

INFLUÊNCIA DA SAPONIFICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE CAROTENOIDES EM MARACUJÁS DO CERRADO

Daniele Cristina Wondracek

Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília-DF / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, W5 Final, 70770-900 Brasília – DF, Brasil

Roberto Fontes Vieira, Dijalma Barbosa da Silva e Tânia da Silveira Agostini-Costa*

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, W5 Final, 70770-900 Brasília – DF, Brasil

Sueli Matiko Sano e Fábio Gelape Faleiro

Embrapa Cerrados, BR 020, km 18, 73010-970 Planaltina – DF, Brasil

Recebido em 10/12/10; aceito em 12/6/11; publicado na web em 8/8/11

SAPONIFICATION INFLUENCE IN CAROTENOID DETERMINATION IN CERRADO PASSION FRUIT. This work describes the evaluation of the effect of saponification process in the carotenoid's content of three species of passion fruit. The results indicated the saponification of the extract was necessary to obtain *cis*-violaxanthin, *trans*-violaxanthin and β -cryptoxanthin hydrolyzed. These compounds were found in fruits of commercial *P. edulis* and yellow wild *P. edulis*. However, the extract saponification did not permitted to obtain free carotenes in fruits of wild purple *P. edulis* and *P. setacea*, and to *trans*-violaxanthin of *P. cincinnata*, therefore saponification was not indicated in the carotenoid analysis of these three accessions of passion fruit.

Keywords: *Passiflora*; carotenoids, passion fruit.

INTRODUÇÃO

São encontrados mais de 600 carotenoides diferentes na natureza. Estes compostos são responsáveis pela cor de uma variedade de frutas, flores, sementes e raízes vegetais, que pode variar entre o amarelo claro, laranja e vermelho. Na alimentação, alguns carotenoides apresentam atividade pró-vitamina A; outros apresentam atividade antioxidante e podem conferir propriedades funcionais aos alimentos, apresentando efeitos benéficos à saúde humana.¹

Embora seja conhecida uma grande diversidade de carotenoides, estes compostos são derivados de uma estrutura básica e apresentam propriedades físicas e químicas em comum.¹ A instabilidade dos carotenoides decorre da estrutura da molécula altamente insaturada, sendo que a degradação ocorre principalmente por oxidação e por isomerização.²

A maioria dos carotenoides hidroxilados (xantofilas) em frutas maduras está esterificada com ácidos graxos. Entretanto, algumas frutas, particularmente aquelas que permanecem verdes quando maduras, tal como o kiwi, têm pouca ou nenhuma esterificação.² A esterificação dos carotenoides parece ser importante para a formação dos cromoplastos, acúmulo e longevidade dos carotenoides e para a coloração dos tecidos. A forma esterificada é considerada mais estável e mais lipossolúvel.³

O maracujazeiro é uma frutífera nativa do Brasil que tem diversas potencialidades. Sua exploração comercial é baseada principalmente na espécie *P. edulis*, conhecida como maracujá-azedo,⁴ seguida pela espécie *P. alata*, conhecida como maracujá doce. O interesse pelo estudo das potencialidades de outras espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* tem crescido no país para a expansão e diversificação desse mercado.

Silva e Mercadante⁵ identificaram na polpa de maracujá-amarelo comercial β -criptoxantina, prolicopeno, *cis*- ζ -caroteno, ζ -caroteno, β -caroteno e 13-*cis*- β -caroteno, além de neurosporeno e γ -caroteno em alguns lotes. Porém, ainda não foram realizados estudos so-

bre o perfil de carotenoides nas espécies nativas e silvestres de maracujá.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da saponificação na determinação de carotenoides na polpa de *P. edulis* comercial e em três espécies nativas de *Passiflora* (*P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. edulis*), procedentes do Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* da Embrapa.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Os frutos dos maracujazeiros nativos foram obtidos do Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, em março e dezembro de 2008: *Passiflora cincinnata* Mast., conhecida como maracujá do cerrado, com polpa creme (subamostra CPAC MJ-26-01 redondo; subamostra CPAC MJ-26-02 cabaça); *P. setacea* D.C., conhecido como maracujá do sono, com polpa amarelo claro (subamostra CPAC MJ-12-01-BRS Pérola do Cerrado); subamostras nativas de *P. edulis* Sims, com polpa amarelo escuro (maracujá amarelo CPAC MJ-36-01, e maracujá roxo CPAC MJ-21-01). Os frutos comerciais de *P. edulis* Sims (maracujá amarelo) foram obtidos em hipermercado de Brasília-DF em 2008.

