UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos e Nutrição Experimental

Área de Bromatologia

Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras* spp

Gabriella Pedrosa Vieira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Maria Inés Genoseve Rodriguez

São Paulo

2013

Gabriella Pedrosa Vieira

Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras* spp

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Inés Genovese Rodriguez
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____, _____.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Vieira, Gabriella Pedrosa

V657c Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em
folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras* spp /
Gabriella Pedrosa Vieira. -- São Paulo, 2013.
81p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Rodriguez, Maria Inés Genovese

1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos
2. Flavonóide 3. Frutas : Brasil 4. Antioxidante : Ciência dos
alimentos 5. Alcaloide I. T. II. Rodriguez, Maria Inés Genovese,
orientador.

641

CDD

Ao meu Vô Hélio (*in memoriam*) e Vô Paulo
“*Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.*”(O Pequeno Príncipe).

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ter iluminado meu caminho e ter me dado forças para não desistir nas horas mais difíceis.

A Profa. Dra. Maria Inés Genovese, minha orientadora, por toda a dedicação, compreensão, estímulo e exigência para a conclusão deste trabalho.

A Dra. Ana Maria Costa, da Embrapa Cerrados, pelo fornecimento das amostras e pela parceria.

Ao professor Yves Desjardins e seu técnico Pascal Dubé pelo período trabalho no INAF (Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels) Quebec, Canadá.

Aos meus pais que mesmo diante de muitas dificuldades, nunca deixaram de incentivar meus estudos.

Ao Antônio, por estar sempre presente ao meu lado em todos os momentos de alegria e tristeza.

Aos meus avós, principalmente meu avô Paulo, por sempre ter acreditado na sua querida neta.

A minha irmã Anna e meu cunhado Ivan, que sempre acreditaram no meu trabalho, e que quando decidi ingressar no Mestrado, foram as pessoas que mais apoiaram.

Ao meu namorado, Leonardo Gallo, que apesar de ter cruzado meu caminho no meio dessa jornada, sempre esteve ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Ao meu querido amigo, Fernando Sasaki, que sempre esteve ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Aos meus amigos especiais que enriqueceram minha experiência e foram meus companheiros de laboratório, dividindo alegrias, tristezas, conversas e almoços durante esses anos: Alice Fujita,

Any Eliza, Carlos Pestana, Diully Balisteiro, Flávia Beteto, Helena Barros, Marcela Roquim, Maria Cecília, Rafaela Rossi, Renata Araújo, Thiago Belchior por terem me apoiado e me ajudado neste trabalho. A querida Joana, pela agradável companhia e por cuidar do laboratório.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental que em algum momento auxiliaram e contribuíram para minha formação.

Aos secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Ao CNPq pela bolsa no período de mestrado, ao programa ELAP pela bolsa no período em que estive no Canadá e a Fapesp pelo suporte financeiro ao laboratório.

A todos o meu profundo agradecimento!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Compostos bioativos de alimentos: fenólicos	1
1.1.1	Flavonoides e alcaloides	3
1.2	Maracujá e seus compostos bioativos	4
2	OBJETIVOS	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1	Materiais	11
3.2	Métodos	12
3.2.1	Peso médio e porcentagem de pericarpo e polpa com sementes	12
3.2.2	Determinação de umidade	12
3.2.3	Preparo de infusões	12
3.2.4	Determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	13
3.2.4.1	Extração	13
3.2.4.2	Fenólicos Totais	13
3.2.4.3	Sequestro de radicais livres - DPPH [•]	14
3.2.4.4	Determinação do poder redutor do ferro – método FRAP	14
3.2.4.5	Método ORAC (Capacidade de absorção de Radicais de Oxigênio)	15
3.2.5	Quantificação e caracterização das proantocianidinas	15
3.2.5.1	Determinação colorimétrica de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado	15
3.2.5.2	Determinação colorimétrica de proantocianidinas pelo método DMAC	16
3.2.5.3	Caracterização estrutural das proantocianidinas	17
3.2.5.3.1	Preparo das amostras	17
3.2.5.3.2	Identificação e quantificação das proantocianidinas	17
3.2.6	Determinação dos flavonoides por CLAE/DAD	18
3.2.6.1	Extração dos flavonoides dos frutos de <i>Passifloras</i> spp	18
3.2.6.2	Extração dos flavonoides das folhas de <i>Passifloras</i> spp	18
3.2.6.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/DAD)	19
3.2.7	Determinação dos flavonoides por UPLC/MS	19

