

Atividade antioxidante e quantificação dos compostos bioativos da semente de maracujá

Antioxidant activity and quantification of bioactive compounds in passion fruit seed

RESUMO

O maracujá é muito utilizado na indústria para produção de suco, que em sua maioria não possuem reaproveitamento de resíduos. O trabalho busca um destino nobre para as sementes. Preparou-se quatro extratos com as sementes liofilizadas: etanol/água e metanol/água nas proporções 70:30 (v/v) e 95:5 (v/v). Os compostos bioativos foram quantificados por métodos colorimétricos. Observou-se a influência do solvente extrator, sendo o solvente metanol/água 95:5 o mais eficiente na extração de fenóis totais e etanol/água 70:30 para flavonoides. Altos teores de antocianinas ($4,74 \pm 0,20$ mg 100 g⁻¹) e flavonoides amarelos ($47,39 \pm 0,36$ mg 100 g⁻¹) foram quantificados. A análise de atividade antioxidante foi realizada pelo método do sequestro do radical livre DPPH. Todos os extratos apresentaram alta atividade e cinética rápida de consumo do radical. Em 30 minutos, os extratos metanol/água 70:30 e etanol/água 70:30 e 95:5 apresentaram maior potencial antioxidante (acima de 90%). A semente de maracujá mostrou-se promissora como fonte de componentes bioativos antioxidantes, sugerindo sua aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Fenólicos. Flavonoides. Antocianinas. Extração.

ABSTRACT

Passion fruit is widely used in the industry for juice production, which for the most part do not have waste reuse. The work seeks a noble destination for seeds. Four extracts were prepared with lyophilized seeds: ethanol/water and methanol/water in the proportions 70:30 (v/v) and 95:5 (v/v). The bioactive compounds were quantified by colorimetric methods. The influence of the extracting solvent was observed, with the solvent methanol/water 95:5 being the most efficient in the extraction of total phenols and ethanol/water 70:30 for flavonoids. High levels of anthocyanins (4.74 ± 0.20 mg 100 g⁻¹) and yellow flavonoids (47.39 ± 0.36 mg 100 g⁻¹) were quantified. The analysis of antioxidant activity was performed using the DPPH free radical scavenging method. All extracts showed high activity and rapid kinetics of radical consumption. In 30 minutes, the extracts methanol/water 70:30 and ethanol/water 70:30 and 95:5 showed greater antioxidant potential (above 90%). Passion fruit seed has shown promise as a source of bioactive antioxidant components, suggesting its application in the food, cosmetics and medicines industries.

KEYWORDS: Phenolic. Flavonoids. Anthocyanins. Extraction.

Maria Clara Maranhão Franco
mariafranco@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Lilian Tatiani Dusman Tonin
liliandusman@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



INTRODUÇÃO

O maracujá pertence à espécie *Passiflora edulis*, é conhecido como maracujá azedo ou amarelo e sua produção está voltada para a indústria de sucos e polpas, que em sua maioria não possuem programas de reaproveitamento dos resíduos gerados. Representa 95% do maracujá cultivado no Brasil, é o mais produzido e comercializado, principalmente pelo sabor mais ácido e maior rendimento, além do elevado teor de carotenoides, minerais, vitaminas e compostos fenólicos (LIMA, 2002; TALCOTT et al., 2003).

Os resíduos provenientes da indústria de alimentos, como casca, sementes, entre outros, além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento. Fonte importante para a produção de novos materiais, de produtos químicos e de energia. O desenvolvimento e implementação de processos sustentáveis capazes de converter biomassa em vários produtos com valor agregado é uma necessidade para aproveitar resíduos agroindustriais e gerar menor impacto ambiental. Além do aumento do mercado, pela disponibilização e valorização de novos produtos, o desenvolvimento de novos usos de produtos agropecuários e de tecnologias que revertam o conceito de resíduo para o de matéria-prima para a produção de novos materiais é imprescindível para otimizar a eficiência do agronegócio, além de reduzir o impacto ambiental (ROSA et al, 2011).

Casca e semente do maracujá, subprodutos da agroindústria, podem apresentar características de interesse tecnológico e biológico, sendo que mais de 75% deste resíduo poderia ser transformado em ingrediente com propriedades bioativas para promoção de saúde (ARVANITOYANNIS, 2008). As sementes possuem diversas utilizações, sendo uma delas a fabricação de óleos comestíveis, além da indústria de cosméticos (KOBORI; JORGE, 2005).