Extração de carotenoides

Para minimizar a degradação de carotenoides, todas as etapas analíticas foram realizadas em ambiente com temperatura controlada e luminosidade reduzida. A extração de carotenoides foi realizada segundo Rodriguez-Amaya.⁴ Os carotenoides foram extraídos com acetona resfriada a 4 °C e adição de hyfflosuperpel (Diacel), como auxiliar de extração, e 0,1% de antioxidante BHT (butil hidroxitolueno) para minimizar a degradação dos carotenoides. A extração foi repetida até a descoloração total do resíduo da polpa (cerca de cinco extrações sucessivas). Os carotenoides foram transferidos da acetona para o éter etílico, usando um funil de separação.

*e-mail: tania@cenargen.embrapa.br

Saponificação do extrato

Para avaliar o efeito da saponificação, os frutos de cada acesso ou subamostra foram extraídos entre três e quatro repetições com saponificação e três e quatro repetições sem saponificação. Os extratos foram saponificados com KOH 10% em metanol por 16 h à temperatura ambiente. No dia seguinte, o -OH foi eliminado, lavando-se o extrato etéreo exaustivamente com água (cerca de 7 L) em funil de separação até pH neutro, indicado pela ausência de coloração da fenoftaleína na água de descarte. O extrato etéreo foi evaporado a vácuo (temperatura inferior a 35 °C) até quase secura. O resíduo do extrato foi transferido para um *vial*, seco em nitrogênio, diluído com hexano (4 mL) e adicionado de BHT; o ar foi retirado com uma seringa de agulha fina (insulina). A tampa e o selo do *vial* foram envolvidos com parafilme e o extrato foi mantido sob refrigeração (-20 °C) até o momento da análise por CLAE, que foi feita dentro de sete dias. Antes da análise, o extrato foi seco com nitrogênio, diluído com acetona grau CLAE e filtrado em Millex LCR com membrana PTFE modificada 0,45 µm 13 mm (Millipore).

Separação de carotenoides

A separação foi realizada por CLAE segundo Kimura e Rodriguez-Amaya⁶ e Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya,⁷ utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian) equipado com detector por arranjo de fotodiodos (PDA PS-335), bomba (PS-240), injetor (PS-410) e software Galaxie 1.9, em ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 °C). Os carotenoides foram separados em coluna C₁₈ ODS-2 150 x 4,6 mm 3 µm (Waters), utilizando acetonitrila (contendo 0,05% de trietilamina):metanol: acetato de etila em gradiente de 95:5:0, durante os 20 min iniciais da corrida, e 60:20:20 entre 20 e 60 min de corrida; o tempo de equilíbrio da coluna foi de 20 min. O fluxo utilizado foi 0,5 mL min⁻¹ e o volume de amostra injetado foi 10 µL. A solução de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina foi filtrada em membrana PTFE modificada 0,45 µm para eliminação de resíduos.

Identificação dos carotenoides

A identificação dos carotenoides analisados por CLAE foi realizada através dos espectros de absorção no UV-visível fornecidos pelo detector por arranjo de fotodiodos, pelo tempo de retenção e por cocromatografia com padrões. Os espectros foram adquiridos entre 500 e 360 nm e os cromatogramas foram processados no comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) de cada carotenoide. A identificação de cada carotenoide purificado em coluna aberta, posteriormente utilizado como padrão em CLAE, foi previamente realizada através do perfil do espectro de absorção em UV-visível (espectrofotômetro Lambda 25 Perkin Elmer), através dos valores de R_f em camada delgada (utilizando éter de petróleo:acetato de etila na proporção 9:3 como fase móvel) e por reações químicas específicas, como isomerização *cis-trans* com iodo, ausência ou presença de cetocarotenoides (por reação com boroidreto de sódio), teste para identificação de epóxidos (através da exposição da camada delgada a vapores de HCl) e localização do grupo epóxido (por adição de HCl diluído na solução etanólica do pigmento e posterior registro do deslocamento máximo de absorção em espectrofotômetro).²

