

## APLICAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS NA DETERMINAÇÃO DE PICEATANNOL E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SEMENTES DE MARACUJÁ (*PASSIFLORA* SPP.)

Ana Paula Lourenção Zomer<sup>1</sup>, Carina Alexandra Rodrigues<sup>2</sup>, Eliza Mariane Rotta<sup>3</sup>, Nilton Tadeu Vilela Junqueira<sup>4</sup>, Jesuí Virgílio Visentainer<sup>5</sup>, Liane Maldaner<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Mestranda, Programa de pós-graduação em Química, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá-UEM. Bolsa CAPES. ana.p.zomer15@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutoranda, Programa de pós-graduação em Química, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá-UEM. Bolsa CAPES. carinarodrigues4944@hotmail.com

<sup>3</sup>Doutora, Programa de pós-graduação em Química, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá-UEM.

<sup>4</sup>Doutor, Pesquisador, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Cerrados, Brasília/DF. nilton.junqueira@embrapa.br

<sup>5</sup>Professor, Pesquisador, Doutor, Programa de Pós-graduação em Química, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá-UEM. jvvisentainer@uem.br

<sup>6</sup>Orientadora, Professora, Doutora, Programa de Pós-graduação em Química, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá-UEM. lianemaldaner@gmail.com

### RESUMO

Uma estratégia analítica aprimorada baseada no método de extração QuEChERS combinado com a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) foi desenvolvida, validada e aplicada na determinação de piceatannol em sementes de maracujá. O método QuEChERS-HPLC-DAD foi aplicado com sucesso para a determinação de piceatannol em quatro espécies de sementes de maracujá, *Passiflora edulis* Sims “Flavicarpa”, *Passiflora edulis* “Sims”, *Passiflora allata* Curtis e *Passiflora ligularis* Juss; sendo que, para as duas últimas espécies pela primeira vez. Dentre as espécies, as maiores quantidades de piceatannol foram encontradas nas sementes de *P. allata* Curtis e *P. edulis* “Sims”, sendo  $20,8 \pm 0,4$  e  $14,6 \pm 0,2$  mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Da mesma forma, a atividade antioxidante também foi avaliada e, em geral, o potencial antioxidante foi mais elevado quanto maior a concentração de piceatannol nos extratos das sementes de maracujá. Os resultados obtidos destacam que as sementes de maracujá são fontes ricas de piceatannol, com potencial antioxidante, impulsionando novas aplicabilidades para esse subproduto.

**PALAVRAS-CHAVE:** HPLC-DAD; *P. edulis* Sims “Flavicarpa”; *P. edulis* “Sims”; *P. allata* Curtis; *P. ligularis* Juss.

### 1 INTRODUÇÃO

A família *Passifloraceae* compreende cerca de 18 gêneros, sendo o gênero *Passiflora* o maior e mais representativo em número de espécies e também o mais economicamente importante. As espécies de *Passiflora* incluem plantas ornamentais e medicinais, bem como frutas comestíveis e são amplamente utilizadas para consumo *in natura*, na medicina como sedativos e ansiolíticos, e nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e principalmente na produção de sucos de maracujá (CORRÊA *et al.*, 2016).

Entre as espécies de *Passiflora*, as que se destacam mundialmente como frutos comestíveis são o maracujá roxo (*Passiflora edulis* “Sims”), o maracujá amarelo ou azedo (*Passiflora edulis* Sims “Flavicarpa”), o maracujá doce (*Passiflora allata* Curtis), “Granadilla” (*Passiflora ligularis* Juss) e “Gulupa” (*Passiflora edulis* Sims. *Fo edulis*). Dentre eles, o maracujá amarelo é o mais cultivado devido à qualidade dos seus frutos, produtividade e rendimento. O Brasil é responsável por mais de 95% da sua produção, destinada principalmente à produção de sucos (CORRÊA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016). No processo de fabricação do suco, grandes quantidades de subprodutos (casca e sementes) são gerados, sendo que as sementes representam de 4-12% do fruto inteiro. Porém, estudos têm relatado diversas aplicações para essas sementes de maracujá, devido aos seus benefícios para a saúde da pele, como ação antioxidante, inibição de células cancerosas da pele, inibição da melanogênese, promoção da síntese de colágeno, inibição

da síntese de melanina e prevenção de danos por radiação ultravioleta (UV) (MATSUI *et al.*, 2010; YAMAMOTO *et al.*, 2019).