3.2.7.1	Extração	19
3.2.7.2	Identificação e quantificação dos flavonoides	20
3.2.8	Determinação de alcaloides	20
3.2.8.1	Extração	20
3.2.8.2	Identificação e quantificação dos alcalóides	21
3.2.9	Determinação do perfil de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência	21
3.2.10	Determinação de Vitamina C	22
3.2.11	Determinação da atividade inibitória da α -amilase e α -glicosidase	22
3.2.11.1	Obtenção dos extratos	22
3.2.11.2	Inibição da α -amilase	23
3.2.11.3	Inibição da α -glicosidase	24
3.12	Análise dos resultados	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Perfil de açúcares das frações pericarpo, polpa e sementes das diferentes espécies de <i>Passiflora</i>	29
4.2	Teores de fenólicos totais dos frutos (pericarpo, polpa e sementes) e folhas de diferentes espécies de <i>Passiflora</i> spp.	32
4.3	Capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	34
4.4	Coeficiente de correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	38
4.5	Teores de proantocianidinas	40
4.6	Caracterização estrutural e identificação das proantocianidinas	43
4.7	Determinação de flavonoides dos frutos de <i>Passiflora</i> spp.	46
4.8	Compostos fenólicos em folhas de <i>Passiflora</i> spp. e suas respectivas infusões	50
4.9	Determinação de flavonoides nas folhas de <i>Passiflora</i> spp.	54
4.10	Perfil de flavonoides por UPLC/MS	60
4.11	Alcaloides	63
4.12	Vitamina C	65
4.13	Determinação da atividade inibitória <i>in vitro</i> de α -amilase e α -glicosidase	66
5.	CONCLUSÕES	69
6.	BIBLIOGRAFIA	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides.....	3
Figura 2. Estruturas químicas dos alcaloides presentes em <i>Passiflora</i> spp.....	5
Figura 3. Principais flavonoides encontrados em algumas espécies de <i>Passiflora</i> spp.....	9
Figura 4. Frutos das espécies de <i>Passiflora</i> analisadas. 1 – <i>P. edulis</i> variedade BRS Ouro Vermelho. 2 – <i>P. edulis</i> variedade BRS Gigante Amarelo. 3 – <i>P. edulis</i> variedade BRS Sol do Cerrado.....	28
Figura 5. Frutos das espécies de <i>Passiflora</i> analisadas. 1 – <i>P. tenuifila</i> . 2 – <i>P. alata</i> . 3 – <i>P. setacea</i>	29
Figura 6. Teor total de compostos fenólicos das folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de <i>Passiflora</i> , através da capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg EC/100 g amostra b.s.).....	33
Figura 7. Capacidade de sequestro de radicais livres das folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de <i>Passiflora</i> , através do método da capacidade sequestrante do DPPH (μ moles ET/100 g b.s.).....	35
Figura 8. Capacidade antioxidante das folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de <i>Passiflora</i> , através da capacidade de redução de ferro (FRAP) (mmoles ET/ 100 g amostra b.s.).....	36
Figura 9. Capacidade antioxidante das folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de <i>Passiflora</i> , através da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (mmoles ET/ 100 g amostra b.s.).....	37

Figura 10. Cromatograma obtido por CLAE acoplado à fluorescência a partir da extração do pericarpo de *Passiflora* demonstrativo do perfil de distribuição das proantocianidinas ($\lambda_{Ex}=230$ nm, $\lambda_{Em}=321$ nm).....44

Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE acoplado à fluorescência a partir da extração do pericarpo de *Passiflora* demonstrativo do perfil de distribuição das proantocianidinas ($\lambda_{Ex}=230$ nm, $\lambda_{Em}=321$ nm).....44

Figura 12. Perfil cromatográfico dos padrões de flavonoides detectados a 270 e 370 nm. 1 – homoorientina (Tr = 6,320 min.), 2 – orientina (Tr = 9,191 min.), 3 – isovitexina (Tr = 10,028 min.) e 4 – vitexina (Tr = 10,183). A cor azul indica o comprimento de onda a 270 nm e a cor vermelha o comprimento de onda a 370 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.....46