Quantificação dos carotenoides e obtenção de padrões

Os carotenoides foram quantificados através de curva de calibração externa e fator de correção, conforme Kimura e Rodriguez-Amaya.⁶ O padrão de *trans*-β-caroteno foi fornecido pela DSM

Nutritional Products (Suíça). Os demais padrões foram purificados, conforme Rodriguez-Amaya,² por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária uma mistura 1:2 de óxido de magnésio:hyflosupercel (Diacel), a partir da polpa de maracujá-amarelo comercial. O teor de carotenoide presente em cada fração eluída da coluna foi determinado em espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo lambda 25, a partir das respectivas absorbâncias máximas em éter de petróleo, utilizando-se os valores de absorvidade tabelados por Davies⁸ e considerando-se a pureza de cada fração avaliada por CLAE, conforme Kimura e Rodriguez-Amaya.⁶ As frações de carotenoides isolados e avaliados foram utilizadas como padrão nas análises dos frutos de maracujá por CLAE. Os cálculos de concentração de carotenoides na polpa dos frutos foram corrigidos de acordo com o grau de pureza de cada padrão. O 13-*cis*-β-caroteno e o *cis*-ζ-caroteno foram estimados utilizando-se as curvas dos respectivos carotenoides *trans*, conforme Silva e Mercadante.⁵ O procedimento utilizado para a estocagem dos padrões purificados foi o mesmo realizado para o armazenamento das amostras. Pontos de concentração conhecidos de *trans*-β-caroteno foram injetados duas a três vezes por semana durante a determinação de carotenoides das amostras, para verificar a reprodutibilidade da resposta obtida e para avaliar o fator de resposta dos diferentes carotenoides.

Análise de dados

Para avaliação da reprodutibilidade das análises de *trans*-β-caroteno e a estabilidade do padrão congelado, foi traçada a carta controle de amplitude móvel (variabilidade) das áreas dos picos produzidos. A comparação dos métodos de extração, com e sem saponificação, foi feita a partir da concentração de cada carotenoide, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5% com auxílio do software SAS versão 9.0.⁹

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variabilidade de áreas de *trans*-β-caroteno após injeções sucessivas durante 28 dias mostrou a estabilidade deste padrão quando estocado em hexano (-20 °C) (Figura 1). Após este período, o aumento da variabilidade de área indicou perda de estabilidade do mesmo padrão. As análises apresentaram repetibilidade para concentrações entre 10 e 40 µg mL⁻¹.

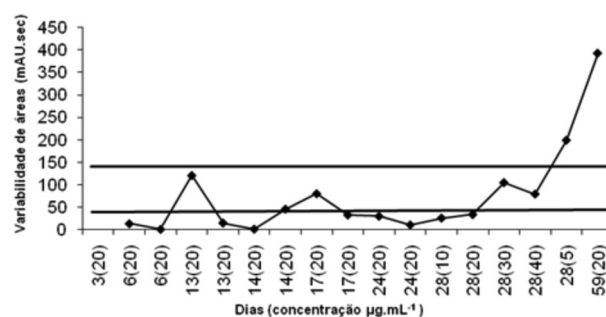


Figura 1. Variabilidade de áreas de *trans*-β-caroteno após injeções sucessivas durante 28 dias

Foram isolados os padrões de *trans*-violaxantina (pureza = 97%; r = 0,999), β-criptoxantina (pureza = 86%; r = 0,999), prolicopeno (pureza = 92%; r = 0,999), luteína (pureza = 94%; r = 0,999) poli-*cis*-caroteno (pureza = 91%; r = 0,999), *trans*-ζ-caroteno (pureza = 97%; r = 0,999) e *cis*-violaxantina (pureza = 99%; r = 0,993). O *trans*-β-caroteno comercial apresentou pureza

de 96% ($r = 0,997$). O limite inferior de linearidade da curva de calibração foi de 8,2 e 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o *trans*- β -caroteno e para o *trans*- ζ -caroteno, tendo sido observada linearidade de resposta até 40,0 e 34,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

A separação dos carotenoides em diferentes espécies de *Passiflora* pode ser observada na Figura 2, sendo que o perfil de carotenoides diferiu entre as três espécies avaliadas.