Esses benefícios à saúde estão associados principalmente à presença de piceatannol. O piceatannol tem sido apontado como o principal composto dentre os estilbenos presentes nas sementes de maracujá e também tem sido foco de diversos estudos que relatam importantes atividades biológicas para os extratos de sementes de maracujá contendo piceatannol, tais como antioxidante, anticâncer, antiinflamatória, antiproliferativa, anti-envelhecimento e atividades de vasodilatação (MATSUI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2016; YAMAMOTO *et al.*, 2019). Embora a determinação de piceatannol em sementes de maracujá tenha sido objeto de vários estudos recentes, os estudos publicados se concentram em sementes de *P. edulis* e em extrações sólido-líquido convencionais (KRAMBECK *et al.*, 2020; PAN *et al.*, 2020).

No entanto, nos últimos anos, esforços consideráveis vêm sendo realizados na área da analítica para aumentar a confiabilidade da identificação e quantificação de compostos, com ênfase em técnicas de preparo de amostra que abrangem a extração eficaz dos analitos, bem como a eliminação de interferentes. Além disso, esforços para reduzir a quantidade de amostra, as quantidades de solventes/reagentes de extração, tempo, o número de etapas e custo, juntamente com a simplificação geral e miniaturização do método, podem ser incluídos. Dentre as técnicas de preparo de amostra que se enquadram neste contexto, o método (QuEChERS, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) se destaca por ser fácil e rápido de realizar, incluindo uma etapa de limpeza, e por ter potencial para modificações e miniaturização.

Assim, este trabalho teve como objetivo aplicar o método QuEChERS desenvolvido na determinação de piceatannol em quatro espécies de sementes de maracujá: *P. edulis* Sims “Flavicarpa”, *P. edulis* “Sims”, *P. allata* Curtis e *P. ligularis* Juss. Além disso, a atividade antioxidante foi determinada pelos métodos DPPH<sup>\*</sup>, ORAC e ABTS<sup>\*\*</sup>.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Quatro espécies de sementes de maracujá foram utilizadas neste estudo, incluindo *P. allata* Curtis, fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Brasília, Distrito Federal, *P. ligulares* Juss e *P. edulis* “Sims”, adquiridas no mercado local de Maringá, Paraná, Brasil e *P. edulis* Sims “Flavicarpa”, adquirida na Central de Abastecimento do Paraná SA (CEASA/PR) - Maringá, Paraná. Primeiramente, as sementes foram separadas da polpa e do suco por um despulpador de frutas, e, em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente e secas à sombra a uma temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . As sementes secas foram trituradas em um liquidificador, peneiradas em peneira 12 mesh, embaladas a vácuo e armazenadas em freezer a  $-18^\circ\text{C}$  até a realização das análises.

O método QuEChERS acetato foi empregado para a extração do piceatannol. Para isso, 0,625 g de sementes de maracujá foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL e 1,875 mL de água ultrapura foram adicionados. Após 30 min, a etapa de extração foi realizada adicionando-se 2,5 mL de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético, seguido de agitação em vórtex por 1 min. Em seguida, os sais de partição, 1 g de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) e 0,25 g de acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) foram adicionados e os tubos foram agitados por 1 min e centrifugados a 5000g por 10 min. Os sobrenadantes (1 mL) foram coletados e adicionados a tubos Falcon de 15 mL individuais para realizar a etapa de limpeza. Para isso, 150 mg de  $\text{MgSO}_4$ , 25 mg de sorvente amina primária e secundária (PSA) e 6,25 mg de sorvente carbono grafitizado (GCB) foram adicionados, os tubos foram agitados em vórtex por 1 min e depois centrifugados (5000g, 10 min). Os sobrenadantes foram filtrados em filtros de politetrafluoretileno (PTFE) ( $0,22 \mu\text{m}$  de

tamanho de poro) para posterior análise cromatográfica por HPLC-DAD e determinação da atividade antioxidante.

A quantificação por HPLC-DAD foi realizada pelo método de adição padrão, analisando os extratos das sementes de maracujá em seis níveis de concentração (160 a 800  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e o limite de quantificação (LQ) foi calculado como a quantidade do analito capaz de produzir um sinal de dez vezes maior que o ruído de linha de base de um cromatograma da amostra não fortificada. O valor do LQ foi de 160  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

A atividade antioxidante foi determinada pela eliminação do radical DPPH de acordo com Ma *et al.* (2011), pela capacidade de absorção do radical de oxigênio ORAC de acordo com Ou *et al.* (2001) e pelos métodos de eliminação do radical catiônico ABTS de acordo com Rufino *et al.* (2007).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O método QuEChERS desenvolvido foi aplicado à análise de piceatannol em quatro espécies de sementes de maracujá: *P. edulis* Sims “Flavicarpa”, *P. edulis* “Sims”, *P. allata* Curtis e *P. ligularis* Juss. Os dados da quantificação estão apresentados na Tabela 1, e pode-se observar que concentrações elevadas de piceatannol, que variaram de 7,5 a 20,8  $\text{mg kg}^{-1}$ , foram encontradas para as espécies de sementes de maracujá avaliadas. Em comparação com *P. ligularis* Juss e *P. edulis* Sims “Flavicarpa”, o conteúdo de piceatannol nas sementes da *P. allata* Curtis foi cerca de 2,8 e 2,3 vezes maior, respectivamente, e nas sementes da *P. edulis* “Sims” cerca de 2,0 e 1,6 vezes maior, respectivamente. E, de acordo com esses resultados, nosso estudo sugere que espécies menos consumidas e/ou menos importantes economicamente, podem ser fontes ainda mais importantes de piceatannol, como também apresentar atividades biológicas novas e/ou mais expressivas.

Em relação a atividade antioxidante, os resultados indicam que os extratos de todas as espécies de sementes de maracujá apresentaram potencial antioxidante (Tabela 1). Em geral, o potencial antioxidante foi maior quanto maior a concentração de piceatannol nos extratos das sementes de maracujá. Uma exceção a esse comportamento foi o extrato da *P. ligularis* Juss, que apresentou o maior potencial antioxidante pelo método ORAC, mesmo apresentando a menor concentração de piceatannol. Esses resultados estão de acordo com outros estudos da literatura, indicando que as sementes das diferentes espécies de maracujá são fontes naturais importante de antioxidantes.

**Tabela 1:** Concentração de piceatannol e atividade antioxidante determinada a partir dos extratos das espécies de sementes de maracujá em estudo

Espécies de sementes de maracujá	Concentração de Piceatannol ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	Atividade antioxidante ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ )		
		DPPH	ABTS	ORAC
<i>P. edulis</i> Sims “Flavicarpa”	9,2 <sup>c</sup> ± 0,1	3,1 <sup>c</sup> ± 0,1	13,0 <sup>c</sup> ± 0,2	1,9 <sup>c</sup> ± 0,3
<i>P. edulis</i> “Sims”	14,6 <sup>b</sup> ± 0,2	5,9 <sup>a</sup> ± 0,1	17,9 <sup>a</sup> ± 0,8	4,8 <sup>a</sup> ± 0,2
<i>P. allata</i> Curtis	20,8 <sup>a</sup> ± 0,4	5,7 <sup>a</sup> ± 0,1	15,8 <sup>b</sup> ± 0,7	3,5 <sup>b</sup> ± 0,2
<i>P. ligularis</i> Juss	7,5 <sup>d</sup> ± 0,1	3,4 <sup>b</sup> ± 0,2	11,3 <sup>d</sup> ± 0,1	3,8 <sup>b</sup> ± 0,2

Os valores são a média ± desvio padrão para as triplicatas. Letras diferentes nos dados da mesma coluna representam diferença estatística de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 4 CONCLUSÃO

Todas as espécies de sementes de maracujá avaliadas apresentaram quantidades elevadas de piceatannol e potencial antioxidante. Dentre elas, as maiores quantidades de piceatannol foram encontradas nas sementes de *P. allata* Curtis e *P. edulis* “Sims”, sendo 20,8 ± 0,4 e 14,6 ± 0,2  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com a nossa revisão bibliográfica, este trabalho também marca o primeiro estudo acerca da determinação de

piceatannol em sementes das espécies *P. allata* Curtis e *P. ligularis* Juss. Nesse contexto, os dados obtidos sugerem que sementes de maracujá são uma fonte rica de piceatannol, com potencial antioxidante, e desta forma, esse estudo pode impulsionar novas aplicabilidades para esse subproduto bem como estudos acerca de outras atividades biológicas.

## REFERÊNCIAS

CORRÊA, R.C.G. *et al.* The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 79-85, 2016.

KRAMBECK, K. *et al.* Identification and quantification of Stilbenes (Piceatannol and Resveratrol) in *Passiflora edulis* **By-Products. Pharmaceuticals**, v.13, p.73, 2020.

MA, X. *et al.* Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, v.129, p.102-107, 2011.

MATSUI, Y. *et al.* Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.20, p.1112–1118, 2010.

OLIVEIRA, D.A. *et al.* Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.11, p.55-62, 2016.

OU, B. *et al.* Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.10, p. 4619-4626, 2001.

PAN, Z. *et al.* Preparative Isolation of Piceatannol Derivatives from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds by High-Speed Countercurrent Chromatography Combined with High-Performance Liquid Chromatography and Screening for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.68, n.8, p.1555–1562, 2020.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>. **Comunicado Técnico On Line**, v.127, 2007.

YAMAMOTO, T. *et al.* Piceatannol exhibits anti-inflammatory effects on macrophages interacting with adipocytes. **Food Science & Nutrition**, v.5, n.1, p.76-85, 2016.