Figura 13. Perfil cromatográfico dos flavonoides dos pericarpos de *Passiflora* spp detectados a 270 e 370 nm. A- *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, 1^{a,b,c}: flavona. B – *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo, 1^{a,b,c,d,e,f,g}: flavona. C – *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado, 1^{a,b,c,d,e,f}: flavona. D – *P. alata*, 11^{a,b,c}: flavona, 2^{a,b,c}: flavonol. E – *P. setacea*, 1^{a,b}: flavona, 2^{a,b}: flavonol, 3:flavanona. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.....47

Figura 14. Perfil cromatográfico dos flavonoides das polpas de *Passiflora* spp detectados a 270 e 370 nm. A- *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, 1^{a,b}: flavona. B – *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo, 1^{a,b,c}: flavona. C – *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado, 1^{a,b,c}: flavona. D – *P. alata*. E – *P. setacea*, 1: flavona, 2: flavonol, 3: flavanona. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.....48

Figura 15. Perfil cromatográfico dos flavonoides das sementes de *Passiflora* detectados a 270 e 370 nm. A- *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, 4: composto desconhecido, 5: piacetanol. B – *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo, 4: composto desconhecido, 5: piacetanol, 6: proantocianidina. C – *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado. D – *P. alata*, 5: piacetanol. E – *P. setacea*, 7: composto desconhecido, 5: piacetano. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.....49

Figura 16. Cromatograma em 270 nm dos padrões usados. 1: homoorientina (Tr = 6,740 min.), 2: orientina (Tr = 8,015 min.), 3: vitexina (Tr = 10,699 min.), 4: isovitexina (Tr = 11,009 min.). Coluna C18 Synergi 4µ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4µm).....56

Figura 17. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. edulis* cultivar Ouro Vermelho detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1: homoorientina, 4: isovitexina. Coluna C18 Synergi 4µ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4µm).....56

Figura 18. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. edulis* cultivar Gigante Amarelo detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1: homoorientina, 4: isovitexina. Coluna C18 Synergi 4µ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4µm).....57

Figura 19. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. edulis* cultivar Sol do Cerrado detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1: homoorientina, 4: isovitexina. Coluna C18 Synergi 4µ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4µm).....57

Figura 20. Perfil cromatográfico do flavonoide da folha de *P. tenuifila* detectado a 270 nm. O algarismo arábico sobreposto ao cromatograma expressa a identificação do flavonoide. 1: homoorientina. Coluna C18 Synergi 4µ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4µm).....58

Figura 21. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. alata* detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1: homoorientina, 2: orientina. Coluna C18 Synergi 4µ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4µm).....58

Figura 22. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. setacea* detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1: homoorientina, 2: isovitexina. Coluna C18 Synergi 4µ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4µm).....59

Figura 23. . Perfil cromatográfico da análise de ácido ascórbico total (após redução com DTT) por CLAE-DAD a 245 nm de polpa e pericarpo das diferentes espécies de *Passiflora* (1- Padrão Ácido Ascórbico; 2- Pericarpo *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho; 3- Polpa *P. edulis* c variedade BRS Ouro Vermelho; 4- Pericarpo *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo; 5- Polpa *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo; 6- Pericarpo *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado; 7- Polpa *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado; 8- Pericarpo *P. tenuifila*; 9- Polpa *P. tenuifila*; 10- Pericarpo *P. alata*; 11- Polpa *P. alata*; 12- Pericarpo *P. setacea*; 13 – Polpa *P. setacea*).....64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Peso médio, % pericarpo, % polpa com semente e teores de umidade (%) das frações pericarpo e polpa com semente dos frutos das diferentes espécies analisadas.....27
- Tabela 2.** Conteúdo de açúcares nos frutos de diferentes espécies de *Passiflora* separados em suas frações constituintes pericarpo, polpa e sementes (mg/100 g amostra b.s.).....31
- Tabela 3.** Coeficiente de correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* (Capacidade de sequestro do DPPH[•], capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade de absorção do radical oxigênio – (ORAC)).....39
- Tabela 4.** Teores de proantocianidinas pelo método do n-butanol (mg equivalentes de tanino quebracho/g amostra b.s.) e DMAC (mg equivalente de procidina B2/g de amostra b.s.) nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) nas diferentes espécies de *Passiflora*.....42
- Tabela 5.** Conteúdo de proantocianidinas (mg/100 g amostra b.s.) identificadas nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passiflora* spp.....45
- Tabela 6.** Teor de fenólicos totais (mg equivalentes de catequina/100g amostra b.s.), teores de proantocianidinas pelo método do n-butanol (mg equivalentes de tanino quebracho/g amostra b.s.) e DMAC (mg equivalente de procidina B2/g de amostra b.s.), capacidade de sequestro do DPPH[•] (μ mol equivalentes de Trolox/g amostra b.s.), poder redutor do ferro FRAP (mmol equivalentes de Trolox/g amostra b.s.) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (mmoles ET/ 100 g amostra b.s.) nos extratos metanólicos, acetônicos e infusão das folhas de *Passiflora* spp.....52