Tem sido de grande destaque a atividade antioxidante de compostos presente nas frutas, por possuírem potencial de redução do nível de estresse oxidativo celular. Os antioxidantes são substâncias que, quando em baixas concentrações se comparado a do substrato oxidável, reduzem o dano oxidativo das células, ou seja, estes atrasam ou inibem a oxidação do substrato de maneira eficaz, bloqueando assim os radicais livres, prevenindo assim a formação de algumas doenças, como câncer, aterosclerose, artrite, catarata (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Desse modo, este trabalho teve como objetivo estudar os resíduos agroindustriais da produção de suco de maracujá, quantificando os compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas e flavonoides amarelos e avaliando sua atividade antioxidante pelo método DPPH.

MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes de maracujá deste estudo foram fornecidas pela empresa Polpa Norte (Japurá-PR). Foram secas em estufa de circulação de ar (marca SOLAB, modelo 102/480) a 60°C e liofilizadas.

Os extratos foram preparados com os solventes extratores etanol:água e metanol:água, nas proporções 70:30 (v/v) e 95:5 (v/v). Utilizou-se 100 mL do solvente extrator com 1,00 g de semente de maracujá seca em agitação magnética ao abrigo da luz. Após quatro horas de agitação, os extratos foram filtrados fazendo o uso de papel filtro para um balão volumétrico de 100,0 mL, tendo seus volumes aferidos e ajustados com os solventes apropriados (metanol ou etanol). Posteriormente, estes foram armazenados sobre refrigeração em frasco âmbar, para posterior análise. Os extratos foram preparados em duplicata.

A análise de antocianinas e flavonoides amarelos foram determinados através da metodologia de Francis (1982) O resíduo desidratado (1,0000 g) foi extraído com 30 mL de uma solução etanol 95% e HCl 1,5M (85:15) por agitação magnética durante 5 minutos. A solução foi transferida para um balão de 50,0 mL tendo seu volume completado com o solvente extrator e armazenado por 16 horas. Após a filtração simples, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (AgilentTechnologies, modelo Cary 60 UV-VIS) com o comprimento de onda de 535 nm para antocianinas e 374 nm para flavonoides amarelos. Os resultados foram calculados em mg por 100 g-1 de resíduo através das equações 1 e 2.

$$\text{Antocianinas totais} = \frac{(\text{Fator de diluição} \cdot \text{Abs})}{98,2} \quad (1)$$

$$\text{Flavonoides amarelos} = \frac{(\text{Fator de diluição} \cdot \text{Abs})}{76,6} \quad (2)$$

Os compostos fenólicos totais dos extratos do resíduo foram quantificados através da metodologia de Minussiet al. (2003) utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu. Em um tubo de ensaio foram adicionados 250 µL de extrato, 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em água destilada até a proporção 1:1, 500 µL uma solução saturada de carbonato de sódio (35,0 g de Na₂CO₃ em 100 mL de água destilada) e 4,0 mL de água destilada. Os tubos foram agitados e ficaram em repouso por 25 minutos, sendo centrifugados em seguida por 10 minutos a 3000 rpm. A leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro (AgilentTechnologies, modelo Cary 60 UV-VIS) com absorbância de 725 nm. O branco das análises foi preparado substituindo o extrato por 250 µL do solvente extrator. Uma curva padrão de ácido gálico foi construída: $y = 0,0039x + 0,0134$; $R^2 = 0,9971$), sendo os resultados expressos em mg EAG 100 g-1 de amostra, onde EAG é o Equivalente em Ácido Gálico.

Para a quantificação dos flavonoides foi utilizada a metodologia de Funari e Ferro (2006). As amostras foram preparadas adicionando-se a um tubo de ensaio 500 µL de extrato, 250 µL de solução 5% de cloreto de alumínio e 4,25 mL de MeOH. A mistura foi agitada e permaneceu a temperatura ambiente por 30 min. Após esse tempo realizou-se a leitura em espectrofotômetro (AgilentTechnologies, modelo Cary 60 UV-VIS) no comprimento de onda de 420 nm. Uma curva padrão de rutina nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 100 e 200 mg L-1 foi construída ($y = 0,001x + 0,013$; $R^2 = 0,9945$) e os resultados foram expressos em mg de rutina 100 g-1 de amostra.

Para determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH, adicionou-se em uma cubeta 1,0 mL de extrato ($C = 20 \text{ g L}^{-1}$) e 2,0 mL de da solução do radical DPPH (0,12 mM em MeOH). Após 30 minutos de incubação a absorbância foi lida em espectrofotômetro (AgilentTechnologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição em relação ao controle, de acordo com a Equação 3, onde (Aa) representa a absorbância da amostra, (Ab) representa a absorbância do branco da amostra (1,0 mL de extrato e 2,0 mL de MeOH) e (Ac) representa a absorbância do controle (1,0 mL de MeOH e 2,0 mL de da solução do radical DPPH). Foi utilizado como padrão o BHT (butil-hidroxi-tolueno) e ácido ascórbico a uma concentração de 0,1 g L⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

$$\%AA = \frac{[Ac - (Aa - Ab)]}{Ac} \quad (3)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos com propriedades antioxidantes incluem os flavonoides. Fatores como espécie, método de cultivo, origem geográfica, solo, estágio de maturação, condições climáticas, processamento e estocagem influenciam na quantidade e tipo destes compostos presentes em produtos naturais e seus subprodutos (SILVA et al., 2012). Na extração dos compostos fenólicos e flavonoides, a escolha do solvente extrator é um fator muito importante. A água em combinação com outros solventes orgânicos contribui para criar um meio moderadamente polar, o que favorece a extração de polifenóis (LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005). De acordo com Kowalczyk et al. (2013), o emprego de solventes hidro alcoólicos favorece a extração de compostos fenólicos, o que justifica a escolha dos três solventes utilizados.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, que consiste em uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato. O molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+ e na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre +5 e +6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras Minussiet al. (2003). Os resultados obtidos demonstram que o maior valor de fenóis totais foi encontrado para o extrato MeOH:H₂O 95:5 (Tabela 1), valor 66,1% superior ao extrato que apresentou menor conteúdo de fenóis (MeOH:H₂O 70:30). Para flavonoides totais o extrato que apresentou maior conteúdo foi o EtOH:H₂O 70:30, apresentando um valor 60,9% superior ao solvente menos eficiente na extração destes compostos (MeOH:H₂O 70:30). Os extratos apresentaram diferenças significativas entre seus valores, demonstrando a importância da polaridade e tipo de solvente extrator utilizado na extração destes compostos.

Dentro da classe de flavonoides estão as antocianinas, pigmentos muito instáveis a temperatura, pH e oxigênio (LOPES et al., 2007). O interesse pelas antocianinas vem aumentando devido a capacidade antioxidante, propriedade antiinflamatória, prevenção da hiperglicemia e estimulação da secreção da insulina desta classe de compostos (MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004). Na quantificação de antocianinas do resíduo foi obtido um valor de $4,74 \pm 0,20 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ e de flavonoides amarelos de $47,39 \pm 0,36 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Esses resultados demonstram valores relativamente altos para estas classes de compostos, superior inclusive a polpas de fruta estudadas por nosso grupo de pesquisa, como a polpa de noni, que apresentou teores de antocianinas de $1,39 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ e flavonoides amarelos de $13,01 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (PALIOTO et al., 2015) e a polpa da laranjinha-de-pacu que apresentou valores de 0,65 e $9,63 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ para antocianinas e flavonoides amarelos, respectivamente (TONIN; TEIXEIRA; SUZUKI, 2020).

Tabela 1 – Resultados dos fenóis totais e flavonoides totais dos extratos da semente de maracujá.

Solvente	Fenóis totais $\text{mg EAG } 100 \text{ g}^{-1}$	Flavonoides totais $\text{mg ER } 100 \text{ g}^{-1}$
EtOH:H ₂ O 70:30	$551,97 \pm 16,03^b$	$31,49 \pm 0,51^a$
EtOH:H ₂ O 95:5	$495,52 \pm 14,02^c$	$23,16 \pm 0,40^b$
MeOH:H ₂ O 70:30	$219,74 \pm 8,65^d$	$12,32 \pm 0,13^d$
MeOH:H ₂ O 95:5	$647,32 \pm 15,04^a$	$14,93 \pm 0,40^c$

Fonte: Autoria própria (2020)

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A análise de atividade antioxidante dos extratos de semente de maracujá foi realizada pelo método do sequestro do radical livre DPPH, que se baseia na transferência de elétrons pela ação de um antioxidante ao radical, que possui coloração púrpura e quando reduzido a difenil-picril-hidrazina, passa para a coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995). A Tabela 2 apresenta os valores de porcentagem de sequestro do radical DPPH nos tempos zero, 5 e 30 minutos de reação.

Tabela 2 – Percentual de sequestro do radical DPPH dos diferentes extratos de maracujá

Solvente	T = 0	T = 5 min	T = 30 min
EtOH:H ₂ O 70:30	$65,13 \pm 5,21^a$	$84,94 \pm 1,82^a$	$92,26 \pm 0,76^a$
EtOH:H ₂ O 95:5	$51,03 \pm 1,98^b$	$70,41 \pm 0,96^b$	$90,70 \pm 0,45^a$
MeOH:H ₂ O 70:30	$57,88 \pm 1,91^{a,b}$	$78,47 \pm 2,86^a$	$90,98 \pm 0,28^a$
MeOH:H ₂ O 95:5	$47,99 \pm 1,32^b$	$65,08 \pm 0,84^b$	$86,74 \pm 0,53^b$

Fonte: Autoria própria (2020)

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

O comportamento cinético dos compostos pode ser classificado de acordo com o tempo de consumo de 50% do radical DPPH (TC₅₀). Quando TC₅₀ é menor que 5 minutos a cinética é classificada como rápida, se TC₅₀ estiver entre 5 e 30 minutos, intermediária e lenta quando TC₅₀ apresentar-se maior que 30 minutos (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998).

Pode-se observar uma cinética rápida de reação para todos os extratos, com sequestro de mais de 50% do radical em um tempo inferior a 5 minutos. No tempo de 30 minutos, os extratos MeOH:H₂O 70:30 e EtOH:H₂O 70:30 e 95:5 foram os que apresentaram maior potencial antioxidante (acima de 90%), não diferindo significativamente (p<0,05).

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram teores relativamente altos de antocianinas e flavonoides amarelos, e um alto poder antioxidante, podendo ser apontados como fontes promissoras de antioxidantes naturais, com aplicação em cosméticos, alimentos e medicamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR Câmpus Apucarana (LAMAP).

REFERÊNCIAS

ARVANITTOYANNIS, I. S. **Potential and representatives for application of environmental management system (EMS) to food industries**. In: IOANNIS, S.A. et al. (Ed.). *Waste management for the food industries*. p. 3-38, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 22, p. 25-30, 1995.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRANCIS, F. J. **Analysis of anthocyanins**, In: *Anthocyanins as food colors*. (Markakis, P.), New York: Academic Press, p. 181-207, 1982.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 171-178, 2006.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928-2935, 2005.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1008-1014, 2005.

KOWALCZYK, D.; SWIECA, M.; CICHOCKA, J.; GAWLIK-DZIKI, U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 103-110, 2013.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A.G. Comparison of extract prepared from plant by products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-222, 2005.

LIMA, A. A. **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 104 p.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, p. 291-297, 2007.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231-237, 2004.

MINUSSI, R.C; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G.M.; DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v. 82, p. 409-416, 2003.

PALIOTO, G. F.; SILVA, C. F. G.; MENDES, M. P.; ALMEIDA, V. V., ROCHA, C. L. M. S. C.; TONIN, L. T. D. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* Linn (noni) cultivados no Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.59-66, 2015.

ROSA, M. F.; SOUZA-FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Valorização de Resíduos da Agroindústria. In: II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais. Foz do Iguaçu, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p. 270-276, 1998.

SILVA, Q. J.; MOREIRA, A. C. C. G.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de genótipos de ciriguelas (*Spondia purpurea* L.), **Alimentos e Nutrição**, v. 23, p. 73-80, 2012.

TALCOTT, S. T.; PERCIVAL, S.S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 935-941, 2003.

TONIN, L. T. D.; TEIXEIRA, B. S.; SUZUKI, R. M. Capacidade Antioxidante e Compostos Bioativos dos Frutos de *Pouteria glomerata* (LARANJINHA-DE-PACU). **Revista Tecnológica**, v. 29, n. 2, p. 291-308, 2020.