Verificaram-se diferenças significativas entre as médias das concentrações de carotenoides em amostras saponificadas e não saponificadas de frutos de *P. edulis* comercial (Tabela 1). Nas subamostras de *P. edulis* roxo nativo, entre os seis carotenoides encontrados, foram verificadas diferenças significativas em cinco deles. Já em *P. edulis* amarelo nativo entre os oito carotenoides encontrados foram observadas diferenças em três deles. Em *P. setacea* a saponificação exerceu efeito significativo nos três carotenoides analisados e em *P. cincinnata* a saponificação não apresentou influência.

Para o β -caroteno (Figura 3), tanto na forma *cis* quanto na forma *trans*, a saponificação apresentou diferença significativa apenas em *P. setacea*, indicando perdas de β -caroteno em função da saponificação desta espécie. O efeito observado pode ser resultado da interação com algum componente pró-oxidante presente na matriz de *P. setacea*. No trabalho de Kimura et al.,¹⁰ a saponificação a frio do extrato de carotenoides do mamão, o mesmo método empregado no presente estudo, não influenciou o teor de β -caroteno.

Os carotenos livres *cis* e *trans*- ζ -caroteno, poli-*cis*-caroteno (estrutura não identificada) e prolicopeno foram encontrados nas

amostras saponificadas e não saponificadas dos três acessos de *P. edulis*; traços de *cis*- ζ -caroteno também foram encontrados nas amostras não saponificadas de *P. setacea*. Os tratamentos indicaram perda de ζ -caroteno, de poli-*cis*-caroteno e de prolicopeno em função da saponificação dos extratos de *P. edulis* roxo nativo e *P. edulis* comercial.

A xantofila β -criptoxantina também foi detectada apenas em *P. edulis*, sendo que a saponificação apresentou influência positiva nas três subamostras. Ao contrário dos resultados encontrados para os carotenos livres acima, os resultados indicam que a β -criptoxantina (carotenoide hidroxilado) se encontrava predominantemente na forma esterificada. Nas polpas de *P. edulis* amarelo e roxo nativos esse carotenoide só foi encontrado nas amostras saponificadas. No estudo de Konnings e Roomans¹¹ a concentração de β -criptoxantina em tangerina também foi maior nas amostras saponificadas, comparadas com as amostras não saponificadas, indicando que parte desse carotenoide se encontrava esterificado nessa fruta.

A violaxantina foi encontrada apenas nas amostras saponificadas de *P. edulis* comercial, *P. edulis* amarelo nativo e *P. setacea*; a forma *cis* foi encontrada somente nas amostras saponificadas de *P. edulis* comercial e *P. setacea*, indicando que, nestas espécies, a saponificação é importante para liberar os ésteres de violaxantina. Entretanto, em *P. cincinnata*, a *trans*-violaxantina foi detectada apenas nas amostras não saponificadas, indicando que esse carotenoide não se encontra esterificado e que a saponificação não é necessária nesta espécie. Cano et al.¹² verificaram que a saponificação liberou a β -criptoxantina-5,6-epóxido, a violaxantina e