Tabela 7. Coeficiente de correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* (Capacidade de sequestro do DPPH[•], capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)).53

Tabela 8. Composição e teor de flavonoides presentes em folhas de Passifloras das espécies *Passiflora edulis* cultivares Sol do Cerrado, Ouro Vermelho e Gigante Amarelo, *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora setacea* DC e *Passiflora tenuifila* Killip expresso em mg/100 g de amostra em b.s.....54

Tabela 9. Composição e o teor de flavonoides identificados nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora* expressos em mg/100g de amostra b.s.....62

Tabela 10. Composição e teores de alcaloides presentes nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora*, expresso em mg/100 g de amostra em b.s.....64

Tabela 11. Atividade inibitória de α -amilase e α -glicosidase de extratos enriquecidos em compostos fenólicos obtidos a partir de folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras*.....67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais flavonoides encontrados em algumas espécies de <i>Passiflora</i> e sua localização.....	8
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: por cento	min: minutos
°C: grau Celsius	mL: mililitro
b.s.: base seca	nm: nanômetro
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência	PACs: proantocianidinas
DAD: diiodo	PTFE: Politetrafluoroetileno
DMAC: 4-dimethylaminocinnamaldehyde	SGLT: transposrtador de glucose sódio dependente
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico	spp: espécies
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil	™: marca registrada
DTT: Ditiotreitól	TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico
EC: equivalentes de catequina	UV: ultravioleta
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	V: volume
et al.: e colaboradores	v/v: volume por volume
ET: equivalentes de trolox	α - alfa
FRAP: Poder redutor do ferro	β - beta
g: grama	ζ - cis
GLUT: transportador de glicose	μ : micro
L: litros	μ g: micrograma
M: molar	μ M: micromolar
m/v: massa por volume	μ moles: micromoles
mg: miligrama	

RESUMO

VIEIRA, G. P. Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras* spp. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A cultura popular atribui ao gênero *Passiflora* várias propriedades medicinais e funcionais. Frutas frescas e secas, cascas, infusões e suco da polpa de maracujás silvestres são consumidos e comercializados para controlar ansiedade, insônia, tremores, diabetes e obesidade, entre outras indicações. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram caracterizar e comparar as folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das espécies *P. edulis* Sims variedades BRS Sol do Cerrado, Ouro Vermelho e Gigante Amarelo, *P. alata* Curtis, *P. setacea* DC e *P. tenuifila* Killip em relação ao seu potencial funcional, avaliando-se conteúdos de compostos fenólicos totais, proantocianidinas, vitamina C, alcaloides, tipos e teores de flavonoides, controle potencial de glicemia pós-prandial (inibição de α -amilase e α -glicosidase *in vitro*) e capacidade antioxidante *in vitro*. O principal flavonoide encontrado tanto em folhas como em frutos foi a homoorientina e as maiores concentrações foram encontradas em folhas, seguido de pericarpo. Os maiores teores de alcaloides foram detectados nas polpas dos frutos de *P. edulis* (0,1-0,2 mg/100 g b.s.). As maiores concentrações de compostos fenólicos foram detectadas nas folhas de *P. edulis* e *P. alata*, porém as sementes de *P. tenuifila* e principalmente *P. setacea* apresentaram os teores mais elevados em comparação com as outras frações. Em relação às proantocianidinas, este é o primeiro estudo que mostra a presença destes compostos em *Passiflora* spp, em concentrações significativamente maiores nas sementes. Além disso, o estilbeno piceatanol (3,4,3',5'-tetrahidroxi-trans-estilbeno) também foi encontrado nas sementes de *P. edulis* variedades BRS Ouro Vermelho (2 mg/100 g b.s.) e Gigante Amarelo (3 mg/100 g b.s.) e *P. alata* (10 mg/100 g b.s.). Os compostos fenólicos encontrados nas sementes de todas as espécies de *Passiflora* analisadas se mostraram potentes inibidores das enzimas α -amilase e α -glicosidase. Este trabalho mostrou que os frutos e as folhas de *Passiflora* spp podem ser considerados boas fontes de compostos bioativos, especialmente com atividade antioxidante, apresentando, portanto, potenciais efeitos benéficos sobre a saúde humana.

PALAVRAS-CHAVE: Passifloras, capacidade antioxidante, flavonoides, alcaloides proantocianidinas.

ABSTRACT

VIEIRA, G. P. Phenolic compounds, antioxidant capacity and alkaloids in leaves and fruit (pericarp, pulp and seeds) of *Passifloras* spp. Dissertation (Master's Degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Folk culture assigns to the genus *Passiflora* various medicinal and functional properties. Fresh and dried fruits, barks, teas and wild passion fruit pulp juice are consumed and sold to control anxiety, insomnia, tremor, diabetes and obesity, among other indications. Thus, the aim of this study was to characterize the leaves and fruit (pericarp, pulp and seeds) of the species *P. edulis* Sims varieties BRS Sol do Cerrado, Ouro Vermelho e Gigante Amarelo, *P. alata* Curtis, *P. setacea* DC e *P. tenuiflora* Killip in relation to their functional potential, evaluating content of total phenolic compounds, proanthocyanidins, vitamin C, alkaloids, types and levels of flavonoids, potential control of postprandial glycemia (inhibition of α - amylase and α - glucosidase *in vitro*) and *in vitro* antioxidant capacity. The main flavonoid found in both leaves and fruits was homoorientina and the highest concentrations were found in leaves, followed by pericarp. The highest levels of alkaloids were detected in the pulp of the fruits of *P. edulis* (0.1-0.2 mg/100 g b.s.). The highest concentrations of phenolic compounds were identified in the leaves of *P. edulis* and *P. alata*, but the seeds of *P. tenuiflora* and especially *P. setacea* showed higher levels compared with the other fractions. With respect to proanthocyanidin, this is the first study to show the presence of these compounds in *Passiflora* spp at concentrations significantly increased in seeds. Furthermore, piceatannol stilbene (3,4,3',5'- tetrahydroxy -trans-stilbene) was also found in the seeds of *P. edulis* varieties BRS Ouro Vermelho (2 mg/100 g d.w.) and Gigante Amarelo (3 mg/100 g d.w.) and *P. alata* (10 mg/100 g d.w.). Phenolic compounds found in the seeds of all species analyzed are good inhibitors of α - amylase and α - glicosidase. This work showed that the fruit and leaves of *Passiflora* spp. can be considered good sources of bioactive compounds, especially with antioxidant activity, thus presenting potential beneficial effects on human health.

KEYWORDS: *Passifloras*, antioxidant capacity, flavonoids, alkaloids, proanthocyanidins.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Compostos bioativos de alimentos: fenólicos

Os alimentos fornecem não somente nutrientes essenciais necessários para a vida, mas também compostos bioativos que promovem benefícios à saúde e reduzem o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Esse efeito protetor tem sido atribuído, em grande parte, a propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como antioxidante anti-inflamatória e hipocolesterolêmica de nutrientes como as vitaminas A, C e E, carotenoides e de compostos fenólicos como os flavonoides. Entre estes podemos citar as catequinas do chá verde e do vinho, as antocianinas dos frutos vermelhos, os flavonóis das folhas e as isoflavonas da soja (Rice-Evans et al., 1996; German e Dillard, 2005; Seifried et al., 2007; Saura-Calixto e Goñi, 2009).

Entre os compostos bioativos presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos. Estes podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, normalmente conjugados com mono e polissacarídeos e complementam as funções das vitaminas e enzimas antioxidantes como defesas contra o estresse oxidativo (Stalikas, 2007; Tsao, 2010).

Os compostos fenólicos são formados pelo metabolismo secundário dos vegetais e lhes conferem sabor e cor, assim como possuem funções de defesa contra o ataque de pragas e doenças, contra as radiações UV do sol e podem atuar como atrativo para insetos polinizadores (Ignat, Volf e Popa, 2011). Já em animais e humanos tem-se observado que são capazes de reagir com radicais livres formando radicais estáveis. As propriedades benéficas desses compostos podem ser parcialmente atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres, assegurando a homeostase e crescimento normais e, prevenindo o estresse oxidativo e, conseqüentemente, o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis (Balasundram, Sundram e Samman, 2006).

Visto que os radicais livres causam danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, podendo levar a um grande numero de patologias incluindo o câncer e a aterosclerose, presume-se que a ingestão de antioxidantes capazes de neutralizar os radicais livres possa ter um papel importante na prevenção destas doenças (Harbone e Willians, 2000).

Além das propriedades antioxidantes, estudos recentes têm demonstrado que os polifenóis possuem também atividades anti-inflamatória, quimiopreventiva e neuroprotetiva, que podem contribuir com as propriedades protetoras da saúde. Estes compostos podem,

ainda, influenciar o metabolismo da glicose e de lipídios por diversos mecanismos, importantes na prevenção e tratamento do diabetes tipo 2 e da obesidade. Entre esses mecanismos destacam-se: a inibição da digestão e da absorção dos carboidratos e dos lipídios no intestino; a estimulação da secreção da insulina das células pancreáticas; a modulação da produção hepática da glicose; a ativação dos receptores de insulina; a absorção de glicose em tecidos periféricos sensíveis à insulina; a inibição da diferenciação e proliferação dos adipócitos e redução da inflamação crônica (Hanlineva et al., 2010; Meydani e Hasan, 2010; Hirai, 2010; Yun, 2010).

Uma variedade de polifenóis presentes em frutas e vegetais tem demonstrado ação inibitória das atividades da α -amilase, da α -glicosidase, de transportadores da glicose e da lipase pancreática *in vitro* e *in vivo*, reduzindo assim a hiperglicemia e a hiperlipidemia pós-prandial (Benala, Bellahcen e Bnouhan, 2010; Gonçalves et al., 2010; Yun, 2010). Manzano e Willianson (2010) verificaram que extratos de maçã e morango contendo ácidos fenólicos, flavonoides e taninos inibiram o transporte da glicose mediado pelo transportador da glicose sódio-dependente (SGLT1) e o mediado pelo transportador da glicose GLUT2 *in vitro* usando vesículas da membrana borda em escova do intestino e as células Caco-2. Sugiyama et al., (2007) verificaram que procianidinas oligoméricas contidas em maçãs inibiram a absorção de triacilgliceróis, inibindo a atividade da lipase pancreática em camundongos e humanos.

Já foram reportados em torno de 8000 compostos fenólicos, ou polifenóis, e estes representam uma ampla classe de metabólitos secundários de plantas e a maior categoria de agentes fitoquímicos (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006). Estes se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal e são derivados da via fenilpropanoídica (Winkel-Shirley, 2001). Os três maiores grupos de fenólicos da dieta são os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos.

Os flavonoides estão presentes em frutas e hortaliças, cujo consumo tem sido associado a efeitos protetores contra doenças cardiovasculares e câncer. Por muito tempo foram considerados sem nenhum valor nutricional, até a demonstração da ação redutora da fragilidade capilar de alguns deles em 1936, pelos trabalhos de Szent-Gyorgy e de Rusznyak (De Angelis, 2005).

1.1.1 Flavonoides e alcaloides

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos bioativos mais importantes entre

os produtos de origem natural (Ramos, 2007), sendo uma classe de considerável interesse científico e terapêutico. Dos 4000 flavonoides até hoje conhecidos a grande maioria está incluída regularmente na dieta humana (Comalada et al., 2006).

A presença dos flavonoides, bem como sua distribuição nas espécies vegetais, depende de fatores como ordem, família e variedade do vegetal. Sua distribuição nas espécies vegetais depende do grau de incidência da luz solar, principalmente dos raios ultravioleta, pois a formação dos flavonoides é acelerada pela luz (Jacques, 2009).

Os flavonoides são caracterizados como difenilpropanos ($C_6-C_3-C_6$) com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, identificados como A B e C (**Figura 1**), e ocorrem naturalmente nos alimentos vegetais, sendo, portanto, componentes usuais da dieta humana (Hertog et al., 1992; Karakaya, 2004).

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides.

Os flavonoides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e conjugados a açúcares, sendo esta forma conhecida como heterosídeo ou forma conjugada. Os carboidratos estão ligados preferencialmente pelos carbonos 3 e 7, podendo ser cruciais para a atividade biológica dos flavonoides (Williams e Harbone, 1994; Zuanazzi, 2001). Choi et al., (2009) avaliaram a atividade antiviral de flavonoides ligados ou não a uma molécula de açúcar, mostrando que aquelas substâncias ligadas ao açúcar pelo C-7 apresentaram maior atividade antiviral.

Uma propriedade amplamente estudada dos flavonoides é a sua capacidade antioxidante, por serem quimicamente doadores de elétrons. Estudos farmacológicos mostraram que seis flavonoides isolados de plantas medicinais, utilizadas na Turquia, apresentaram consideráveis atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral (Orhan et al., 2009).

Uma diversidade de estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado que os flavonoides podem

inibir e, às vezes, induzir uma grande variedade de enzimas, envolvidas em importantes processos reguladores como a divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, detoxificação, e resposta inflamatória e imune do organismo humano (Williams et al., 2004; Seinfried et al., 2007; Dai e Mumper, 2010; Kim et al., 2011).

1.2. Maracujá e seus compostos bioativos

O gênero *Passiflora* possui aproximadamente 520 espécies, distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo cerca de 150 espécies do Brasil (Cervi, 2005). Das espécies já descritas, *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg. (maracujá-amarelo ou maracujá-azedo), *P. edulis* fo. *edulis* Sims (maracujá-roxo), *P. alata* Curtis (maracujá-doce), *P. ligularis* Juss. e *P. quadrangularis* L. são as mais difundidas e cultivadas comercialmente (Meletti, 2011).

O mercado de frutas é um dos mais prósperos do território brasileiro, principalmente devido às condições climáticas favoráveis, que aliadas às inovações tecnológicas, tornam o maracujá-amarelo uma fonte de renda para o pequeno produtor durante o ano todo, com mercado voltado para o consumo de fruto *in natura* e a produção de suco concentrado. O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá-amarelo, com aproximadamente 62.019 hectares de área cultivada (Agrianual, 2013), sendo a região nordeste a maior produtora (Meletti, 2011).

Além de serem consumidas *in natura* e utilizadas na produção de suco concentrado, as espécies de maracujazeiro também são consideradas alimentos funcionais devido às suas propriedades antioxidantes e medicinais, com uso no tratamento de ansiedade e irritação (Nodari e Guerra, 2000; Dhawan et al., 2004). As espécies de maracujás descritas nas farmacopeias internacionais são: maracujá-vermelho (*P. incarnata* L.), maracujá-doce (*P. alata*) e maracujá-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), sendo recomendada a infusão de suas partes aéreas (Farmacopeia Brasileira, 1977; Pharmacopée Française, 1980; Pharmacopoeia helvetica, 1987; European Pharmacopoeia, 1996; Farmacopoea ufficiale della Repubblica Italiana, 1998; Anvisa, 2010).

No Brasil, apenas duas espécies de maracujás são de interesse comercial, *P. edulis* utilizada na produção de suco, e *P. alata* para consumo *in natura*. Esta última também é explorada comercialmente como ornamental e o extrato de suas folhas é utilizado na formulação de alguns fitoterápicos (Doyama et al., 2005). Diversos experimentos *in vivo* têm

sido realizados a fim de atribuir as atividades farmacológicas a um único composto de *Passiflora* sp., mas é provável que esses efeitos sejam resultados do sinergismo de alguns flavonoides e alcaloides (Pozzi, 2007).

Os principais compostos bioativos das espécies de *Passiflora* são os flavonoides e alcaloides (**Figura 2**). Diversos estudos utilizando experimentos com animais indicam ação destes compostos na modulação da função imune, na proteção do organismo frente às espécies reativas de oxigênio e ação ansiolítica, sendo esses efeitos dependentes do teor e da composição de flavonoides e alcaloides presentes em espécies de maracujá (Dhawan et al., 2004; Woodman, 2004; Rojas et al., 2006; Vargas et al., 2007; Benincá et al., 2007).

Figura 2. Estruturas químicas dos alcaloides presentes em *Passiflora* spp.

Os alcaloides presentes em *Passiflora* spp são do tipo indólico. Os alcaloides indólicos compreendem o segundo grande grupo de alcaloides atualmente conhecidos (Zeraik et. al, 2011). Muitos têm valor na medicina como tranquilizantes e no tratamento da hipertensão (Harbone e Baxter, 1995).

Especificamente para *P. alata* estes compostos foram primeiramente relatados em 1984, por Oga e colaboradores, que quantificaram os alcaloides presentes nas folhas de *P. alata* através de métodos espectrofotométricos (UV). Os resultados mostraram um teor de 0,2 mg/kg de alcaloides, expressos como harmana.

Várias pesquisas têm sido conduzidas mostrando o potencial do maracujá (fruto, casca e semente) para várias finalidades, e a atividade biológica mais estudada com relação aos frutos do maracujá é a sua ação antioxidante (Zeraik et al., 2010).

O maracujá apresenta uma ampla variabilidade de compostos bioativos, os quais irão depender da espécie do fruto e de sua distribuição no alimento (Dhawan et al., 2004). Vários

estudos indicam a presença de substâncias polifenólicas (Zeraik et al., 2010), ácidos graxos poli-insaturados (Kobori e Jorge, 2005), entre outras classes de substâncias, e a existência destas substâncias no fruto pode indicar o potencial do maracujá como um alimento funcional (Zeraik et al., 2010).

A casca do maracujá (pericarpo) é rica em pectina, niacina (vitamina B3), ferro, cálcio, fósforo e carotenoides. Dentre os carotenoides, tem sido reportada em frutos in natura de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) a presença de β -criptoxantina, prolicopeno, cis- ζ -caroteno, ζ -caroteno, β -caroteno e 13 cis β -caroteno (Silva e Mercadante, 2002), sendo alguns destes compostos capazes de serem convertidos em Vitamina A e como tal desempenham importante função nutricional, em especial nos países do terceiro mundo onde os vegetais e frutos ricos em carotenóides constituem a principal fonte de vitamina A. Os carotenóides são potentes antioxidantes, desempenhando sua função através do sequestro de espécies reativas de oxigênio (Mascio et al., 2000; Beutner et al., 2001; Lowe e Young, 2001).

Queiroz et al., (2008) avaliaram o efeito da suplementação com farinha da casca (pericarpo) de *P. edulis* (50 e 100% da dose correspondente à ingestão diária recomendada (IDR) de fibras) sobre os níveis plasmáticos de glicose, triglicérides, colesterol total e frações, e conteúdo de glicogênio hepático e cardíaco de ratos diabéticos. Verificou-se que o grupo tratado com a ração suplementada com farinha da casca (pericarpo) de *P. edulis*, em ambas as doses, apresentou diminuição da hemoglobina glicada, aumento do glicogênio hepático e cardíaco, porém sem diminuição de lipídios plasmáticos.

Por outro lado, em seres humanos com diabetes tipo 2, a suplementação com farinha da casca (pericarpo) de *P. edulis* f. *flavicarpa* reduziu a glicemia em jejum, porém não houve redução dos níveis de colesterol total e LDL. Entretanto, houve redução nos níveis de triglicérides e aumento do colesterol HDL nos mesmos. Os níveis glicêmicos apresentados pelos pacientes antes e após o uso da farinha da casca do maracujá são compatíveis com uma ação positiva no controle da glicemia como adjuvante das terapias convencionais (Janeiro, 2008).

Estes estudos evidenciam, portanto, que a farinha da casca de *P. edulis* pode exercer uma ação positiva sobre o controle glicêmico no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, 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 (Queiroz, 2008; Janeiro, 2008).

Lutomski et al., (1975) avaliaram o efeito da administração oral dos sucos obtidos do

maracujá vermelho e do maracujá amarelo em camundongos. Verificou-se que após a administração dos sucos houve uma diminuição significativa da movimentação espontânea dos animais, demonstrando um efeito tranquilizante. Este efeito foi atribuído à presença de pequenas quantidades de alcaloides do grupo harmana e flavonoides, identificados por cromatografia em papel, utilizando o reagente de Dragendorff. Zeraik e Yariwake (2010) identificaram na polpa da espécie *P. edulis* 16,3 mg de isoorientina/mL de polpa. No entanto, é necessária a realização de mais estudos para a comprovação da presença destas substâncias nas polpas de *Passifloras*.

Nas sementes de maracujá são encontrados os mesmos flavonoides da polpa e casca (pericarpo), e também os compostos cianogênicos, prunasina e sambunigrina. