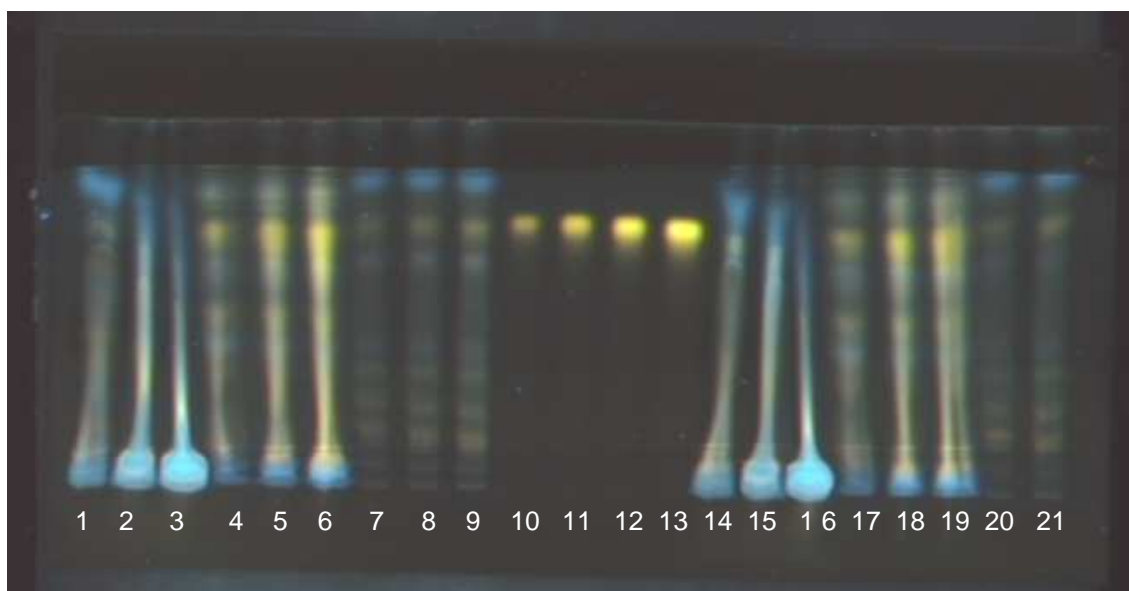


Figura 43. Foto da placa de CCDAE revelada com NP/PEG-400 ($\lambda_{\text{excitação}} = 366 \text{ nm}$). Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: água (6:1:1). 1-3 Polpa *P. edulis* (6,0; 8,0 e 10,0 μL), 4-6 Casca *P. edulis* sadia (6,0; 8,0 e 10,0 μL), 7-9 Casca *P. edulis* infectada (vírus PWV) (6,0; 8,0 e 10,0 μL), 10-13 Padrão isoorientina (2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 μL), 14-21 Duplicata dos extratos de 1 a 8, respectivamente.

3.4.1.1 Análise quantitativa

Para otimizar as condições para as análises quantitativas por CCDAE, foram realizados vários testes com diferentes modificações nos parâmetros cromatográficos: variou-se o volume total aplicado de 5,0 a 20,0 μL ; a velocidade de aplicação foi variada de 10,0 a 30,0 $\text{s } \mu\text{L}^{-1}$; e o tempo de aplicação entre cada amostra de 10 a 30 s; também foram testadas várias concentrações dos extratos e de padrão até atingir a faixa ótima para as análises. A Figura 44 mostra a separação obtida por CCDAE nas condições cromatográficas otimizadas.

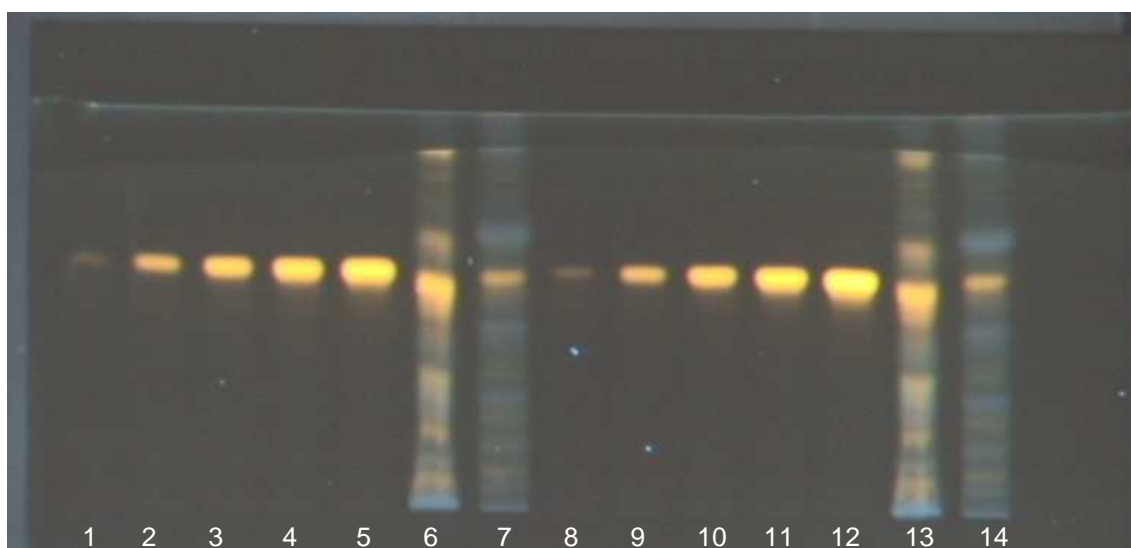


Figura 44. Foto da placa de CCDAE revelada com NP/PEG-400 ($\lambda_{\text{excitação}} = 366 \text{ nm}$). Largura das bandas 5,0 mm; distância entre o meio das bandas 9,0 mm; velocidade de aplicação 30 $\text{s } \mu\text{L}^{-1}$; tempo entre cada aplicação 15 s. 1-5 Padrão isorientina (0,8; 1,6; 2,4; 3,2; 4,0 μL), 6- Cascas de *P. edulis* sadia (8,0 μL), 7- Cascas de *P. edulis* infectada com vírus PWV (16,0 μL), 8-14 Duplicata dos padrões e extratos de 1 a 7, respectivamente.

A partir da placa de CCDAE (Figura 44) foram obtidos os densitogramas dos padrões e extratos (Figura 45), e as respectivas alturas dos picos foram utilizadas na quantificação da isorientina presente nos extratos. Nas análises densitométricas

utilizou-se detecção em 300 nm e filtro de *cut-off* em 550 nm, pois nesta condição, além da intensidade de fluorescência ser máxima, visualiza-se apenas as bandas de fluorescência amarela, correspondentes aos derivados de luteolina.

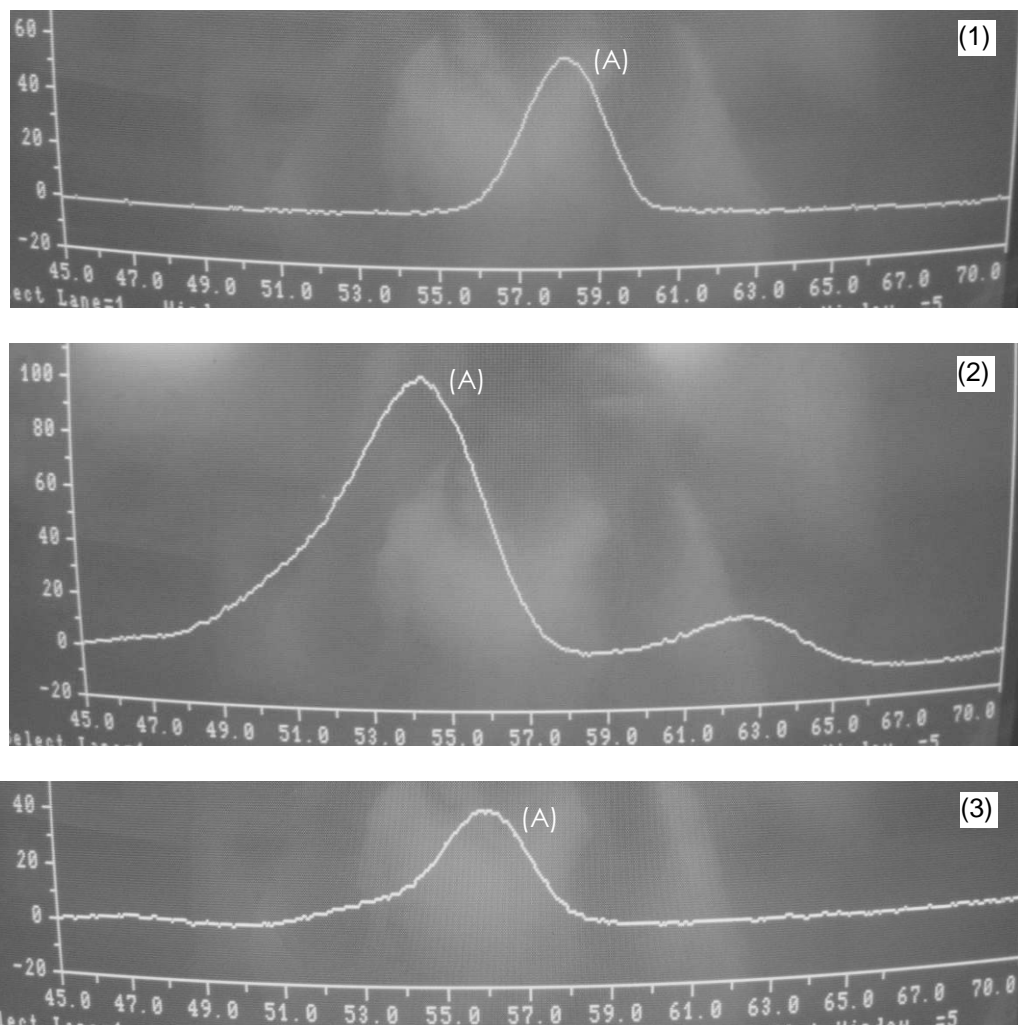


Figura 45. Fotos dos densitogramas (detecção em 300 nm, filtro em 550 nm). 1- Padrão isoorientina (1,6 μ L); 2- Cascas de *P. edulis* sadias (8,0 μ L); 3- Cascas de *P. edulis* infectadas com vírus PWV (16,0 μ L), após separação por CCDAE e revelação com NP/PEG-400. (A) Isoorientina.

A quantificação de isoorientina nas cascas dos frutos de *P. edulis* foi feita por meio do método do padrão externo, construindo-se curvas analíticas com o padrão isoorientina (Figura 46), que foi analisado juntamente com os extratos (Figura 44).

As curvas foram construídas em duplicata e os valores das respectivas alturas dos picos foram obtidos a partir do densitograma apresentado na Figura 47.

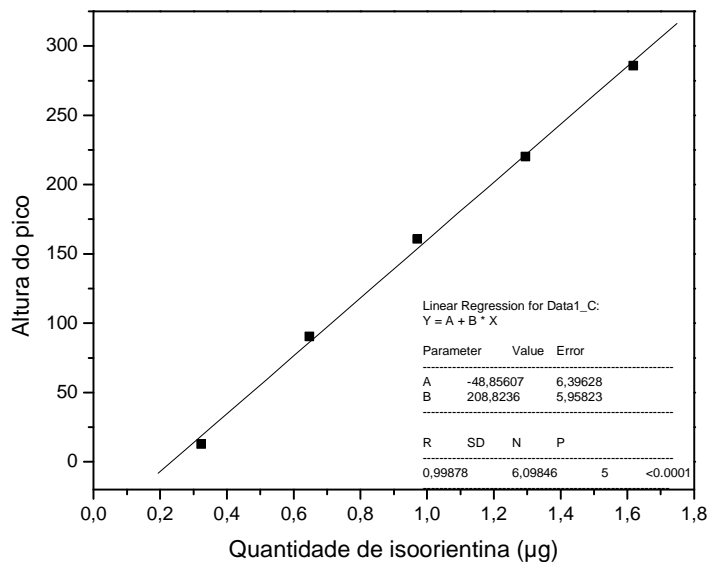


Figura 46. Curva analítica de isoorientina em metanol (0,32; 0,65; 0,97; 1,3; 1,6 µg) obtida por CCDAE.

A curva analítica de isoorientina ($y = -48,85607 + 208,8236 x$, $r = 0,9988$), mostrou-se linear com valor de $r > 0,99$. As quantificações de isoorientina nos extratos foram realizadas em duplicata e expressos em mg L^{-1} e mmol L^{-1} , para posterior comparação dos resultados (Tabela 10).

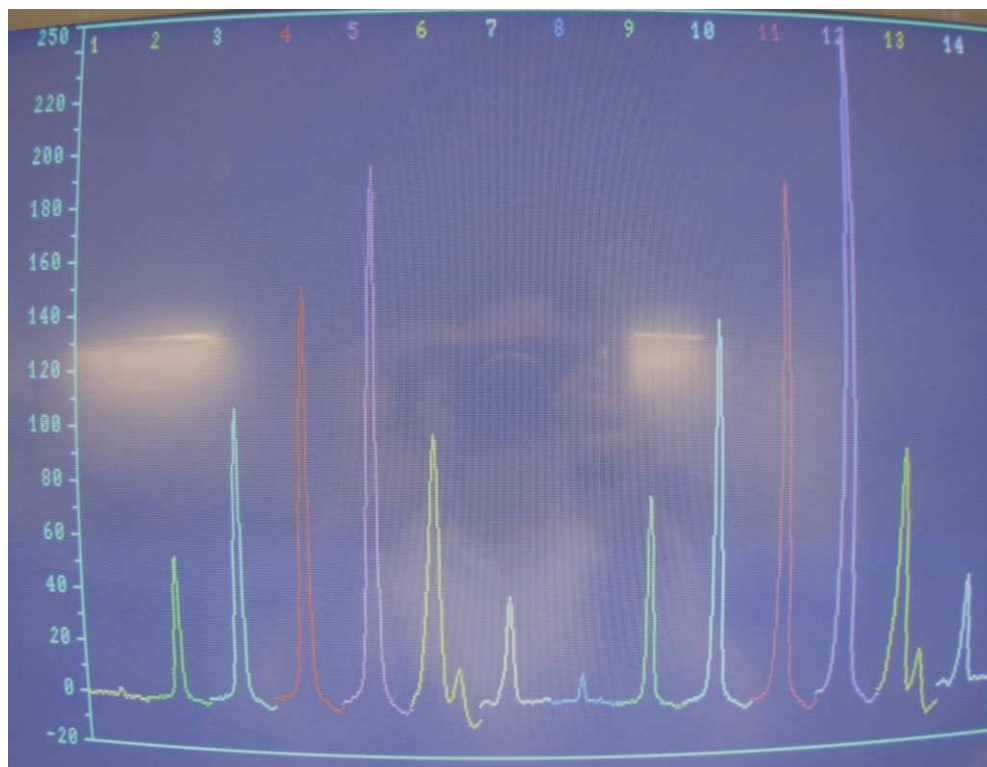


Figura 47. Foto do densitograma (detecção em 300 nm, filtro em 550 nm) do padrão isoorientina (linhas 1-5 e 8-12) e dos extratos de cascas de *P. edulis* sadias (linhas 6 e 13) e cascas de *P. edulis* infectadas com o vírus PWV (linhas 7 e 14), após desenvolvimento cromatográfico por CCDAE (Figura 44) e revelação com NP/PEG.

Tabela 10. Determinação quantitativa de isoorientina nas cascas de *P. edulis* por CCDAE

Amostras	Concentração de isoorientina (mg L ⁻¹) ± d.p.*	(mmol L ⁻¹) ± d.p.	Isoorientina em relação à massa seca (mg g ⁻¹) ± d.p.
Cascas de <i>P. edulis</i> sadias	92,275 ± 0,610	0,206 ± 0,001	1,230 ^a ± 0,008
Cascas de <i>P. edulis</i> infectadas vírus PWV	28,931 ± 0,346	0,064 ± 0,001	0,964 ^a ± 0,011

* d.p.= desvio padrão

^a Par é estatisticamente diferente ao nível de confiança de 95%

Os dados da Tabela 10 mostram que a concentração de isoorientina nas cascas dos frutos de *P. edulis* sadios é cerca de 3 vezes maior que a quantidade encontrada nas cascas infectadas.

Aplicando o teste-*t* de Student ao nível de confiança de 95%, verificou-se que mesmo quando os resultados da quantidade de isoorientina nas cascas são expressos em relação à massa seca de extrato (Tabela 10), as quantidades de isoorientina nas cascas sadias e infectadas com o vírus PWV são significativamente diferentes entre si.