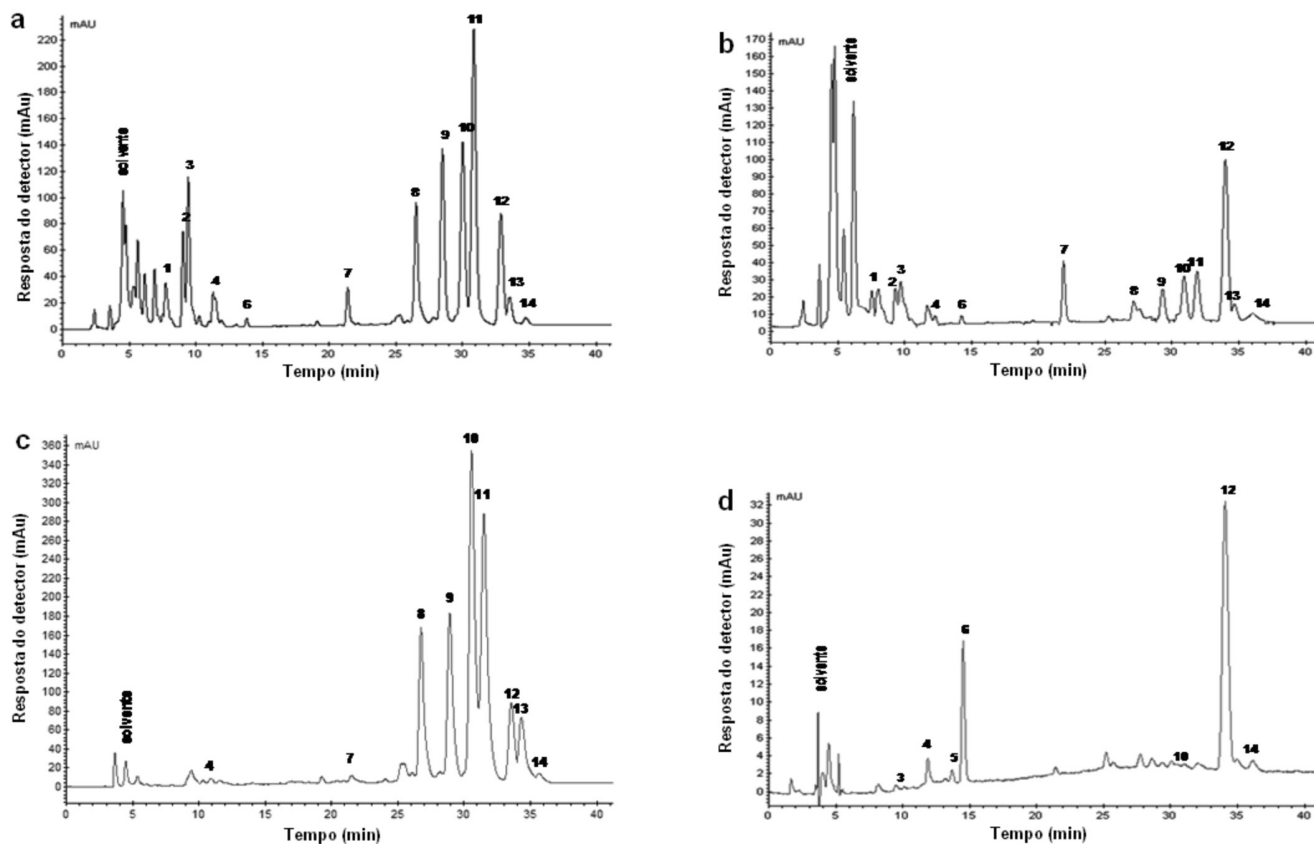


Figura 2. Separação de carotenoides por CLAE, detectados no comprimento de onda máximo (λ_{max}). A) *P. edulis* comercial a, com elevado teor de *cis*- e *trans*- ζ -caroteno (picos 10 e 11). B) *P. edulis* comercial b, com elevado teor de β -caroteno (pico 12). C) *P. edulis* roxo nativo. D) *P. setacea*. 1. Neoxantina, 2. *Trans*-violaxantina, 3. *Cis*-violaxantina, 4. Anteraxantina, 5. Luteína, 6. Zeaxantina, 7. β -criptoxantina, 8. Prolicopeno, 9. Poli-*cis*-caroteno, 10. *Cis*- ζ -caroteno, 11. *Trans*- ζ -caroteno, 12. *Trans*- β -caroteno, 13. Fitoflueno, 14. 13-*cis*- β -caroteno

Tabela 1. Concentração de carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras saponificadas e não saponificadas de maracujazeiros

Espécies	<i>P. cincinnata</i> 'redondo'		<i>P. setacea</i>		<i>P. edulis</i> amarelo nativo		<i>P. edulis</i> roxo nativo		<i>P. edulis</i> comercial	
	c/ sap ¹	s/ sap ²	c/ sap	s/ sap	c/ sap	s/ sap	c/ sap	s/ sap	c/ sap	s/ sap
Carotenoide	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) Média \pm DP									
<i>trans</i> -violaxantina	-	tr	tr	-	0,50 \pm 0,05	-	-	-	0,50 \pm 0,10	-
<i>cis</i> -violaxantina	-	-	0,20 \pm 0,06	-	-	-	-	-	1,20 \pm 0,20	-
β -criptoxantina	-	-	-	-	0,24 \pm 0,02	-	0,20 \pm 0,03	-	1,80 \pm 0,20a	0,40 \pm 0,20b
prolicopeno	-	-	-	-	3,00 \pm 0,20a	3,03 \pm 0,08a	5,30 \pm 0,2a	5,90 \pm 0,50b	0,31 \pm 0,18a	0,87 \pm 0,09b
poli- <i>cis</i> -caroteno	-	-	-	-	1,20 \pm 0,03a	1,30 \pm 0,10b	3,07 \pm 0,15a	3,40 \pm 0,20b	0,80 \pm 0,10a	1,27 \pm 0,06b
<i>cis</i> - ζ -caroteno	-	-	-	tr	6,30 \pm 0,20a	6,20 \pm 0,25a	10,72 \pm 0,42a	12,10 \pm 0,70b	1,00 \pm 0,30a	2,00 \pm 0,10b
<i>trans</i> - ζ -caroteno	-	-	-	-	5,40 \pm 0,20a	5,40 \pm 0,28a	9,94 \pm 0,36a	10,90 \pm 0,30b	1,10 \pm 0,20a	2,30 \pm 0,10b
<i>trans</i> - β -caroteno	0,06 \pm 0,00a	0,06 \pm 0,00a	0,40 \pm 0,07a	0,70 \pm 0,09b	2,80 \pm 0,06a	2,79 \pm 0,18a	2,39 \pm 0,09a	2,60 \pm 0,10a	5,90 \pm 1,70a	7,80 \pm 0,80a
13- <i>cis</i> - β -caroteno	-	-	-	0,08 \pm 0,00	0,40 \pm 0,03a	0,38 \pm 0,08a	tr	tr	0,29 \pm 0,07a	0,37 \pm 0,02a

Médias das concentrações dos carotenoides nos dois métodos de extração (c/ sap e s/ sap) em cada acesso seguidas por letras iguais na linha não diferem significativamente entre si pela análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). ¹c/ sap: com saponificação. ²s/ sap: sem saponificação. tr: traços.

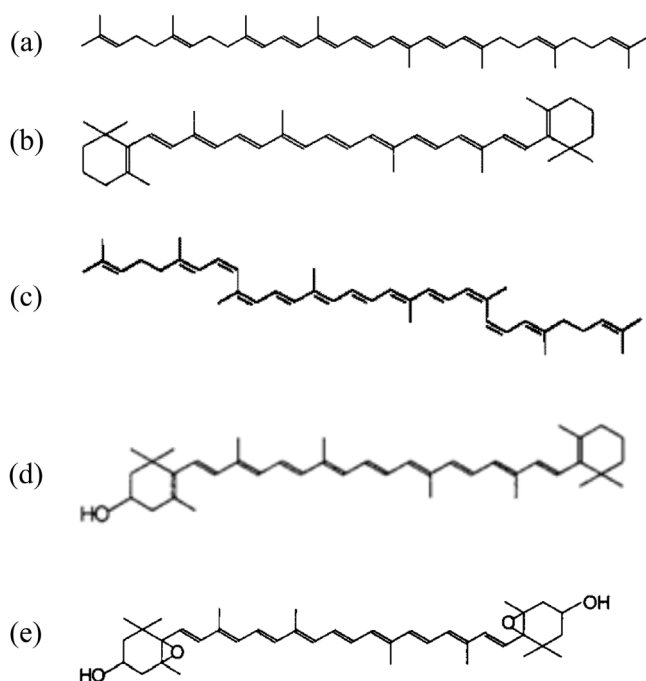


Figura 3. Estrutura química do ζ -caroteno (a), β -caroteno (b), prolicopeno (c), β -criptoxantina (d), violaxantina (e)

a luteína de seus ésteres correspondentes em extrato de mamão.

A degradação e a perda do conteúdo de carotenoides totais ou de carotenoides individuais durante a saponificação têm sido descritas por diversos autores. Entretanto, essa perda depende das condições da saponificação e da composição da amostra.¹³ Neste estudo, mesmo os extratos não saponificados apresentaram teores significativos de isômeros *cis*. O ζ -caroteno em extratos não saponificados de acessos nativos de *P. edulis*, por exemplo, ocorreu predominantemente na forma *cis*, indicando a presença destes isômeros na natureza, independente da saponificação analítica.

Considerando uma avaliação do valor nutricional e das propriedades funcionais associadas aos carotenoides, os extratos das espécies *P. cincinnata* e *P. setacea* podem ser obtidos sem saponificação, já que apresentam baixos teores de carotenoides,

com predomínio das formas livres. Interessante observar que, na polpa de *P. cincinnata*, a violaxantina presente (traços) se encontra na forma livre; na polpa de *P. setacea* a violaxantina encontra-se esterificada. Para a espécie *P. edulis*, que apresenta teores mais significativos de carotenoides hidroxilados, incluindo β -criptoxantina, que possui atividade pró-vitamina A, o uso da saponificação torna-se importante. A subamostra de casca roxa apresenta quantidades muito baixas de β -criptoxantina; neste caso, a necessidade de saponificação deve ser avaliada. Os carotenoides da subamostra de casca amarela mostraram-se mais resistentes à saponificação, com menores perdas de carotenos. Na análise de carotenoides de *P. edulis* comercial a saponificação acarretou perdas significativas de carotenos livres, sendo apropriado empregar os dois procedimentos para esta espécie, usando o extrato não saponificado para a análise de carotenos livres e a saponificação para a análise de carotenoides esterificados.

CONCLUSÃO

O uso da técnica de saponificação dos extratos foi importante para promover a hidrólise de carotenoides hidroxilados, que se encontravam parcial ou totalmente esterificados, como a violaxantina e a β -criptoxantina presentes nos frutos dos acessos de *P. edulis* amarelo nativo e *P. edulis* comercial. Para a determinação da composição completa de carotenoides nestas espécies, os resultados obtidos indicaram a necessidade do emprego das duas técnicas de extração, com e sem saponificação. Entretanto, o processo de saponificação do extrato provocou a degradação parcial de carotenos livres presentes nos frutos de *P. edulis* roxo nativo e de *P. setacea* e degradação de *trans*-violaxantina em *P. cincinnata*. Estes resultados indicaram que a saponificação pode ser dispensada na determinação de carotenoides destes três acessos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Biodiversidade Brasil-Itália, Programa Agrofuturo, CNPq e à Embrapa pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Britton, G.; *FASEB J.* **1995**, *9*, 1551.

2. Rodriguez-Amaya, D. B.; *A Guide to Carotenoid Analysis in Food*, ILSI Press: Washington, 2001.
3. Minguez-Mosquera, M. I.; Hornero-Mendez, D.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 640.
4. Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. Em *Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas*; Silva, A. G.; Albuquerque, A. C. S.; Manzano, N. T.; Silva, R. C.; Russell, N. C., eds.; Embrapa: Brasília, 2008.
5. Silva, S. R.; Mercadante, A. Z.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2002**, *22*, 254.
6. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D. B.; *Food Chem.* **2002**, *78*, 389.
7. Azevedo-Meleiro, C. H.; Rodriguez-Amaya, D. B.; *J. Food Compos. Anal.* **2004**, *17*, 385.
8. Davies, B. H. Em *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*; Goodwin, T. W., ed.; Academic Press: London, 1976, vol. 2.
9. SAS Institute Inc. 2002; *SAS/STAT user's guide. Version 9.0*; SAS Institute, United States, 2002.
10. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D. B.; Godoy, H. T.; *Food Chem.* **1990**, *35*, 187.
11. Konnings, E. J. M.; Roomans, H. H. S.; *Food Chem.* **1997**, *59*, 599.
12. Cano, M. P.; Ancos, B.; Lobo, M. G.; Monreal, M.; *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *71*, 351.
13. Oliver, J.; Palou, A.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 543.