3.4.2 Análise dos extratos de cascas de *P. edulis* por CLAE-UV/DAD

Os mesmos extratos de cascas de *P. edulis* analisados por CCDAE foram também analisados por CLAE-UV/DAD (Figuras 48), segundo o método desenvolvido e validado para quantificação de flavonoides da polpa de *P. edulis* (capítulo 2, item 2.4.2.2). O pico da flavona isoorientina foi identificado por meio da comparação do tempo de retenção e do espectro de UV-Vis/DAD do padrão com os extratos, também conforme o item 2.4.2.2, do capítulo 2.

Observou-se nos cromatogramas da Figura 48 uma boa separação das substâncias presentes nas cascas de *P. edulis*, utilizando o método desenvolvido para análise dos flavonoides da polpa desta espécie, mostrando assim, a aplicabilidade do método também para quantificação de isoorientina nas cascas do maracujá.

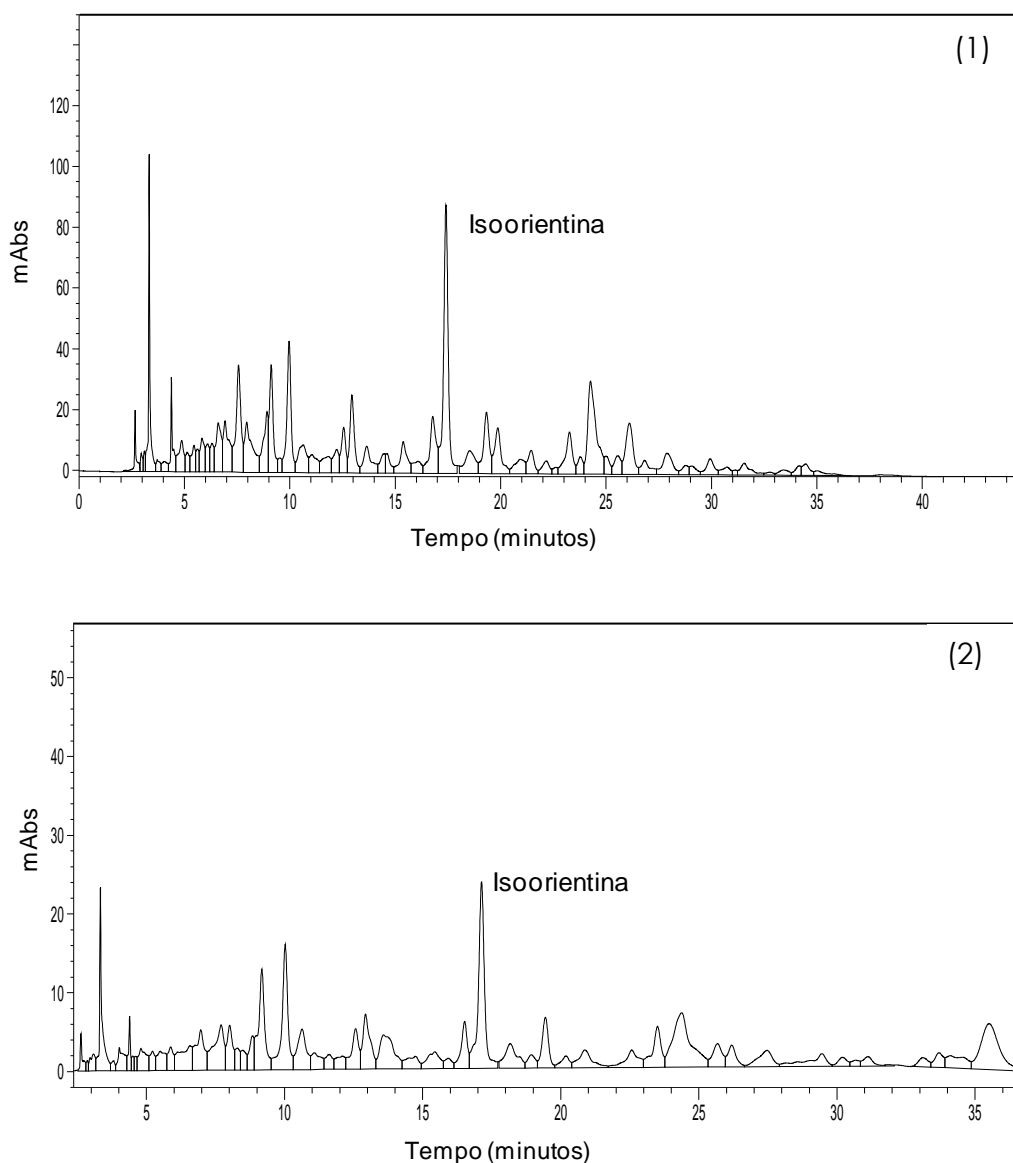


Figura 48. Cromatogramas (CLAE-UV/DAD) em $\lambda = 330$ nm. 1- Extrato das cascas sadias de *P. edulis*; 2- Extrato das cascas de *P. edulis* infectadas com vírus PWV. Fase móvel: gradiente linear de 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B); 0-10 minutos, 12%-16% de B em A e 10-30 minutos, 16-20% de B em A, vazão da fase móvel $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para a quantificação de isoorientina nas cascas de *P. edulis* foi utilizado o método do padrão externo, com a construção da curva analítica de isoorientina ($10,0 - 80,0 \text{ mg L}^{-1}$) em metanol (Figura 49). A quantidade de isoorientina foi obtida analisando-se a área do pico desta substância presente nos extratos (Figura 48) e

comparando-se com as áreas das soluções-padrão (Figura 49), os valores foram expressos em mg L⁻¹ e mmol L⁻¹ (Tabela 11).

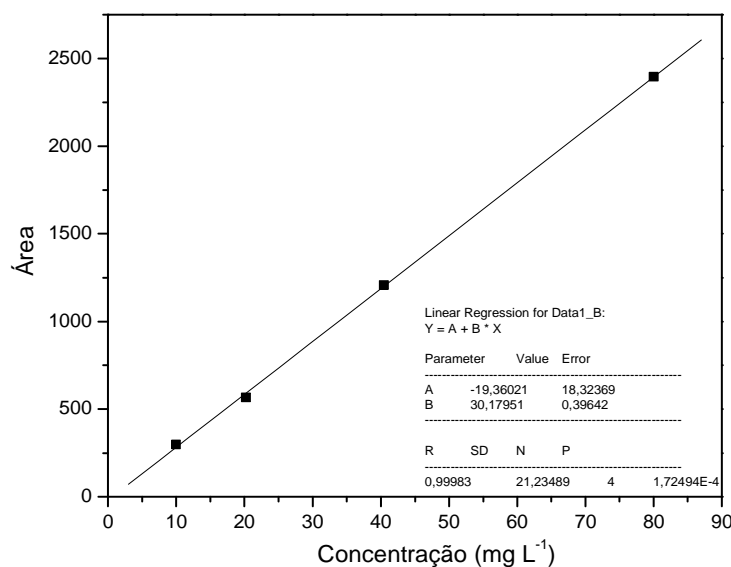


Figura 49. Curva analítica de isoorientina em metanol obtida por CLAE-UV/DAD.

Tabela 11. Determinação quantitativa de isoorientina nas cascas de *P. edulis* por CLAE-UV/DAD

Amostras	Concentração de isoorientina (mg L ⁻¹) ± d.p.*	(mmol L ⁻¹) ± d.p.	Isoorientina em relação à massa seca (mg g ⁻¹) ± d.p.
Cascas de <i>P. edulis</i> sadias	45,395 ± 0,073	0,101 ± 0,001	0,605 ^a ± 0,001
Cascas de <i>P. edulis</i> infectadas vírus PWV	13,112 ± 0,042	0,029 ± 0,001	0,437 ^a ± 0,001

* d.p.= desvio padrão (n= 3)

^a Par é estatisticamente diferente ao nível de confiança de 95%

Por meio da quantificação de isoorientina das cascas por CLAE-UV/DAD observou-se uma diferença em torno de 4 vezes na quantidade desta flavona entre as cascas infectadas ou não com o vírus, sendo a maior quantidade encontrada nas

cascas sadias. Os resultados expressos em relação à massa seca também são estatisticamente diferentes ao nível de confiança de 95%.

Estes resultados mostram que este método desenvolvido para análises da polpa do maracujá pode servir para estudos futuros de diferenciação de cascas doentes e sadias, monitorando por exemplo, a flavona isoorientina.

3.4.3 Comparação de métodos analíticos para a análise de isoorientina nos extratos de cascas de *P. edulis*

Os métodos por CCDAE e CLAE-UV/DAD usados para quantificação de isoorientina nas cascas de *P. edulis* foram comparados com relação à concentração de isoorientina encontrada (Tabela 12), e também quanto à aspectos práticos: tempo de análise e volume de solvente gasto (Tabela 13).

Para avaliar se os métodos se diferenciam entre si, empregou-se o teste-*t* de Student ao nível de confiança de 95%, que possibilita a comparação das médias e desvios para os dois conjuntos de ensaios (Tabela 12).

Tabela 12. Dados obtidos para os resultados da quantificação da isoorientina nas cascas de *P. edulis* por meio de diferentes métodos

Método	Cascas sadias		Cascas infectadas com PWV	
	(mg L ⁻¹) ± d.p.*	(mmol L ⁻¹) ± d.p.	(mg L ⁻¹) ± d.p.	(mmol L ⁻¹) ± d.p.
CCDAE	92,275 ± 0,610 ^a	0,206 ± 0,001 ^b	28,931 ± 0,346 ^c	0,064 ± 0,001 ^d
CLAE-UV/DAD	45,395 ± 0,073 ^a	0,101 ± 0,001 ^b	13,112 ± 0,042 ^c	0,029 ± 0,001 ^d

* d.p.= desvio padrão (n= 3)

^{a,b,c,d} Pares são estatisticamente diferentes ao nível de confiança de 95%

Verificou-se na Tabela 12 que a concentração de isoorientina nas cascas do maracujá, obtida por meio das técnicas CCDAE e CLAE-UV/DAD, difere entre si ao nível de confiança de 95%, obtendo-se valores por CCDAE maiores se comparados aos valores encontrados pela técnica CLAE. Este fato pode ser explicado devido à possível sobreposição de bandas (substâncias) ou por efeito de matriz em CCDAE.

A tabela 13 mostra a avaliação de alguns parâmetros importantes para a escolha de um método analítico.

Tabela 13. Comparação dos dois métodos para quantificação da isoorientina nas cascas de *P. edulis*^a

Método	Tempo de análise (minutos)	Volume de solvente (mL)
CCDAE	120,0	12,0
CLAE-UV/DAD	700,0	98,0 ^b

^a análises em duplicata

^b volume de acetonitrila considerando o gradiente de eluição

Foi verificado o tempo necessário para a realização das análises (Tabela 13), contabilizando somente a etapa das análises cromatográficas em duplicata (não foi considerado o tempo utilizado no preparo dos extratos, pois usou-se o mesmo procedimento em ambos os métodos). O método CLAE é mais demorado, pois foram necessárias as análises de 5 soluções-padrão em diferentes concentrações e também 2 extratos de maracujá em duplicata, sendo que cada análise demandou um tempo de 50 minutos (30 minutos do gradiente, 10 minutos para limpeza e mais 10 minutos para equilibrar a coluna para a próxima análise). Já o método de CCDAE possui a vantagem de permitir análises simultâneas, ou seja, todos os padrões e

amostras cromatografados na mesma placa, demandando o tempo apenas do desenvolvimento cromatográfico e secagem.

Observou-se que o volume total de solvente orgânico empregado no método por CCDAE foi 8 vezes menor se comparado às análises por CLAE (Tabela 13), mostrando ser uma técnica alternativa à CLAE, com bom desempenho, e baixa quantidade de resíduos gerados.

3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

A técnica CCDAE mostrou várias vantagens como: desenvolvimento rápido do método, facilidade de visualização pós-cromatográfica, habilidade de se trabalhar com extratos brutos e sem necessidade de *clean up*, possibilidade de análise simultânea de várias amostras, em menor tempo se comparada a CLAE, e principalmente mostrou-se uma técnica mais econômica, com baixo consumo de solvente e resíduos gerados, pontos importantes para a maior valorização e exploração desta técnica no desenvolvimento de métodos analíticos.

Por CCDAE, foi possível verificar a presença de vários flavonoides derivados de luteolina (orientina e isoorientina) nas cascas de *P. edulis*.

Verificou-se que a quantidade de isoorientina encontrada nas cascas de *P. edulis* (tanto por CCDAE quanto por CLAE) é alta e significativa, sugerindo as cascas do maracujá como uma fonte natural de flavonoides. Além disso, sugere-se a utilização deste subproduto na alimentação humana ou animal, considerando não apenas seu alto conteúdo de flavonoides, mas a possibilidade de redução do excesso de resíduos orgânicos gerados pelas indústrias processadoras de suco de maracujá.

A comparação do desempenho dos métodos desenvolvidos por CCDAE e CLAE mostrou rapidez nas análises e baixo consumo de solventes orgânicos para a técnica de CCDAE, podendo ser empregada como alternativa à CLAE em indústrias na parte de controle de qualidade da polpa e cascas do maracujá.

O método desenvolvido e validado por CLAE-UV/DAD no capítulo 2 para quantificação de isoorientina na polpa de *P. edulis* mostrou-se adequado e confiável para a análise quantitativa desta flavona nas cascas da mesma espécie,

apresentando uma boa separação cromatográfica, sendo possível a utilização do mesmo método para análises dos flavonoides de ambas as partes do fruto de *P. edulis*.

Além disso, verificou-se por meio de CCDAE e CLAE uma diferença significativa na quantidade de isoorientina presente nas cascas de *P. edulis* sadias e infectadas pelo vírus PWV, sugerindo-se assim o uso dos métodos desenvolvidos para estudos futuros e aprofundados na diferenciação de frutos sadios e doentes.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SKIBINSKI, R.; KOMSTA, Ł.; HOPKAŁA, H.; SUCHODOLSKA, I. Comparative validation of amisulpride determination in pharmaceuticals by several chromatographic, electrophoretic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 590, p. 195-202, 2007.
2. KOSIOR, M. W.; SKALSKA, A.; MATYSIK, A. Determination of phenothiazine derivatives by high performance thin-layer chromatography combined with densitometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 286-289, 2005.
3. PASTENE, E.; MONTES, M.; VEGA, M. New HPTLC method for quantitative analysis of flavonoids of *Passiflora coerulea* L. **Journal of Planar Chromatography**, v. 10, n. 5, p. 362-367, 1997.
4. PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J. N.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 241-248, 2004.
5. SHERMA, J. Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis: Review. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 129-147, 2000.
6. SHERMA, J.; FRIED, B. **Handbook of thin layer chromatography**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2003. 1042p.
7. VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J. N.; ANGENOT, L. Characterization of adulteration of "Espinheira Santa" (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae) hydroalcoholic extracts with *Sorocea bomplandii* (Moraceae) by high-performance thin layer chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 263-266, 1998.
8. BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG400 – un intéressant réactif de revelation des flavonoïdes. **Journal of Chromatography**, v. 351, n. 2, p. 351-355, 1986.
9. KARTNIG, T.; GRBEL, I. Effect of fluorescence intensifiers on the fluorodensitometric determination of flavones and flavonols after detection with diphenylboric acid 2-aminoethyl ester. **Journal of Chromatography A**, v. 740, p. 99-107, 1996.
10. POUKENS-RENWART, P.; TITS, M.; WAUTERS, J. N.; ANGENOT, L. Densitometric evaluation of spiraeoside after derivatization in flowers of *Filipendula ulmaria* (L.). **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v.10, p.1085-1088, 1992.

11. BRASSEUR, T.; WAUTERS, J. N.; ANGENOT, L. Dosage densitométrique d' hétérosides de la quercétine dans les extraits végétaux. **Journal of Chromatography**, v. 437, p. 260-264, 1988.
12. EUROPEAN Pharmacopoeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1996. v.1.
13. KARTING, T.; GÖBEL, I. Effect of fluorescence intensifiers on the fluorodensitometric determination of flavones and flavonols after detection with diphenylboric acid 2- aminoethyl ester. **Journal of Chromatography**, v. 740, p. 99-107, 1996.
14. JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WINNER, H. **Thin-layer chromatography**. Weinheim: VCH, 1990. 464p.
15. HOMBERG, H.; GEIGER, H. Fluorescence and structure of flavones. **Phytochemistry**, v.19, p. 2443-2449, 1980.
16. ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S.; Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v. 70, p. 718, 2006.
17. WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2.ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.
18. BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Contribution a l'étude pharmacognostique de la *Passiflore*. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 39, n. 1, p. 15-22, 1984.

CAPÍTULO 4- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1 Neutrófilos

Os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são células brancas do sangue caracterizadas por possuírem um núcleo multi-lobulado e grânulos em abundância no citoplasma, são altamente especializadas; suas funções primárias são a ingestão e a destruição de microrganismos invasores. Estas células são diferenciadas, incapazes de se dividirem,¹ produzidas e armazenadas na medula óssea, são liberadas na sua forma madura para o sangue periférico, onde têm uma média de vida curta (6 a 9 horas), caso não sejam recrutadas para sítios de inflamação por quimiocinas e fatores quimiotáticos específicos.^{2,3}

Dentre os leucócitos, os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune que chegam aos sítios inflamatórios, sendo, por esta razão, considerados a primeira linha de defesa do organismo. Os neutrófilos, quando recrutados para o local da lesão, apresentam a capacidade de englobar os microorganismos e/ou fragmentos de tecido danificado, por um processo chamado fagocitose.

Durante o processo de fagocitose o neutrófilo engloba o patógeno em um fagossoma, em seguida, ocorre a fusão do fagossoma com grânulos citoplasmáticos, seguida pela desgranulação, formando o fagolisossoma.⁴ Dentro deste, o microorganismo é degradado por enzimas, peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (EROs), que compõem o arsenal microbicida dos neutrófilos.

O arsenal de agentes citotóxicos tem sido tradicionalmente dividido em 2 categorias: mecanismos independentes e dependentes de oxigênio (não oxidativo e oxidativo, respectivamente); ambos os sistemas colaboram com a eliminação dos microrganismos. O mecanismo independente de oxigênio abrange o conteúdo dos grânulos dos neutrófilos, que podem ser classificados em: azurófilos ou primários, que contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), proteinases, como a elastase, defensina e lisozima; específico ou secundários, que possuem lactoferrina, lisozima, proteínas presentes na membrana plasmática; e gelatinase ou terciário, que se diferenciam dos grânulos específicos por não possuírem lactoferrina. O segundo mecanismo, dependente de oxigênio, é diretamente proporcional ao *burst*, ou explosão respiratória que envolve a ativação da enzima NADPH oxidase, que produz grandes quantidades de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio. A partir de H_2O_2 , a enzima MPO gera HOCl, o maior bactericida entre os oxidantes produzidos pelos neutrófilos, sendo muito potente na eliminação dos patógenos (Figura 50).^{1,5}

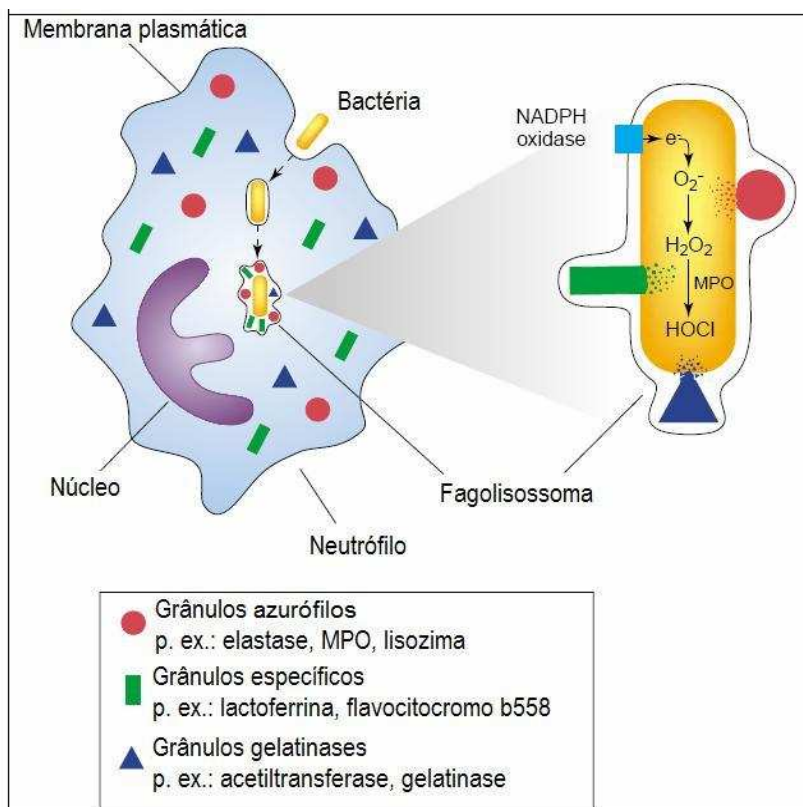


Figura 50. Esquema dos mecanismos independente e dependente de oxigênio durante a fagocitose de um microorganismo pelo neutrófilo.¹

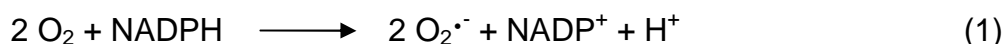
4.1.2 Produção de EROs

Os neutrófilos podem ser ativados devido à sua exposição a estímulos, tais como: agentes promotores de tumores (ex: forbol-12-miristato-13-acetato, PMA), ionóforos, complexos imunes, mediadores do processo inflamatório (ex: ácido araquidônico, n-formil-metionil-leucil-fenilalanina fMLP- peptídeo quimiotático), entre outros, fazendo com que suas funções efetoras sejam desencadeadas.⁶ O estímulo sintético PMA ativa diretamente a proteína quinase C (PKC) que está diretamente relacionada com os mecanismos de desgranulação e de produção de EROs.⁷

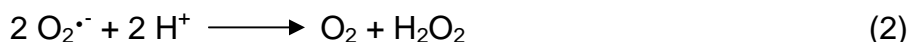
Após sofrerem estímulos ambientais ou durante o processo de fagocitose, os PMNs realizam a explosão respiratória. Este processo desencadeia a produção de

grande quantidade de EROs, potentes oxidantes que atuam em conjunto com os constituintes dos grânulos para matar e digerir os antígenos fagocitados.²

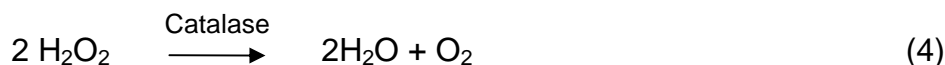
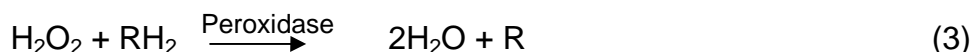
O processo de explosão respiratória inicia-se com a formação da NADPH oxidase (complexo enzimático presente tanto na membrana plasmática quanto na membrana dos grânulos),⁸ que catalisa a produção de radicais superóxido a partir de O₂ dissolvido no meio, sendo caracterizado pelo aumento do consumo de O₂ (Reação 1).⁹



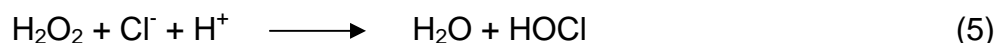
A maior parte do O₂^{·-} produzido é convertido em H₂O₂ por dismutação espontânea, ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Reação 2).¹⁰



O peróxido de hidrogênio formado pode ser convertido em água e oxigênio, por ação de peroxidases ou catalases presente no citoplasma (Reações 3 e 4).¹¹

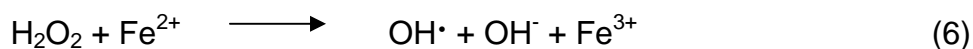


A maior parte do H₂O₂ produzido pelos neutrófilos é convertido a HOCl pela ação da enzima MPO, na presença de íons Cl⁻ (Reação 5).¹²

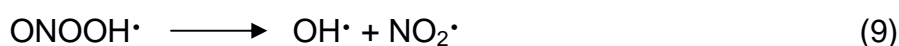
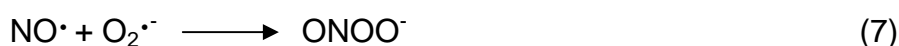


O HOCl é o principal e um dos mais potentes oxidantes microbicidas produzidos pelos neutrófilos.¹³

A reação do peróxido de hidrogênio com o íon Fe^{2+} forma outra substância altamente reativa, o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) (Reação 6).



A enzima óxido nítrico sintase oxida a L-arginina, formando L-citrulina e óxido nítrico. O ânion superóxido reage com óxido nítrico formando (ONOO^-). Este pode se decompor dando origem a $\text{OH}\cdot$ e ao radical dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$) (Reações 7-9).¹⁴



Os radicais ao reagirem com moléculas que possuem elétrons não pareados, podem formar outros radicais secundários, que também podem ser reativos, gerando assim uma reação em cadeia com grande variedade de substâncias reativas, importantes para degradar o patógeno fagocitado, mas que também podem reagir com moléculas do hospedeiro.⁹

Um método amplamente utilizado para quantificar a capacidade dos neutrófilos em produzir EROs é a quimioluminescência.¹⁵

4.1.3 Quimioluminescência

Os neutrófilos possuem a capacidade de produzir quimioluminescência durante a fagocitose,¹⁶ esta é decorrente da ativação do sistema NADPH oxidase que possibilita a formação de EROs por diferentes meios. Os produtos da redução

do oxigênio podem levar à oxigenação de substratos biológicos, levando à formação de estados eletronicamente excitados e conseqüentemente originar a baixa emissão de luz observada nestes processos.¹⁷

A quimioluminescência é um importante método para estudar a produção de EROs em tempo real, por fagócitos ativos. Para aumentar a quantidade de luz emitida por fagócitos durante a explosão respiratória (facilitando a monitoração da atividade de oxigenação destas células) são utilizados substratos quimioluminescentes (sondas), os quais diferem com respeito a sensibilidade resultante de diferentes mecanismos moleculares que levam à emissão de luz.¹⁸

Estas sondas são substâncias orgânicas que servem de substrato para reações redox, gerando intermediários eletronicamente excitados, que ao retornarem ao estágio fundamental, emitem fótons, os quais podem ser quantificados como quimioluminescência.^{19,20} Luminol, isoluminol e lucigenina são utilizados como substratos destas reações.

Neste trabalho foi utilizada a lucigenina: esta sonda detecta principalmente o radical ânion $O_2^{\cdot-}$, liberado no meio extracelular. Antes de reagir com o $O_2^{\cdot-}$, a lucigenina deve ser reduzida por um elétron para produzir o cátion radical lucigenina, e o sistema biológico que reduz a lucigenina pode ser o mesmo que produz o $O_2^{\cdot-}$. O cátion radical lucigenina então reage com o $O_2^{\cdot-}$ para produzir um intermediário instável, lucigenina dioxietano, que se decompõe para produzir duas moléculas de N-metilacridona, uma das quais está em um estágio eletronicamente excitado, que retorna ao estágio fundamental emitindo fóton (Figura 51).^{19,21}

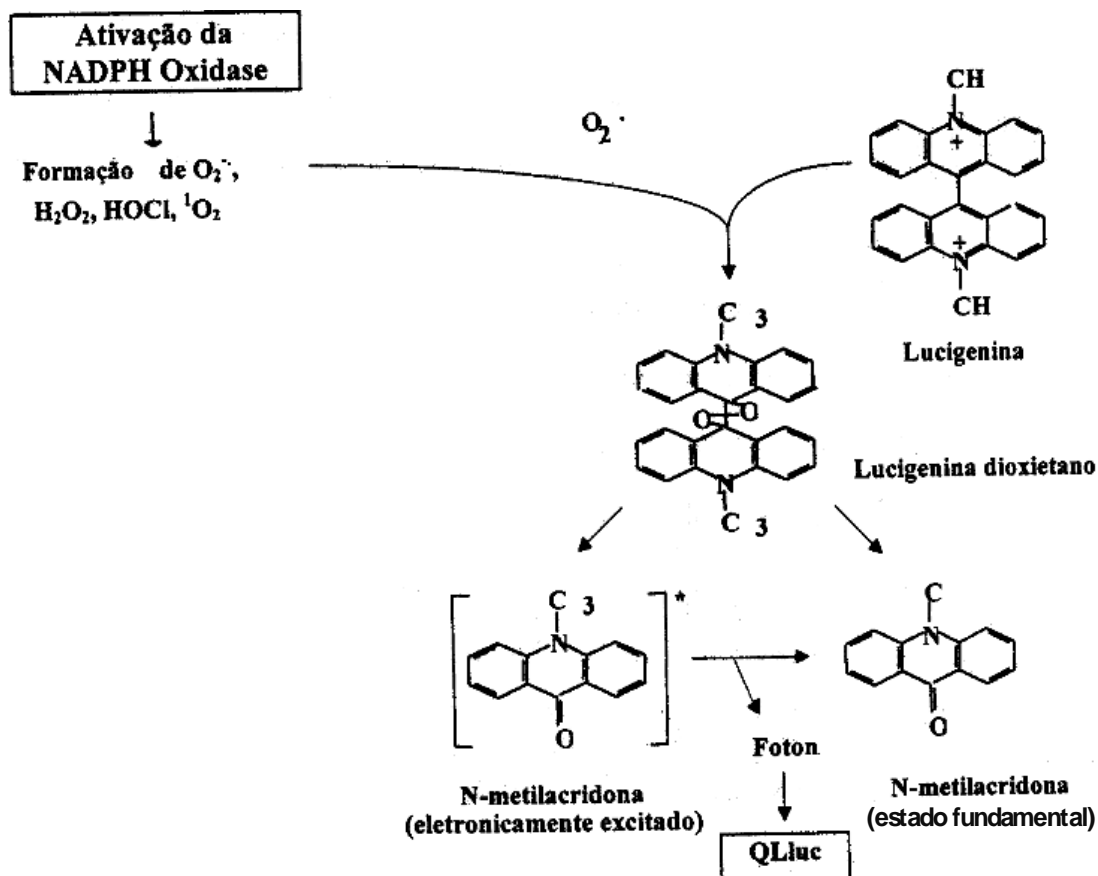


Figura 51. Esquema das reações químicas envolvidas na produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QLuc).²²

4.1.4 Mieloperoxidase

Além da produção de EROs pelos neutrófilos, ocorre também a desgranulação enzimática, que juntos completam a bateria microbicida para a atividade de defesa desempenhada por estas células. Dentre as enzimas liberadas está a MPO.

A MPO é uma enzima heme que contém como grupo prostético o mesmo heme encontrado na hemoglobina (Figura 52), mas ao contrário da hemoglobina e da maioria de outras proteínas heme, a MPO é verde, não vermelha. Esta substância confere cor esverdeada ao pus.⁹

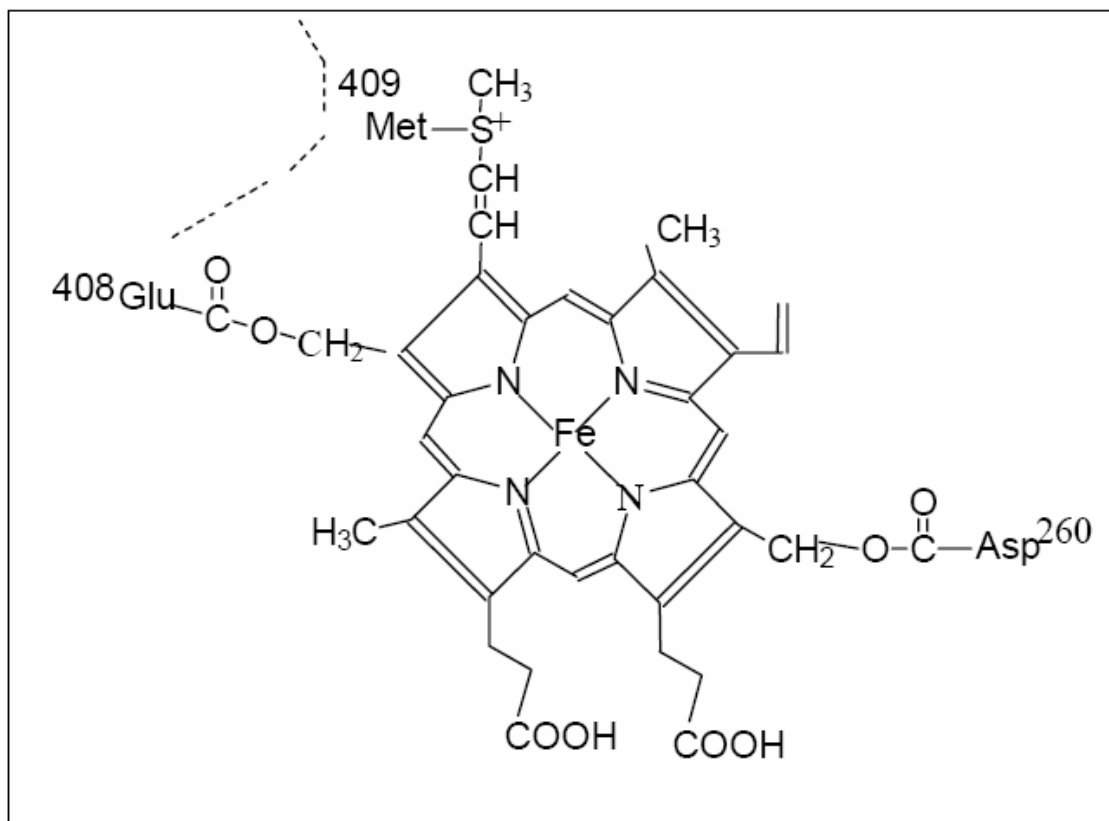


Figura 52. Grupo prostético heme da mieloperoxidase.²⁰

A MPO é o maior constituinte dos grânulos azurófilos citoplasmáticos dos neutrófilos.^{23,24} Esta enzima é considerada um marcador da ativação do neutrófilo.²⁵ Ela catalisa a oxidação de íons haleto (Cl^- , Br^- , I^-) e tiocianato (SCN^-) para ácidos halogenados, utilizando H_2O_2 como substrato. O HOCl é o principal produto, devido à elevada concentração de Cl^- nos fluidos corporais, e este ácido contribui para a produção de HO^\bullet e de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).^{26,27} Além disso, a MPO está envolvida no processo de nitração de proteínas, peroxidação lipídica e em imunomodulação.^{28,29} Assim, a MPO atua na eliminação de patógenos ingeridos durante a fagocitose, apresentando potente atividade contra bactérias, sendo considerada uma molécula efetora chave no sistema imune.

4.1.5 Participação dos neutrófilos em doenças

Embora a produção de EROs e a liberação da MPO sejam importantes para a resposta imune, quando ocorre uma excessiva ativação dos neutrófilos, grandes quantidades destas substâncias são liberadas no espaço extracelular, ocasionando a destruição de tecidos saudáveis e o desenvolvimento de doenças, como as inflamatórias crônicas (artrite reumatóide, vasculite), cardiovasculares (aterosclerose, isquemia miocárdica), neurodegenerativas (esclerose múltipla, mal de Parkinson, Alzheimer), lesão hepática e o câncer.³⁰⁻³² Nos cavalos, a excessiva ativação dos neutrófilos dá origem a doenças inflamatórias, como a laminite, obstrução das vias respiratórias e estrangulação intestinal, patologias frequentemente associadas a choque endotóxico irreversível.^{33,34}

A presença de EROs no espaço extracelular é controlada por moléculas antioxidantes naturais, impedindo que estas substâncias reativas causem dano ao tecido hospedeiro. Moléculas antioxidantes podem reduzir as EROs (atividade estereoquímica) ou inibir a enzima responsável pela produção destes radicais (atividade anti-catalítica no sitio ativo da enzima).³⁵ Dentre os antioxidantes endógenos estão: glutathiona, NADPH, coenzima Q (ubiquinona), ácido úrico, e certas enzimas como SOD, catalase e glutathiona peroxidase. Entre os antioxidantes dietéticos estão o tocoferol, ácido ascórbico, carotenóides, compostos fenólicos e flavonoides.^{36,37}

Porém, em situação de intensa ativação, a liberação de grandes quantidades de oxidantes e proteases pelos neutrófilos pode sobrepor a quantidade de inibidores presentes (antioxidantes), bem como inativar os mesmos.³⁸ Diante dos problemas causados pela produção e liberação excessiva de moléculas citotóxicas pelos

neutrófilos, estudos têm sido feitos em busca de substâncias que diminuam a atividade oxidante dos neutrófilos estimulados e também a atividade da MPO. Nesta perspectiva, os polifenóis, principalmente os flavonoides, são promissores, apresentando uma variedade de propriedades farmacológicas, como atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimurais.^{32,39,40}

Os flavonoides estão presentes em muitas plantas, como p. ex., *P. edulis* e *P. alata*, que contém principalmente flavonas C-glicosiladas.⁴¹ Estudos foram realizados sobre a atividade antioxidante e anti-inflamatória das substâncias presentes em folhas destas espécies, atribuídas principalmente à substâncias da classe dos flavonoides.^{42,43} Zucolotto et al.⁴⁴ (2009) verificaram importante atividade anti-inflamatória para os extratos liofilizados de folhas de *P. edulis*, com significativa diminuição no nível de leucócitos e da atividade da enzima MPO, utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Com relação aos frutos do maracujá, constam na literatura ensaios de capacidade antioxidante com a polpa por meio de métodos como DPPH*, FRAP, ABTS e DMPD, mostrando seu potencial como potente antioxidante.^{45,46} Entretanto, não há estudos relacionados à atividade antioxidante a nível celular com a polpa e cascas de *P. edulis*. Assim, foram realizados ensaios de atividade antioxidante e anti-inflamatória com os extratos do maracujá, em parceria com o grupo CORD (Centre for Oxygen Research & Development), Institut de Chimie, da Université de Liège, Bélgica, sob a supervisão do Prof. Dr. Didier Serteyn. Também foram realizados estudos da capacidade redutora de radicais DPPH* dos extratos de maracujá, no IQSC-USP.

4.2 OBJETIVOS

O objetivo desta parte do trabalho foi avaliar a capacidade redutora de radicais, a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos extratos da polpa de *P. edulis* e *P. alata*, além de cascas de *P. edulis* infectadas ou não com o vírus PWV, a fim de avaliar estas espécies como possíveis fontes de substâncias naturais com efeitos terapêuticos no estresse oxidativo e inflamação. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- Detecção e quantificação da capacidade redutora de radicais dos extratos do fruto de maracujá (*P. edulis* e *P. alata*), usando o método modificado do reagente DPPH[•] proposto por Brand-Williams et al.⁴⁷
- Avaliação do efeito dos extratos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos ativado por PMA, com a produção de EROs medida por quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc);
- Avaliação do efeito dos extratos sobre a desgranulação de neutrófilos ativado por PMA, medida pelo método ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).
- Análise do efeito dos extratos sobre a atividade da MPO purificada, usando o método SIEFED (*Specific Immunologic Extraction Followed by Enzymatic Detection*).

- Comparação da atividade antioxidante dos extratos: polpas de *P. edulis* e *P. alata*, cascas de *P. edulis* infectada com o vírus PWV e cascas de *P. edulis* sadias.

Foram feitos testes complementares visando a possível utilização do maracujá como alimento funcional: a quantificação de proteínas totais pelo método do ácido bicinchoninico (BCA) e a quantificação da flavona isoorientina por CLAE-UV/DAD em todos os extratos analisados nos ensaios de atividade antioxidante.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Materiais, reagentes e padrões analíticos

Materiais: cartuchos com fase estacionária C₁₈ e 400,0 mg de adsorvente (Sep-Pak, Waters Associates, Milford, MA, EUA); membranas hidrofílicas para filtração Millex-HV PVDF (polivinilideno fluorado), com poros de 0,45 µm, diâmetro de 25,0 mm e não estéril (Millipore, New Bedford, MA, EUA).

Solventes e reagentes: etanol (Merck, VWRI, Leuven, Bélgica) e metanol grau analítico (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), acetonitrila grau HPLC (Tedia, EUA), ácido fórmico p.a. da Merck (VWRI, Leuven, Bélgica), água deionizada purificada em sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA). Cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, dimetilsulfóxido (DMSO), peróxido de hidrogênio (30% v/v) e Tween 20 foram fornecidos pela Merck (VWRI, Leuven, Bélgica). Percoll, Para-nitrofenilfosfato (pNPP), nitrito de sódio, albumina de soro bovino (BSA), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), nitrato de bis-N-metil acridina (lucigenina) e PMA foram adquiridos da Sigma (Bornem, Bélgica); Amplex Red foi proveniente da Molecular Probes (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) e DPPH[•] 90% foi fornecido pela Sigma (St. Louis, EUA).

Padrões: rutina 95% e resveratrol da Sigma (St. Louis, EUA), e isoorientina 99% Carl Roth (Karlsruhe, Alemanha).

4.3.2 Preparo de soluções

Para o preparo de 1,0 L da solução salina balanceada de Hank (HBSS) 10X a pH 7,4, foram adicionados 80,0 g de NaCl, 4,0 g de KCl, 0,48 g de Na₂HPO₄, 3,5 g de NaHCO₃, 0,6 g de KH₂PO₄ à 1,0 L de água.

A solução de Percoll 90% foi preparada com a adição de 5,3 mL de HBSS 10X em 48,0 mL de Percoll. A solução de Percoll 70% foi preparada com adição de 10,0 mL de HBSS 1X em 23,3 mL de Percoll 90% e a solução de Percoll 85% foi preparada com adição de 5,0 mL de HBSS 1X em 28,35 mL de Percoll 90%.

A solução do tampão fosfato salino (PBS) a pH 7,4 foi preparada com a adição de 40,0 g de NaCl, 1,0 g KCl, 5,75 g de Na₂HPO₄ e 1,0 g KH₂PO₄ em 1,0 L de água.

No preparo da solução para hemólise dos glóbulos vermelhos foram adicionados 8,02 g de NH₄Cl, 37,0 mg de EDTA, 0,24 mg de NaHCO₃ em 1,0 L de água.

A solução tampão de diluição da MPO foi preparada com adição de 250 mg de BSA e 50,0 µL de Tween 20 em 50,0 mL do tampão PBS. A solução de bloqueio foi preparada com adição de 50,0 mg de BSA em 10,0 mL de PBS; para o preparo da solução tampão de lavagem foram misturados 6,05 g de Tris-(hidroximetil)-aminometano, 9,0 g de NaCl e 1,0 mL de Tween 20 em 1,0 L de água; e para solução reveladora foram adicionados 10,0 µL de H₂O₂ 0,3% em 990,0 µL de água, desta solução retirou-se 11,5 µL e adicionou-se em 988,5 µL de água, a seguir, 100,0 µL desta última solução foram adicionados à 9,88 mL de tampão fosfato com 2,0 µL do reagente Amplex Red.

As soluções-padrão de isoorientina foram preparadas nas seguintes concentrações: $4,0 \cdot 10^{-3}$, $4,0 \cdot 10^{-4}$, $4,0 \cdot 10^{-5}$ mg mL⁻¹ em DMSO. As soluções-controle foram preparadas com um volume equivalente de DMSO.

4.3.3 Amostras

As polpas congeladas dos frutos de *P. edulis* e *P. alata* usadas nos ensaios de atividade no laboratório do CORD, em Liège, Bélgica, e também utilizadas nos ensaios de capacidade redutora de radicais no IQSC-USP, Brasil, foram provenientes da mesma safra dos frutos analisados por CLAE-UV/DAD no IQSC-USP, Brasil (item 2.3.2, capítulo 2).

As cascas de *P. edulis* sadias e infectadas com o vírus PWV analisadas em Liège, Bélgica e também analisados no IQSC-USP foram provenientes do município de Bauru, São Paulo (item 3.3.2, capítulo 3). As cascas foram secas, trituradas e armazenadas conforme procedimento descrito no capítulo 3 (item 3.3.2).

4.3.4 Preparo das amostras e teste da capacidade redutora de radicais do maracujá (método do DPPH')

Foram preparados dois extratos de polpa de *P. edulis* (um extraído com metanol e outro com água), para posterior comparação da capacidade redutora de radicais. A polpa de maracujá (30,0 mL) foi extraída com 10,0 mL de metanol, colocada por 5 minutos no ultrassom e a seguir, centrifugada por 20 minutos a 10000 rpm (25 °C), o sobrenadante resultante foi diluído em 5 diferentes concentrações: 1,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 g L⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado

para o preparo do extrato aquoso, obtendo-se soluções de 5 diferentes concentrações: 35,0; 46,67; 70,00; 93,33; 112,00 g L⁻¹.

No preparo do extrato da polpa de *P. alata* foi adicionado 10,0 mL de metanol a 50,0 mL da polpa e a seguir, seguiu-se o mesmo procedimento utilizado no preparo dos extratos de *P. edulis*. Após a extração, o sobrenadante foi diluído nas concentrações: 15,0; 35,0; 55,0; 75,0; 95,0 g L⁻¹, e estas soluções também foram utilizadas nos ensaios de capacidade antioxidante.

Foram preparados também extratos de cascas dos frutos de *P. edulis* infectados ou não com o vírus PWV: 20,0 mL de metanol foi adicionado a 1,0 g de cascas de maracujá secas e trituradas (granulometria de 1,0 mm), colocados por 5 minutos no ultrassom e a seguir, centrifugados por 20 minutos (10000 rpm, 25 °C), o sobrenadante resultante foi diluído obtendo-se as concentrações finais de: 1,0; 5,0; 15,0; 25,0; 35,0 g de extrato L⁻¹ de solvente para o extrato de cascas saudáveis, e 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 g L⁻¹ para as cascas infectadas. Estes extratos foram também posteriormente utilizados nos ensaios de capacidade antioxidante segundo o método proposto por Brand-Williams et al.⁴⁷, com algumas modificações.^{45,48}

Adicionou-se 0,1 mL da amostra em 3,9 mL da solução metanólica de DPPH* (0,025 g L⁻¹). A mistura foi agitada e deixada no escuro por 60 minutos, a seguir foi realizada a medida da absorbância no espectrofotômetro de absorção no UV-Vis de duplo feixe da Jasco, modelo V-630, a $\lambda = 515$ nm. Foram realizadas medidas das 5 soluções de diferentes concentrações de cada amostra, todas em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado com as soluções metanólicas dos padrões rutina e resveratrol, na faixa de concentração de 0,06 a 1,0 g L⁻¹, para posterior comparação da capacidade antioxidante. Este método quantifica a capacidade redutora de radicais DPPH*, utilizando o parâmetro EC₅₀ (quantidade de antioxidante

necessária para a concentração de DPPH* inicial decrescer para 50%). O EC₅₀ foi obtido através do gráfico %DPPH* reduzido *versus* concentração. O %DPPH* reduzido foi calculado utilizando-se a equação 10.

$$\%DPPH^* = [(A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{branco}}] \cdot 100 \quad (10)$$

Sendo A_{branco} , a absorbância de 0,1 mL de metanol em 3,9 mL de DPPH*, e A_{amostra} , a absorbância de 0,1 mL do extrato em 3,9 mL de DPPH*.

4.3.5 Preparo das amostras para os ensaios de QLuc, ELISA e SIEFED

Foram preparados os extratos de polpa de *P. edulis*, *P. alata* e cascas dos frutos de *P. edulis* infectados ou não com o vírus PWV segundo o procedimento descrito no capítulo 3 (item 3.3.2). Os extratos secos foram resuspendidos em DMSO, na concentração final de 100,0 mg mL⁻¹, alíquotas destes extratos foram diluídas nas concentrações de: 10,0 e 1,0 mg mL⁻¹, as três soluções de cada extrato foram posteriormente utilizadas nos ensaios de atividade antioxidante (itens 4.3.7, 4.3.8, 4.3.9).

4.3.6 Isolamento dos neutrófilos equinos

Os neutrófilos foram isolados do sangue com adição de EDTA (1,6 mg mL⁻¹) como anti-coagulante, retirado da veia jugular de equinos saudáveis, alimentados e criados em condições idênticas (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Liège, Bélgica). Os neutrófilos foram isolados em temperatura ambiente (18-22 °C) por centrifugação (400 x g, 30 minutos, 20 °C) em um gradiente descontínuo de

densidade de Percoll, de acordo com o método de Pycock et al. (1987).⁴⁹ O Percoll é composto por uma solução coloidal de partículas de sílica (15-30 nm de diâmetro) encobertas por polivinilpirrolidona, não tóxica, que não aderem a membranas, sendo ideal para purificação de células e organelas.⁵⁰ A montagem do gradiente foi realizada da seguinte forma: 2,5 mL da solução de Percoll 70% foi adicionada ao fundo de um tubo de centrífuga de 15,0 mL e 2,5 mL da solução de Percoll 85% inserida abaixo da solução menos densa, com ajuda de uma seringa; esse procedimento foi feito de forma lenta e cuidadosa, para não ocorrer mistura das soluções. Após esta etapa, 3,0 mL de sangue foram colocados sobre o gradiente e a seguir, o material foi centrifugado por 45 minutos (1800 rpm, 20 °C).

Após a separação, obteve-se os neutrófilos entre os gradientes 85% e 70%, os glóbulos vermelhos no fundo do tubo, células mononucleadas (linfócitos e monócitos) sobre o gradiente de 70%, e o plasma sobre os mononucleados (Figura 53).

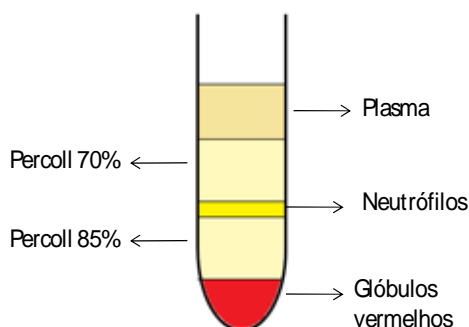


Figura 53. Esquema do isolamento de neutrófilos equinos por gradiente de Percoll.

Foi descartado o plasma, as células mononucleares e aproximadamente 2,0 mL de gradiente para garantir a pureza do material. Os neutrófilos foram recolhidos (aproximadamente 2,0 mL) e colocados em outro tubo de 15,0 mL, onde foi realizada a etapa de lavagem para retirada do excesso de Percoll: foram

adicionados 3,0 mL de HBSS 1X às células e centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm, a 20 °C, o sobrenadante foi então descartado. Após a lavagem, foi realizada uma etapa de hemólise para descontaminação dos glóbulos vermelhos: neste procedimento, adicionou-se 400,0 µL da solução de hemólise dos glóbulos vermelhos, e a seguir, centrifugou-se por 10 minutos, a 2000 rpm, e 20 °C; o sobrenadante foi então descartado e os neutrófilos foram resuspendidos em 2,0 mL de PBS 1X. Para a contagem das células, foram retirados 10,0 µL da suspensão de neutrófilos e adicionou-se 990,0 µL de PBS 1X, e após homogeneização, preencheram-se os quadrantes da câmara de Neubauer com 10,0 µL desta suspensão. Cada lote de neutrófilos foi preparado a partir de 36,0 mL (4 tubos) de sangue de um cavalo. As células foram utilizadas em até 4 horas após o isolamento, e cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes com grupos diferentes de células (cavalos diferentes).

4.3.7 Medida da produção total de EROs produzidas por neutrófilos ativados

A detecção global de EROs produzidas por neutrófilos ativados por PMA foi realizada por quimioluminescência dependente de lucigenina, de acordo com o método de Benbarek et al. (1996)⁵¹ com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em microplacas (White Combiplate, Thermo Labsystems) e a quimioluminescência (QL) foi medida em um Fluorescan Ascent FL (Thermo Fischer Scientific), a 37 °C.

Em microplaca de 96 poços, 161 µL da suspensão de neutrófilos (10^6 neutrófilos/ poço) foram incubados com 2,0 µL dos extratos ou padrões, nas concentrações finais de 1,0; 0,1 e 0,01 mg mL⁻¹ para os extratos e $4 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-4}$,

4.10^{-5} mg mL⁻¹ para o padrão isoorientina, por 10 minutos, a 37 °C. Após a incubação, foram adicionados 25,0 µL de CaCl₂ (1,1 mg mL⁻¹), 2,0 µL de lucigenina (2,5 mg mL⁻¹), e 10,0 µL de PMA na concentração de $1,6.10^{-5}$ M, obtendo-se um volume final de 200 µL em cada poço. Apenas após a adição de PMA a resposta de QL dos neutrófilos foi monitorada por 30 minutos (Multiscan Ascent, Thermo Fischer Scientific), e expressa como o valor integral da emissão total de QL. O controle foi realizado com os neutrófilos incubados com DMSO (solvente utilizado para preparo das amostras e do padrão), considerado como 100% da resposta quimioluminescente. A porcentagem de inibição foi calculada com referência ao controle DMSO.

4.3.8 Medida da MPO total liberada por neutrófilos ativados

Foi realizado o método de ELISA com um kit comercial da BIOCOCODE-HYCEL,⁵² seguindo-se o procedimento do fabricante. O método consiste na verificação da presença de MPO no meio, esta enzima está presente nos grânulos azurófilos e é liberada durante o processo de desgranulação, após a estimulação celular com PMA. Os poços da microplaca são preenchidos com anti-MPO policlonal de coelho purificada; a MPO, quando presente nas amostras, liga-se à fase sólida; após a remoção de substâncias não ligadas (proteínas não específicas) pelo processo de lavagem, os complexos imunes são detectados por fosfatase alcalina conjugada com a anti-MPO policlonal do porco; após outra etapa de lavagem para remoção de substâncias não ligadas, o substrato é adicionado (pNPP), este faz com que a coloração fique amarela, se o anticorpo acoplado com a enzima está presente

(Figura 54). A intensidade da cor amarela é medida por meio de um Multiscan e diretamente proporcional à quantidade de MPO presente na amostra.

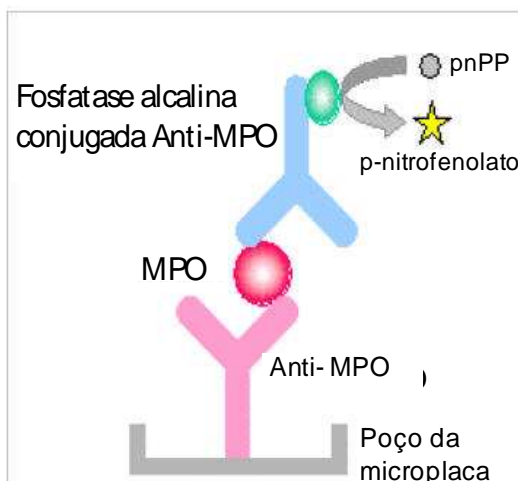


Figura 54. Esquema do princípio do método ELISA.

Inicialmente, adicionou-se em tubos de ensaios 10,0 μL dos extratos (concentração final de 1,0; 0,1 e 0,01 mg mL^{-1}) ou dos padrões (concentração final de $4 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-5}$ mg mL^{-1}) a 940,0 μL da suspensão de neutrófilos (10^6 neutrófilos/ tubo). O material foi agitado lentamente e incubado por 30 minutos, a 37 $^{\circ}\text{C}$; a seguir, foi ativado com a adição de 50,0 μL de PMA ($8,0 \cdot 10^{-7}$ M) em cada tubo, agitou-se lentamente, e o material foi incubado novamente por 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Após a ativação, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm, a 20 $^{\circ}\text{C}$, então recolheu-se 600 μL do sobrenadante para a medida da MPO liberada pelos neutrófilos, e as células depositadas no fundo do tubo foram descartadas.

Foi realizada uma diluição de 200 vezes do sobrenadante recolhido e então adicionou-se 100,0 μL destas soluções diluídas nos poços da microplaca (já revestida com anticorpo), a placa foi então incubada por 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Após este período foi realizada a lavagem por 4 vezes com o tampão de lavagem, a seguir,

adicionou-se 100,0 µL da solução do anticorpo acoplada à enzima fosfatase alcalina e incubou-se por 2 horas a 37 °C, e em seguida realizou-se a lavagem por 4 vezes com o tampão de lavagem e adicionado 100,0 µL do substrato pNPP; a placa foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Após este período, foi adicionada a solução *stop*⁵² e a atividade da fosfatase foi medida em λ= 405 nm com um Multiscan Ascent (Thermo Fischer Scientific).

4.3.9 Medida da atividade da MPO isolada

Um método original chamado SIEFED foi desenvolvido por Franck et al. (2006),²⁵ para detecção específica da MPO neutrofílica equina. O método apresenta 3 procedimentos básicos: o primeiro é a captura da MPO de uma solução ou amostra biológica por anticorpos específicos imobilizados (imunoextração), a segunda etapa consiste na lavagem para eliminação de todas as substâncias (proteínas, substâncias interferentes, etc.) presentes na amostra e que não estão ligadas aos anticorpos, e o terceiro passo é a detecção da atividade da MPO usando um substrato fluorogênico (Amplex Red), H₂O₂ e NaNO₂ (Figura 55).

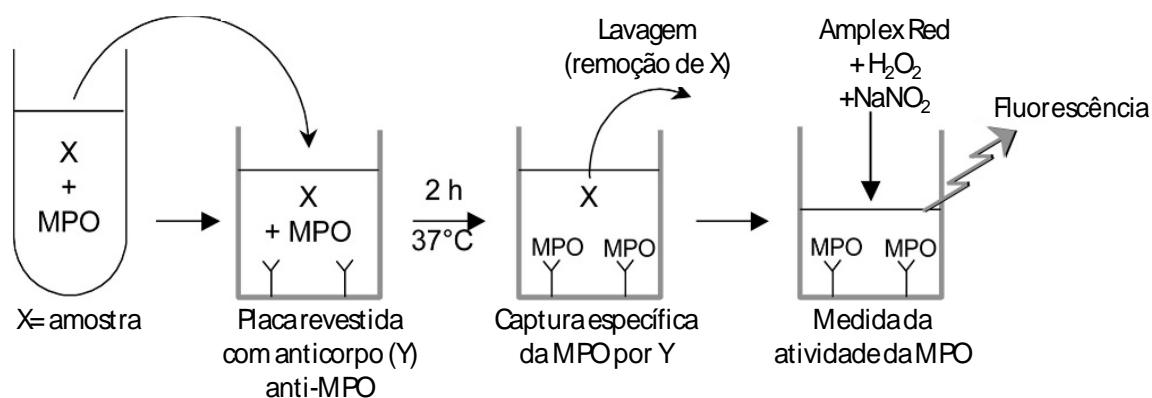


Figura 55. Esquema do procedimento do método SIEFED.

A purificação da MPO equina e a preparação dos anticorpos anti-MPO foram realizadas pelo grupo CORD.⁵³ A MPO foi extraída dos neutrófilos equinos isolados e por meio de dois procedimentos cromatográficos (troca iônica e filtração em gel) foi atingida a pureza > 98% (estabelecida por eletroforese).

Antes do início do ensaio SIEFED foi necessária a preparação da microplaca: foram adicionados aos poços 200,0 µL da solução de anticorpos na concentração de 3,0 µg mL⁻¹ em PBS (600 ng por poço), a placa revestida foi deixada no freezer (4 °C) por toda a noite. Após este período, foi descartada a solução presente na placa e adicionada 200,0 µL da solução de blocagem em cada poço (para que a MPO e outras substâncias não se depositem no fundo da placa); a seguir, deixou-se a placa em repouso por 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, a solução presente nos poços foi descartada e estes foram lavados 4 vezes com a solução de lavagem, após a secagem, a placa estava pronta para realização do ensaio de atividade.

Para preparo das soluções que serão depositadas nas placas foram adicionados a tubos de ensaio: 4,0 µL dos extratos ou padrões, 196 µL do tampão de diluição, e 200,0 µL da solução de MPO equina diluída em tampão de diluição (concentração final de 50,0 ng MPO mL⁻¹), obtendo-se um volume final de 400,0 µL em cada tubo de ensaio, com os extratos e padrões à concentração final de 1,0; 0,1; 0,01 mg mL⁻¹ e 4.10⁻³, 4.10⁻⁴, 4.10⁻⁵ mg mL⁻¹, respectivamente. Agitou-se e incubou-se por 10 minutos a 37 °C, antes da etapa de imunoe extração.

Após a incubação, 100,0 µL de cada solução foram adicionados aos poços da microplaca e incubados por 2 horas a 37 °C para permitir a captura da MPO pelos anticorpos; a seguir, foi realizada a lavagem dos poços 4 vezes com a solução de lavagem, e então a atividade enzimática da MPO foi medida (etapa de revelação)

usando um substrato fluorogênico: Amplex Red (40 μM), H_2O_2 (10 μM), e NaNO_2 (10 mM) como potenciador da reação, para isso foram adicionados 10,0 μL de NaNO_2 e 100,0 μL da solução reveladora (Amplex Red e H_2O_2 , item 4.3.2), quando o H_2O_2 (substrato da MPO) reagiu com o Amplex Red foi formada resorufina, uma substância fluorescente ($\lambda_{\text{excitação}}= 544 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}}= 590 \text{ nm}$) (Figura 56). Foi feita a medida da formação da resorufina por 30 minutos, a 37 $^\circ\text{C}$ com um Fluorescan (Fluorocan Ascent, Thermo Fischer Scientific). O controle foi realizado com o solvente DMSO e o valor da medida da fluorescência foi considerado como 100% da atividade.

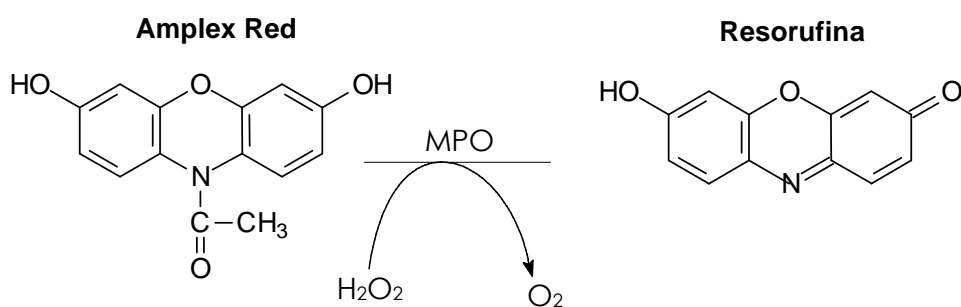


Figura 56. Princípio da revelação usado no método SIEFED.

4.3.10 Determinação de proteínas totais

O método do ácido bicinchonínico (BCA) ou método de Smith⁵⁴ foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais presente nos extratos. Este método se baseia na redução do Cu^{+2} a Cu^{+1} na presença de proteínas em meio alcalino. O BCA é um reagente cromogênico altamente específico para o Cu^{+1} ; esta reação forma um complexo roxo, que absorve fortemente na região de 560 nm e a absorbância é diretamente proporcional à concentração de proteínas (Figura 57).

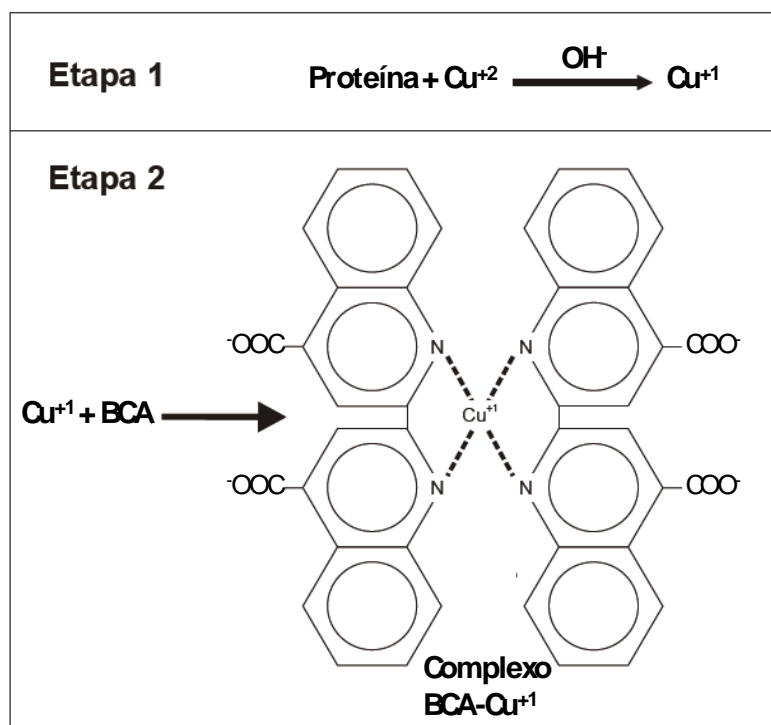


Figura 57. Reações envolvidas no método de BCA.

O reagente foi preparado adicionando-se 10 volumes da solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4% a 50 volumes da solução de BSA. Adicionou-se em uma microplaca 10,0 μL dos extratos (apropriadamente diluídos) e soluções-padrão de BSA em diferentes concentrações (1,00; 0,50; 0,25; 0,12 e 0,00 mg mL^{-1}), a seguir, foi adicionado 200,0 μL do reagente; a microplaca foi deixada em repouso por 30 minutos a 37 °C, e então realizada a leitura em $\lambda = 560 \text{ nm}$ em um Multiscan Ascent (Thermo Fischer Scientific).

4.3.11 Análise quantitativa de isoorientina nos extratos de *Passiflora* por CLAE-UV/DAD

A quantificação de isoorientina foi realizada em todos os extratos (100,0 mg mL⁻¹ em DMSO) submetidos aos testes QLuc, ELISA e SIEFED, por meio do método do padrão externo: a curva analítica foi construída a partir da solução-estoque de isoorientina (400,0 mg L⁻¹ em metanol), preparando-se por diluição soluções na faixa de concentração de 40,0 a 10,0 mg L⁻¹ em metanol. A quantidade de isoorientina foi obtida analisando-se as triplicatas dos cromatogramas dos extratos obtidos em $\lambda = 330$ nm.

As análises cromatográficas dos extratos de maracujá foram realizadas segundo as condições descritas no capítulo 3 (item 3.3.4).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Análise da capacidade redutora de radicais do maracujá

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada em termos da redução do radical DPPH[•] por moléculas antioxidantes, segundo a equação 11.



Sendo R[•] radical, AH antioxidante e A[•] radical inativado.⁴⁷

Os testes foram iniciados seguindo-se o procedimento proposto por Brand-Williams et al. (1995)⁴⁷. A reação entre a amostra e o DPPH[•] foi monitorada por um espectrofotômetro de absorção no UV-Vis, resultando em uma curva cinética que acompanha o decréscimo da absorbância inicial do DPPH[•] em $\lambda = 515$ nm por certo tempo, até que o valor da absorbância torne-se constante (Figura 58). Por meio deste valor de absorbância, o %DPPH[•] reduzido pode ser calculado para obter o EC₅₀. Entretanto, os extratos mostraram lento decréscimo na absorbância (cinética lenta), que resultou em um longo tempo de reação (mais de 7 horas) para alcançar o estado constante (ou atingir o platô). Assim, algumas modificações no procedimento original foram necessárias.

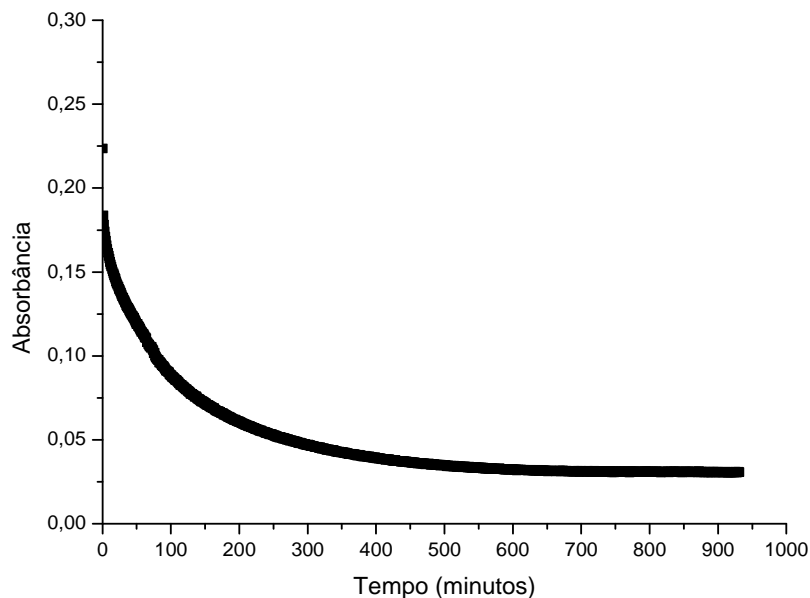


Figura 58. Curva cinética da reação do DPPH[•] com a amostra da polpa dos frutos de *P. edulis* ($\lambda = 515$ nm).

Uma modificação proposta por Kuskoski et al. (2005)⁴⁵ foi utilizada, a qual consiste na medida da absorbância da solução de DPPH[•] com a amostra após 1 hora de reação. Através dos valores de absorbância obtidos para cada amostra, os valores de %DPPH[•] reduzidos foram calculados (Tabela 14) para obtenção dos valores de EC₅₀. Vários testes foram realizados a fim de avaliar o intervalo de concentração adequado para cada extrato atingir o valor de EC₅₀.

Tabela 14. Porcentagem de DPPH* reduzido pelas amostras e padrões

Amostras	Concentração (g L ⁻¹)	%DPPH* reduzido
Polpa <i>P. edulis</i> metanólico	1,00 - 80,00	7,00 - 80,44
Polpa <i>P. edulis</i> aquoso	35,00 - 112,00	34,45 - 80,20
Polpa <i>P. alata</i> metanólico	15,00 - 95,00	7,30 - 70,90
Casca sadia de <i>P. edulis</i>	1,00 - 35,00	9,10 - 63,30
Casca doente de <i>P. edulis</i>	5,00 - 40,00	10,70 - 61,30
Garapa	18,00 - 218,00	8,30 - 66,57
Chá mate	0,52 - 8,27	12,50 - 89,60
Resveratrol (padrão)	0,06 - 1,00	11,60 - 80,60
Rutina (padrão)	0,06 - 1,00	35,20 - 94,00

A capacidade antioxidante foi avaliada por meio do gráfico de %DPPH* reduzido em função da concentração dos extratos. Os valores dos EC₅₀ dos extratos aquoso e metanólico da polpa de *P. edulis* foram calculados usando a equação de decaimento exponencial de primeira ordem ($y = y_0 + A_1 \cdot e^{-x/t}$) obtida do gráfico de cada amostra (Figura 59).

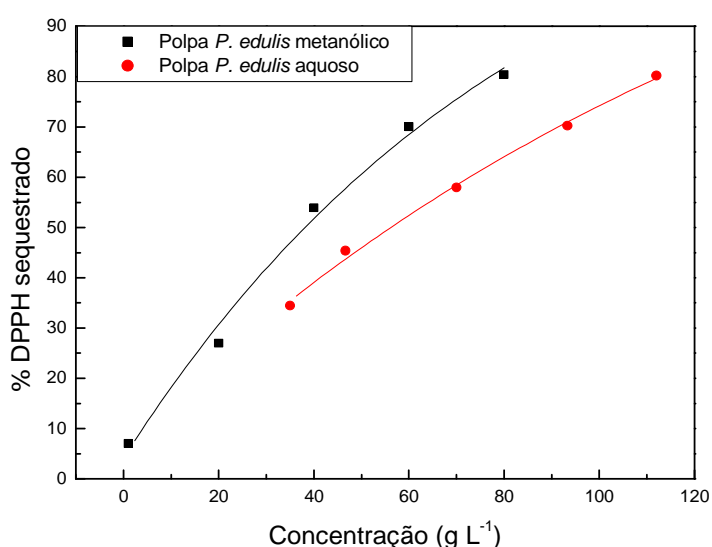


Figura 59. Curvas da capacidade antioxidante para os extratos aquoso e metanólico da polpa de *P. edulis*, obtidas pelo método do DPPH*.

Foi obtido o valor de $EC_{50} = 38,50 \pm 2,28$ para o extrato metanólico de *P. edulis* e $EC_{50} = 57,94 \pm 4,22$ para a amostra aquosa da mesma espécie. Quanto menor o valor do EC_{50} , maior é o consumo do radical DPPH[•] pela amostra e portanto, maior é a capacidade antioxidante. Assim, o extrato metanólico de maracujá (menor EC_{50}) possui maior capacidade antioxidante, sugerindo maior eficiência do metanol comparado com a água para a extração de substâncias com propriedades doadoras de hidrogênio.

Os extratos de polpa e cascas de *P. edulis*, e polpa de *P. alata* foram comparados com os padrões rutina e resveratrol em metanol, além de outros alimentos como garapa e chá mate, extraídos com água.⁵⁵ Verificou-se que a capacidade antioxidante dos extratos e padrões segue a seguinte ordem: rutina > resveratrol > chá mate > cascas de *P. edulis* sadias > cascas de *P. edulis* infectadas com PWV > polpa de *P. edulis* metanólica > polpa de *P. edulis* aquosa > polpa de *P. alata* > garapa (Figura 60).

O estudo da garapa (caldo de cana-de-açúcar) faz parte de outros trabalhos realizados pelo Grupo de Análise Fitoquímica do IQSC-USP ainda em andamento,^{56,57} como parte do doutorado de Tatiana O. Lira.

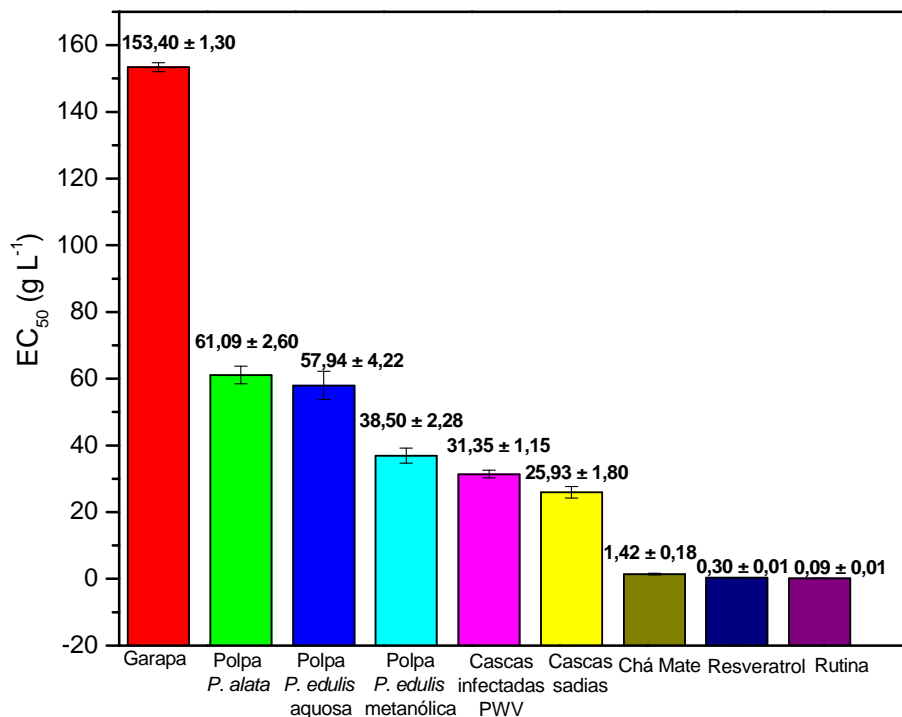


Figura 60. Representação gráfica do EC₅₀ das amostras de alimentos e bebidas e dos padrões.

Por meio do teste de capacidade antioxidante com o reagente DPPH^{*} verificou-se que as cascas de *P. edulis* possuem maior capacidade antioxidante se comparada à polpa dos frutos *P. edulis* e *P. alata*, justificando assim, os testes adicionais de atividade antioxidante (QLuc, ELISA, SIEFED) com estes extratos, estudados como potenciais fontes naturais de substâncias antioxidantes.

4.4.2 Efeito dos extratos e padrões sobre a produção de EROs liberadas por neutrófilos ativado

A influência dos extratos e dos padrões sobre a produção de EROs produzidas por PMN equinos ativado com PMA foi medida por meio da técnica de quimioluminescência dependente de lucigenina.

O PMA é uma substância sintética, conhecida por sua ação promotora de tumores. O PMA ativa a explosão respiratória nos neutrófilos sem se ligar a um receptor de membrana, mimetizando o diacilglicerol (DAG), um ativador fisiológico de PKC, e a ativação forte e contínua desta molécula de sinalização pelo PMA promove a produção intensa e prolongada de EROs.⁵⁸ Assim, o PMA induz uma resposta de QL imediata e duradoura e que é amplificada com a presença da lucigenina.

Nos ensaios de QLuc, os extratos reagem com as EROs produzidas por PMN estimulados e impedem a excitação da lucigenina, diminuindo a resposta quimioluminescente. Esta técnica permite a medida da habilidade das substâncias presentes nos extratos de neutralizar os radicais (principalmente $O_2^{\bullet-}$), reduzindo assim a concentração de EROs responsáveis pela oxidação da lucigenina, ou seja: quanto menor a resposta obtida, maior a atividade antioxidante.

A Figura 61 mostra que o extrato da polpa de *P. edulis* possui o maior efeito inibitório na resposta quimioluminescente produzida por neutrófilos estimulados, mas somente na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, apresentando 98% de inibição de QL, reagindo diretamente com as EROs liberadas pelas células. As cascas sadias e infectadas com vírus PWV também apresentaram alto efeito redutor de EROs liberadas pelas células, apresentando efeitos inibitórios dependentes da concentração, mais pronunciado para o extrato de cascas sadias. As cascas sadias apresentaram 50% de inibição entre as concentrações $0,01$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ enquanto que para as cascas infectadas as concentrações foram entre $0,1$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Estes resultados sugerem que a presença do vírus PWV pode afetar o conteúdo de substâncias antioxidantes nas cascas, necessitando-se de estudos mais aprofundados para a concreta diferenciação das cascas infectadas e sadias.

A polpa de *P. alata* apresentou atividade moderada. Já o padrão isoorientina (3) mostrou efeitos inibitórios em baixas concentrações devido também à pureza da substância (99%), apresentando uma interação direta com as EROs liberadas por PMN, enquanto que os extratos contêm outras substâncias que não necessariamente são redutoras de EROs (por exemplo, os açúcares), misturados às substâncias ativas.

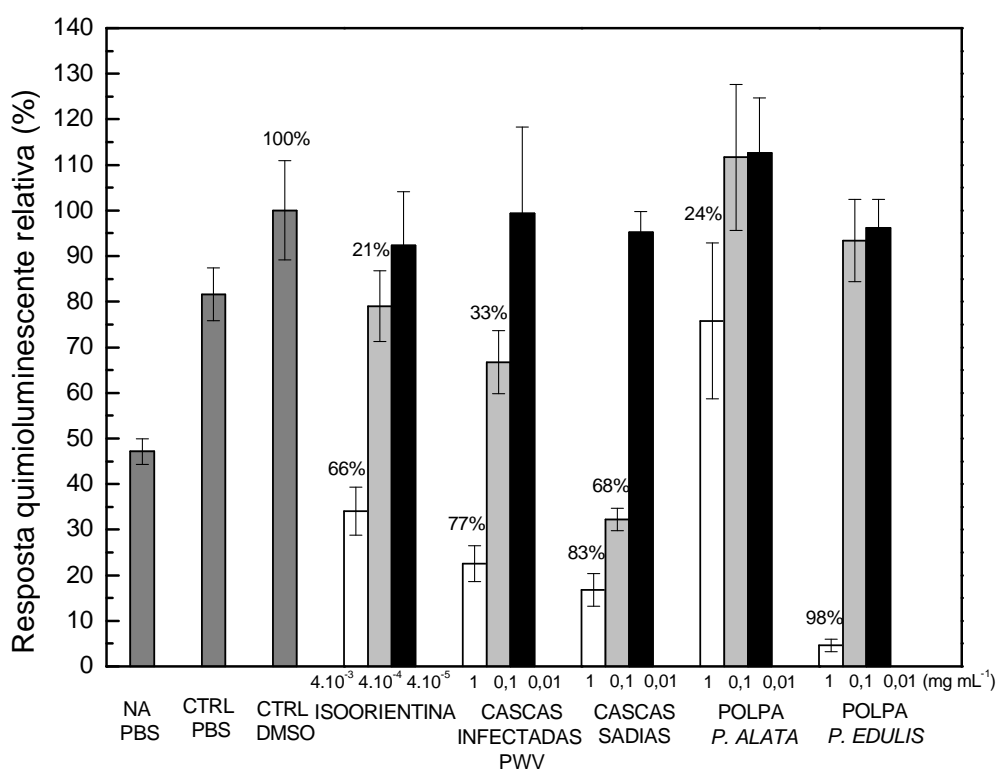


Figura 61. Efeito inibitório dos extratos, padrão e controles sobre as respostas quimioluminescentes das EROs produzidas por PMN equinos ativados por PMA. A porcentagem de inibição indicada no topo das colunas foi calculada com relação ao controle (CTRL) DMSO como 100% (n= 3); NA= controle com DMSO não ativado.

4.4.3 Efeito dos extratos e padrões sobre a liberação de MPO total pelos neutrófilos ativados

Com o intuito de verificar o efeito dos extratos sobre uma função efetora dos neutrófilos independente de oxigênio, foi avaliada sua ação sobre a desgranulação de neutrófilos ativados, utilizando como parâmetro a liberação da enzima MPO.

Neste trabalho foi realizada a medida da MPO total liberada pelos neutrófilos ativados com a PMA, por meio do método ELISA.

Para avaliar a quantidade de MPO liberada utilizou-se o substrato incolor da enzima fosfatase alcalina (pNPP). A hidrólise do pNPP libera o *p*-nitrofenol, ambos compostos incolores. Dependendo do pH, o *p*-nitrofenol pode ser dissociado em *p*-nitrofenolato, um composto amarelo que absorve em $\lambda = 405$ nm (Figura 62), e a velocidade de formação da substância é proporcional à atividade da enzima presente.

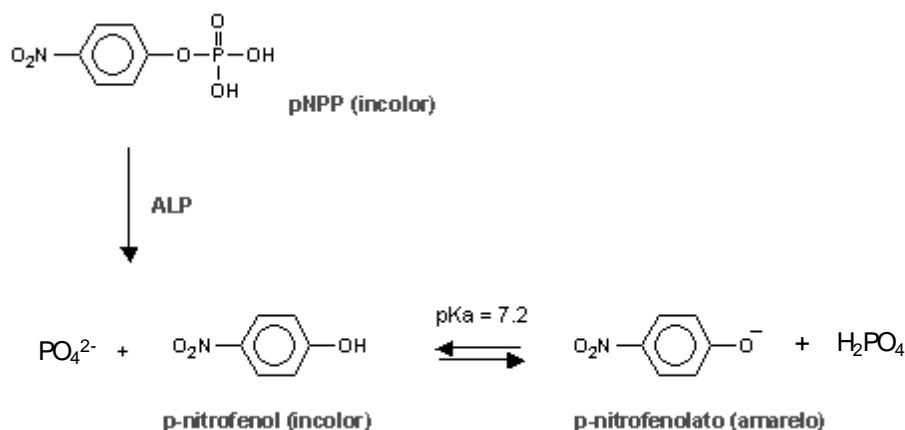


Figura 62. Esquema das reações químicas envolvidas no processo de hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato pela enzima fosfatase alcalina (ALP), resultando na formação do *p*-nitrofenolato.

A inibição da formação de p-nitrofenolato pode ser devido, por exemplo, à inibição da MPO, pelo efeito citotóxico sobre as células ou por afinidade por um receptor do neutrófilo (Figura 63).

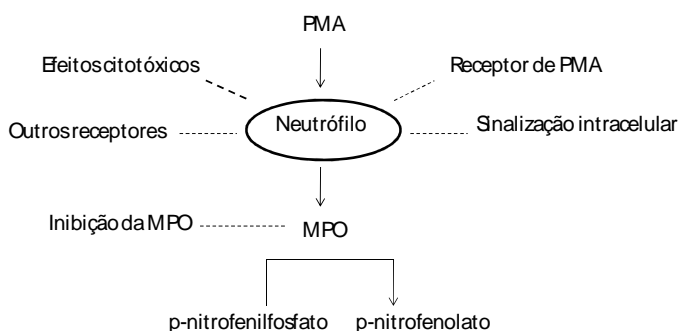


Figura 63. Esquema das diferentes formas de atuação de substâncias sobre a desgranulação neutrofílica. Linhas tracejadas: possíveis modos de ação das substâncias dos extratos sobre a produção de p-nitrofenolato. Esquema adaptado de Johansson et al. (2002).⁵⁹

Observou-se conforme o gráfico da Figura 64 que a ativação dos neutrófilos por PMA dobrou a liberação de MPO no sobrenadante (CTRL PBS), em comparação com as células não estimuladas (NA PBS). Nestes ensaios os extratos não se mostraram muito ativos na inibição da desgranulação, ou seja, não apresentaram grande alteração na quantidade de MPO liberada pelos neutrófilos ativados, com exceção para as cascas doentes de *P. edulis* que apresentaram ligeira inibição da desgranulação (43%), na concentração de 0,5 mg mL⁻¹. Este ensaio é chamado a nível celular, pois as substâncias presentes nos extratos têm que ser capazes de inibir a desgranulação pelos neutrófilos ativados. É importante ressaltar que este teste foi realizado com uma diluição dos extratos de 200 vezes, enquanto nos outros ensaios (QLluc e SIEFED) a diluição foi de 100 vezes.

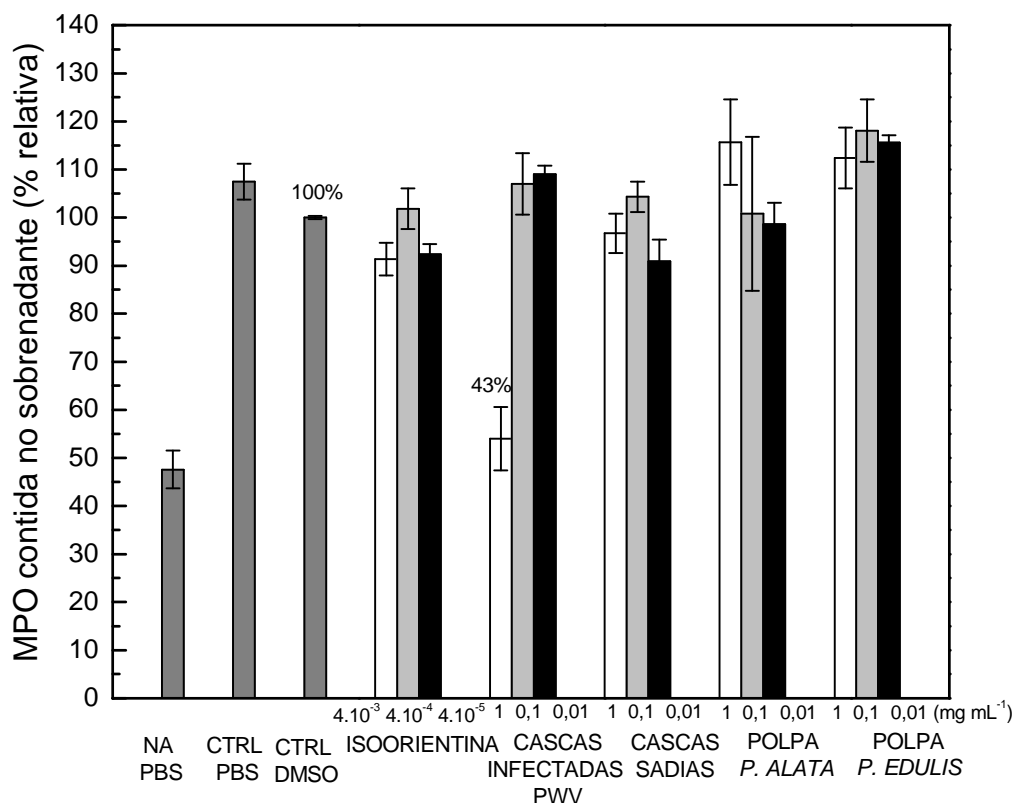


Figura 64. Efeito inibitório dos extratos, padrão e controles sobre a quantidade de MPO total liberada por neutrófilos equinos estimulados por PMA. A porcentagem de inibição indicada no topo das colunas foi calculada com relação ao controle (CTRL) DMSO como 100% (n= 3); NA= controle com DMSO não ativado.

Podemos verificar por meio das medidas realizadas por ELISA que os extratos não influenciam a liberação de MPO no plasma. A quantidade de MPO liberada manteve-se a mesma com ou sem os extratos, com exceção para as cascas infectadas, sugerindo que estes extratos não modificam a desgranulação dos neutrófilos, e não atuam sobre os neutrófilos diretamente, mas interagem com as EROs (item 4.4.2) liberadas por estas células.

4.4.4 Efeito dos extratos e padrões sobre a atividade da MPO equina purificada

A fim de entender o mecanismo de inibição dos neutrófilos equinos, foi estudado o efeito dos extratos e padrões sobre a atividade peroxidásica da MPO purificada, medida pela técnica de SIEFED. Neste ensaio, quando as substâncias presentes nos extratos entram em contato com a enzima MPO, podem inibir seu sítio ativo, bloqueando a produção de resorufina (substância fluorescente, medida em 540 nm), obtendo-se assim uma menor resposta ou maior inibição da atividade da MPO.

A MPO equina purificada usada nestes experimentos foi a mesma usada por Franck et al. (2006)⁵³ para o desenvolvimento da técnica SIEFED.

Foi observado que todos os extratos e o padrão isoorientina apresentaram efeitos inibitórios da atividade da MPO dependentes da concentração (Figura 65). A inibição da atividade da MPO foi similar para os extratos de polpa de *P. edulis* e *P. alata*, atingindo cerca de 50% de inibição na mais alta concentração testada (1,0 mg mL⁻¹). Os efeitos mais potentes de inibição da atividade da MPO isolada foram obtidos para os extratos de cascas de *P. edulis*. Uma similar resposta foi observada para os dois extratos de cascas, exceto na concentração mais elevada, na qual o extrato de cascas infectado apresentou maior inibição da atividade da MPO (98%) em comparação com o extrato de cascas sadias.

A técnica SIEFED tem a habilidade de medir a atividade da MPO purificada depois das etapas de imunoextração e lavagem (com a eliminação do excesso de isoorientina ou extratos testados). Assim, se a inibição da atividade da MPO é observada, esta pode ser atribuída somente à interação direta da substância testada com a enzima, pois as moléculas livres dos extratos foram eliminadas na etapa de

lavagem. Estas observações sugerem que as substâncias polifenólicas presentes nos extratos de cascas de *P. edulis* foram fixadas à MPO (ao sítio ativo da enzima ou de um aminoácido da estrutura da proteína) ou alteraram a estrutura da enzima, levando à inativação da MPO.

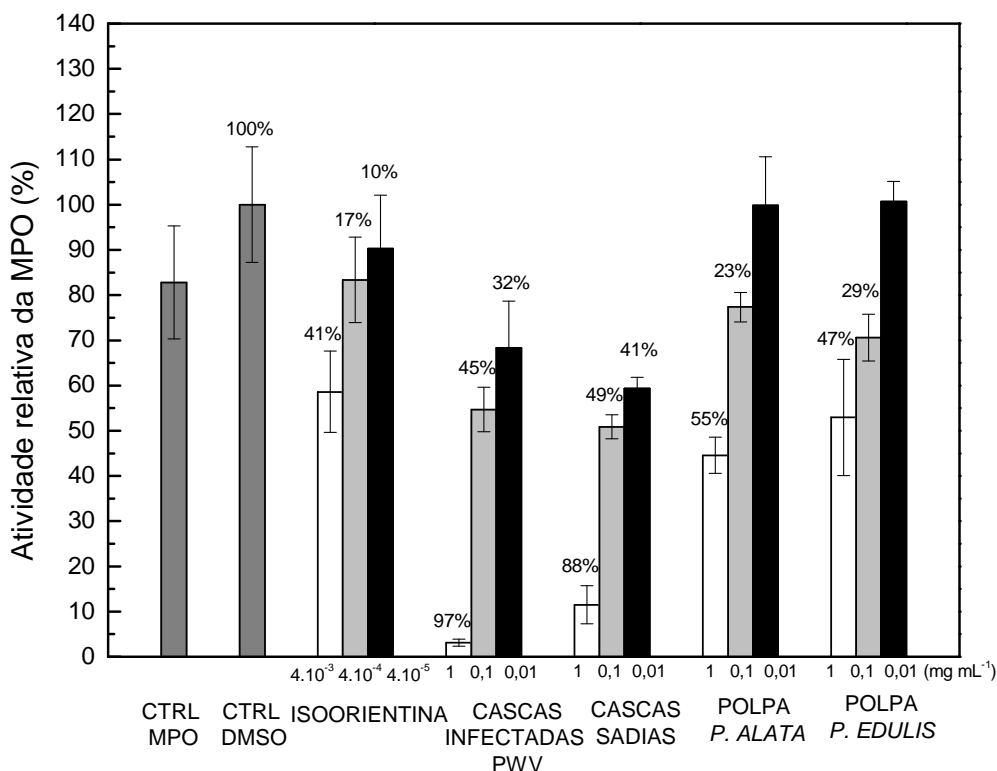


Figura 65. Efeito inibitório dos extratos, padrão e controles sobre a atividade da MPO purificada, medida por SIEFED. A porcentagem de inibição indicada no topo das colunas foi calculada com relação ao controle (CTRL) DMSO como 100% (n= 3).

Obsrvou-se por meio dos testes realizados (QLluc, ELISA e SIEFED) que todos os extratos desempenham um papel importante na inibição dos EROs e MPO, principalmente os extratos de cascas de *P. edulis*, mas não inibem a formação ou liberação desta enzima pelos neutrófilos ativados (desgranulação).

4.4.5 Quantificação de proteínas totais pelo método do BCA e de isoorientina nos extratos de maracujá por CLAE-UV/DAD

A quantificação de proteínas totais e de isoorientina dos extratos foram feitas como testes complementares para avaliar a possível utilização do maracujá como um alimento funcional.

O método de Smith ou BCA é um método simples, rápido, preciso e sensível para a detecção e quantificação colorimétrica de proteínas totais. Além disso, este método foi escolhido (entre outros métodos como o de Lowry e de Bradford) por não haver relatos na literatura de polifenóis como interferentes na determinação de proteínas.⁶⁰

Por meio da curva analítica construída com soluções-padrão de BSA em água (Figura 66) foi encontrada a concentração total de proteínas nas amostras (Tabela 15).

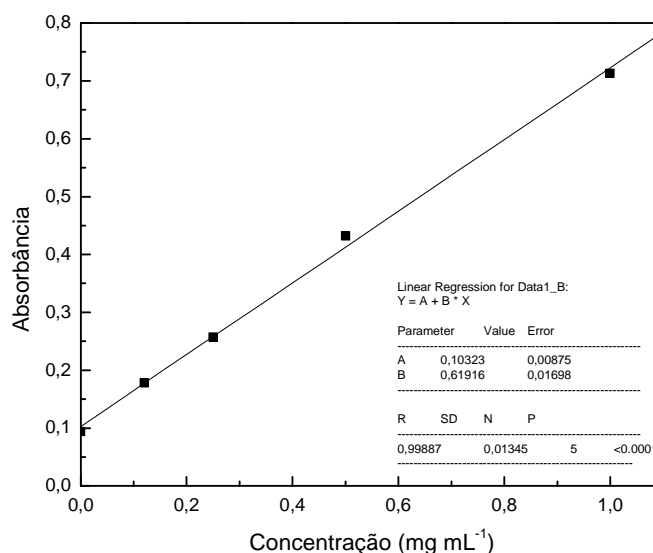


Figura 66. Curva analítica de BSA em água.

Tabela 15. Quantificação de proteínas totais pelo método de Smith⁵⁴

Amostras	Concentração (mg mL ⁻¹)*
Polpa de <i>P. edulis</i>	0,69 ± 0,05
Cascas sadias de <i>P. edulis</i>	18,06 ± 0,51
Cascas de <i>P. edulis</i> com vírus PWV	10,52 ± 0,05
Polpa de <i>P. alata</i>	0,84 ± 0,13

*Concentração a partir de 1,0 mg de extrato seco mL⁻¹

As concentrações de proteínas encontradas nas cascas são consideravelmente altas quando comparadas à polpa dos frutos, sendo um indicativo de suas propriedades nutricionais, além de um possível indicativo como alimento funcional. Observou-se também, que o valor encontrado para as cascas sadias foi quase o dobro da quantidade encontrada nas cascas infectadas com o vírus PWV.

O valor de proteínas totais observado nas cascas pode ser comparado a outros alimentos considerados funcionais como o leite humano, que segundo a literatura⁶¹ possui uma concentração de 15,0 ± 0,1 g L⁻¹, obtida por meio do método BCA.

Além disso, estudos evidenciam que o BCA reage com os aminoácidos essenciais: cisteína e tirosina,⁶² indicando que as cascas de maracujá são boas fontes de proteínas. Assim, estes dados sugerem a necessidade de estudos utilizando este subproduto das indústrias de suco de maracujá na dieta humana, principalmente com a incorporação das cascas do maracujá no enriquecimento de alimentos.

A determinação de isoorientina nos extratos submetidos aos ensaios de atividade QLuc, ELISA e SIEFED (100,0 mg mL⁻¹ em DMSO, item 4.3.5) foi

realizada injetando-se 10,0 µL das amostras no sistema de CLAE-UV/DAD, nas condições cromatográficas otimizadas para quantificação de flavonoides da polpa de *P. edulis* (capítulo 2, item 2.4.2.2).

A polpa do fruto da espécie *P. alata* não apresentou a flavona isoorientina. As análises quantitativas de isoorientina nos extratos de *P. edulis* foram realizadas através do método do padrão externo, utilizando-se a curva analítica construída com o padrão isoorientina (40,0 - 10,0 mg L⁻¹). As quantificações foram realizadas em triplicata (Tabela 16).

Tabela 16. Quantificação de isoorientina presente nas amostras por CLAE-UV/DAD

Amostras	Isoorientina	
	(mg L ⁻¹) ± d.p.*	(mmol L ⁻¹) ± d.p.
Polpa de <i>P. edulis</i>	5,070 ± 0,339	0,011 ± 0,001
Cascas sadias de <i>P. edulis</i>	65,335 ± 0,371	0,145 ± 0,001
Cascas de <i>P. edulis</i> com vírus PWV	48,650 ± 0,332	0,108 ± 0,001

* d.p.= desvio padrão (n= 3)

Na Tabela 16 pode-se observar que o conteúdo de isoorientina nos extratos das cascas de *P. edulis* (sadia e infectada) foi consideravelmente mais elevado em comparação com o extrato da polpa do fruto desta espécie.

Estudos têm mostrado que muitos flavonoides, como a isoorientina, presentes em muitos frutos e vegetais, contribuem significativamente para a atividade antioxidante,^{63,64} anti-inflamatória,⁶⁵ além da significativa inibição da atividade da MPO.⁴⁴

Em concordância com os estudos citados,^{44,63-65} os resultados deste trabalho mostraram uma relação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de isoorientina

presente nos extratos. Os extratos de cascas de *P. edulis* apresentaram alta capacidade redutora do DPPH*, além de alta atividade redutora das EROs, produzidos por neutrófilos ativados, e maior inibição da enzima MPO em todas as concentrações, apresentando também a maior concentração de isoorientina, provavelmente responsável por parte deste efeito inibitório.

O extrato da polpa da espécie *P. alata* não contém a flavona isoorientina, apresentando menor atividade (QL, SIEFED) comparada aos extratos da espécie *P. edulis*, e a quantidade de flavonoides totais (análises por CLAE-UV/DAD, capítulo 2) também é menor no extrato da polpa da espécie *P. alata* ($94,68 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$) do que no extrato da polpa de *P. edulis* ($158,04 \pm 0,60 \text{ mg L}^{-1}$). Assim, o maior efeito inibitório observado para *P. edulis* pode ser consequência da maior concentração de flavonoides nestas amostras, comparado a *P. alata*.

4.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Verificou-se que em comparação com a polpa dos frutos de *P. edulis* e *P. alata*, as cascas de *P. edulis* apresentaram maior atividade inibitória sobre funções efetoras dependentes e independentes de oxigênio dos neutrófilos equinos, incluindo a inibição da produção de EROs e atividade da MPO, além de alta capacidade redutora do DPPH*. Os extratos das cascas de *P. edulis* inibiram a produção de EROs de maneira dose dependente, atuando como redutores diretos de EROs liberados pelas células, porém não modificaram a desgranulação dos neutrófilos estimulados por PMA; todos os extratos e o padrão isoorientina apresentaram efeito de inibição da atividade peroxidásica da MPO de maneira dose dependente. Além disso, os métodos combinados apresentados podem ser um instrumento eficiente para *screening* de atividade antioxidante de drogas ou substâncias naturais com efeitos terapêuticos potenciais no estresse oxidativo e inflamação.

A quantidade de proteínas totais encontrada nos extratos de cascas de *P. edulis* foram altas e comparáveis a alimentos considerados funcionais, como o leite. Além disso, verificou-se que a atividade antioxidante pode estar diretamente relacionada com a concentração de flavonoides, pois os extratos das cascas de *P. edulis* apresentaram o maior conteúdo da flavona isoorientina e também maior atividade, comparadas à polpa da mesma espécie. Estes dados sugerem o potencial das cascas do fruto de maracujá como um alimento funcional, indicando assim a necessidade de maiores estudos farmacológicos e nutricionais com os subprodutos das indústrias de suco de maracujá, visando sua utilização na dieta humana.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MAYER-SCHOL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact ? **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 62-66, 2004.
2. ZYCHLINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J. Introduction: Forum in immunology on neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1289-1291, 2003.
3. SEELY, A. J. E.; PASCUAL, J. L.; CHRISTOU, N. V. Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Critical Care**, v. 7, p. 291-307, 2003.
4. MOORE, P. L.; BANK, H. L.; BRISSIE, N. T.; SPICER, S. S. Phagocytosis of bacteria by polymorphonuclear leukocytes: a freeze-fracture, scanning electron microscope, and thin section investigation of membrane structure. **Journal of Cell Biology**, v. 76, n. 1, p. 158-174, 1978.
5. BURG, N. D.; PILLINGER, M. H. The Neutrophil: Function and Regulation in Innate and Humoral Immunity. **Clinical Immunology**, v. 99, n. 1, p. 7-17, 2001.
6. BROWN, E. L. Phagocytosis. **BioEssays**, v. 17, n. 2, p. 109-117, 1995.
7. BABIOR, B. M. Protein phosphorylation and the respiratory burst. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 264, p. 361-367, 1988.
8. KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L. M. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 6, p. 905-908, 2003.
9. BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.
10. BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTE, J. T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, p. 741-74, 1973.
11. ROSEN, G. M.; POU, S.; RAMOS, C. L.; COHEN, M. S.; BRITIGAN, B. E. Free radicals and phagocytic cells. **Faseb Journal**, v. 9, p. 200-209, 1995.
12. KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophils oxidation production. **Redox Report**, v. 3, p. 3-8, 1997.
13. FRANCK, T.; KOHNEN, S.; DE LA REBIÈRE, G. ; DEBY-DUPONT, G. ; DEBY, C.; NIESTEN, A.; SERTEYN, D. Activation of equine neutrophils by phorbol myristate acetate or N-formyl methionyl-leucyl-phenylalanine induces a different response in reactive oxygen species production and release of active myeloperoxidase. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 130, p. 243-250, 2009.

14. BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A. FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.
15. ALLEN, R. C.; STJERNHOLM, R. L.; STEELE, R. H. Evidence for the generation of an electronic state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 47, n. 4, p. 679-684, 1972.
16. KUDOH, S.; KATSUHIKO, S.; YAMADA, M.; LIU, Q.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Contribution of nitric oxide syntase to human neutrophils chemiluminescence. **Luminescence**, v. 14, n. 6, p. 335-339, 1999.
17. KRICKA, L. J. **Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence**. London: Academic Press, 1984. 602p.
18. KOPPRASCH, S.; PIETZCH, J.; GRAESSLER, J. Validation of different chemilumigenic substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells. **Luminescence**, v. 18, n. 5, p. 268-273, 2003.
19. LI, Y.; ZHU, H.; TRUSH, M. A. Detection of mitochondria-derived oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenina and luminol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1428, p. 1-12, 1999.
20. ALLEN, R. C.; LOOSE, L. D. Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 69, n. 1, p. 245-252, 1976.
21. ANIANSSON, H.; STENDAHL, O.; DAHLGREN, C. Comparison between luminol and lucigenin dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 92, p. 357-361, 1984.
22. CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A. C.; ROBINSON, M. F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **Journal of Immunology**, v. 130, n. 1, p. 2324-2339, 1983.
23. SERTEYN, D.; GRULKE, S.; FRANCK, T.; MOUITHYS-MICKALAD, A.; DEBY-DUPONT, G. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 147, p. 79-93, 2003.
24. BAINTON, D. F.; ULLYOT, J. L.; FARQUHAR, M. G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow: origin and content of azurophil and specific granules. **Journal of Experimental Medicine**, v. 134, p. 907-934, 1971.

25. FRANCK, T.; KOHNEN, S.; DEBY-DUPONT, G.; GRULKE, S.; DEBY, C.; SERTEYN, D. A specific method for measurement of equine active myeloperoxidase in biological samples and in vitro tests. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 4, p. 326-334, 2006.
26. DAHLGREN, C.; KARLSSON, A.; Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, p. 3-14, 1999.
27. PULLAR, J.M.; VISSERS, M.C.M.; WINTERBOURN, C.C. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. **IUBMB Life**, v. 50, p. 259-266, 2000.
28. FRANCK, T.; KOHNEN, S.; GRULKE, S.; NEVEN, P.; GOUTMAN, Y.; PETERS, F.; PIROTTE, B.; DEBY-DUPONT, G.; SERTEYN, D. Inhibitory effect of curcuminoids and tetrahydrocurcuminoids on equine active neutrophils and myeloperoxidase activity. **Physiological Research**, v. 57, p. 577-587, 2008.
29. LEFKOWITZ, D. L.; MILLS, K.; MORGAN, D.; LEFKOWITZ, S. S. Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 199, p. 204-210, 1992.
30. HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.
31. DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflammation Research**, v. 46, n. 10, p. 382-391, 1997.
32. NAKAMURA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Search for naturally-occurring antioxidant chemopreventors on the basis of the involvement of leukocyte-derived reactive oxygen species in carcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 1, p. 115-1120, 2000.
33. GRULKE, S.; BENBAREK, H.; CAUDRON, I.; DEBY-DUPONT, G.; MATHY-HARTERT, M.; FARNIR, F.; DEBY, C.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Plasma myeloperoxidase level and polymorphonuclear leukocyte activation in horses suffering from large intestinal obstruction requiring surgery: preliminary results. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 142-157, 1999.
34. DEATON C.M.; MARLIN D. J.; SMITH N. C.; SMITH K. C.; NEWTON R. J.; GOWER S. M.; CADE S. M.; ROBERTS C. A.; HARRIS P. A.; SCHROTER R. C.; KELLY F. J. Breath condensate hydrogen peroxide correlates with both airway cytology and epithelial lining fluid ascorbic acid concentration in the horse. **Free Radical Research**, v. 38, p. 201-208, 2004b.
35. FRANCK, T.; MOUITHYS, M. A.; KONHEN, S.; NIESTEN, A.; DEBY-DUPONT, G., DE LA REBIÈRE G.; NEVEN, P.; SERTEYN D. A new tool combining four methods to study metabolic, stoichiometric and catalytic antioxidant activities of natural compounds on stimulated neutrophils: application to resveratrol. In: BIOMEDICA, 2009, Liège. **Livro de resumos...** Liège: [s.n.], 2009.

36. HALLIWELL, B.; GUTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? **Journal of Laboratorial Clinical Medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.
37. MEYDANI, M.; MARTIN, A.; RIBAYA-MERCADO, J.; GONG, J.; BLUMBERG, J. B.; RUSSEL, R. M. β -carotene supplementation increases antioxidant capacity of plasma in older women. **Journal of Nutrition**, v. 124, n. 12, p. 2397-2403, 1994.
38. FOSSATI, G.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophils by distinct activation mechanisms: changes in functional response induced by priming with cytokines. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, n. 1, p. 13-19, 2007.
39. MIDDLETON JUNIOR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C.; The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Review**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.
40. JOVANOVIĆ, S. V.; STEENKEN, S.; TOSIĆ, M.; BUDIMIR, M.; SIMIĆ, M. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 4846-4851, 1994.
41. DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1-23, 2004.
42. RUDNICK, M.; OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, p. 719-724, 2007.
43. VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112-119, 2007.
44. ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A. B.; REGINATTO, F. H. SCHENKEL, E. P. Biossay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v. 75, p. 1221-1226, 2009.
45. KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.
46. VASCO, C.; RUALES J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.
47. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-28, 1995.

48. KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3713-3717, 2002.
49. PYCOCK, J.; ALLEN, W.; MORRIS, T. Rapid, single-step isolation of equine neutrophils on a discontinuous Percoll density gradient. **Research in Veterinary Science**, v. 42, p. 4111-412, 1987.
50. MAKLER, A.; STOLLER, J.; MAKLER-SHIRAN, E. Dynamic aspects concerned with the mechanism of separating motile sperm from nonmotile sperm, leukocytes, and debris with the use of highdensity Percoll gradients. **Fertility and Sterility**, v. 70, n. 5, p. 961-966, 1998.
51. BENBAREK, H.; DEBY, G.; DEBY, C.; CAUDRON, I.; MATHY, M.; LAMY, M.; Experimental model for the study by chemiluminescence of the activation of isolated equine leucocytes. **Research in Veterinary Science**, v. 61, n. 1, p. 59-64, 1996.
52. BIOCODE-HYCEL. **Catalog. AEE032**. Bélgica, 2005. Disponível em: <<http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/BCS/AEE032.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2009.
53. FRANCK, T.; GRULKE, S.; DEBY-DUPONT, G.; DEBY, C.; DUVIVIER, H.; PETERS, F.; SERTEYN D. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific equine neutrophils myeloperoxidase measurement in blood. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 412-419, 2005.
54. SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
55. ZERAIK, M. L.; LIRA, T. O.; VIEIRA, A. E.; YARIWAKE, J. H. Comparação da capacidade antioxidante do suco de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener), da garapa (*Saccharum officinarum* L.) e do chá-mate (*Ilex paraguariensis*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóia. **Livro de resumos...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2008, 1 CD-Rom.
56. COLOMBO, R.; LANÇAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 118-124, 2006.
57. VILA, F. C.; COLOMBO, R.; LIRA, T. O.; YARIWAKE, J. H. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 903-908, 2008.
58. DE COURSEY, T. E.; LIGETI, E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 19, p. 2173-2193, 2005.

59. JOHANSSON, S.; GORANSSON, U.; LUIJENDIJK, T.; BACKLUND, A. ; CLAESON, P.; BOHLIN, L. A neutrophils multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 32-41, 2002.
60. ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.
61. KELLER, R. P.; NEVILLE, M. C. Determination of total protein in human milk: comparison of methods. **Clinical Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 120-123, 1986.
62. TYLLIANAKIS, P. E.; KAKABAKOS, S. E.; EVANGELATOS, G. P.; ITHAKISSIOS, D. S. Direct colorimetric determination of solid-supported functional group and ligands using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 219, p. 335-340, 1994.
63. RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, p. 719-724, 2007.
64. KO, F. N.; CHU, C. C.; LIN, C. N.; CHANG, C. C.; TENG, C. M. Isoorientin-6''-O-glucoside, a water-soluble antioxidant isolated from *Gentiana arisanensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1389, p. 81-90, 1998.
65. KÜPELI, E.; ASLAN, M.; GUERBUEZ, I.; YESILADA, E. Evaluation of in vivo biological activity profile of isoorientin. **Journal of Biosciences**, v. 59, p. 787-790, 2004.

CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES GERAIS

5.1 CONCLUSÕES

5.1.1 Avaliação do método desenvolvido por CLAE e sua aplicação

A utilização do planejamento fatorial completo no processo de otimização da extração de flavonoides permitiu a exploração dos efeitos de interação entre as variáveis e a redução dos números de experimentos executados, tornando o procedimento analítico mais rápido e econômico. O método desenvolvido e validado por CLAE-UV/DAD mostrou-se adequado e confiável para a análise quantitativa da flavona isoorientina, presente na polpa dos frutos de *P. edulis*, e também para a quantificação de flavonoides totais desta espécie, apresentando todos os resultados da validação dentro dos parâmetros recomendados pelo protocolo da ICH. A utilização do padrão rutina para expressão de flavonoides totais é uma alternativa de menor custo para análises de rotina, visto que os padrões de flavonas C-glicosilados são de alto custo, importados, e apresentam disponibilidade comercial limitada a pequenas quantidades.

Além disso, os espectros de ultravioleta obtidos nas análises por CLAE-UV/DAD foram de suma importância na identificação dos picos correspondentes aos flavonoides e a identificação da classe destes flavonoides (flavonas). A presença de isoorientina e isovitexina na polpa de *P. edulis* foi confirmada por CL-EM/EM. Além disso, por meio desta técnica foi verificada a presença do ácido málico na polpa de *P. alata*.

A aplicação do método desenvolvido para quantificação dos flavonoides da polpa de *P. edulis* por CLAE-UV/DAD também mostrou-se eficiente para análise dos flavonoides das cascas desta espécie e da polpa de *P. alata*.

5.1.2 Comparação entre as técnicas CLAE e CCDAE

A técnica de CCDAE aplicada na quantificação de isoorientina nas cascas de *P. edulis* apresentou várias vantagens, como a habilidade de se trabalhar com extratos brutos e sem necessidade de *clean up*, possibilidade de análise simultânea de várias amostras, em menor tempo se comparada a CLAE, e principalmente mostrou-se uma técnica mais econômica, com baixo consumo de solvente e resíduos gerados. Além disso, a derivatização com o reagente NP-PEG permitiu obter informações estruturais dos flavonoides, como por exemplo a existência de C-glicosídeos nos extratos, devido às diferentes colorações de fluorescência das substâncias, além de permitir a diferenciação das espécies por *fingerprint*.

Apesar das vantagens que a técnica apresenta, a CCDAE ainda é muito pouco utilizada no Brasil, mas pode ser considerada uma alternativa à CLAE-UV/DAD para quantificação de flavonoides das cascas de *P. edulis*.

5.1.3 Sobre o potencial uso do maracujá como alimento funcional

Encontrou-se maior quantidade de isoorientina e de proteínas nas cascas de *P. edulis* do que na polpa desta espécie. A quantidade de flavonoides totais na polpa de *P. edulis* é maior se comparada a *P. alata* e comparável à outros alimentos, como a garapa. A polpa de *P. alata* não contém isoorientina. O valor de proteínas

encontrado nas cascas do maracujá foi alto e significativo, comparado a alimentos considerados funcionais, como o leite. Estes resultados sugerem a necessidade de maior número de estudos nutricionais e farmacológicos para utilização das cascas do maracujá como um alimento funcional.

Conclui-se por meio dos testes de atividade antioxidante (QLluc, SIEFED método do DPPH*) que as cascas de *P. edulis* apresentaram maior atividade se comparada à polpa dos frutos de *P. edulis* e *P. alata*. Os extratos das cascas de *P. edulis* apresentaram alta atividade inibitória sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados por PMA (sobre a produção de EROs), de maneira dose dependente da concentração, além de alta capacidade redutora do DPPH*, e potente inibição da atividade da MPO isolada. Para os extratos de polpa de *P. edulis* e *P. alata* foi observada resposta similar de inibição da atividade da MPO, porém verificou-se (por ELISA) que os extratos testados não modificam a desgranulação dos neutrófilos, não influenciando a liberação de MPO no plasma.

Além de fornecer informações sobre atividade antioxidante, os métodos combinados (QLluc, ELISA, SIEFED) podem também ser um instrumento eficiente para *screening* de atividade antioxidante e anti-inflamatória de substâncias naturais visando a produção de possíveis fármacos.

A atividade antioxidante pode estar diretamente relacionada com a concentração de flavonoides, pois a quantidade de isoorientina e a atividade das cascas de *P. edulis* são maiores se comparada às polpas de *P. edulis* e *P. alata*. Estes resultados sugerem o potencial das cascas como fonte natural de flavonoides.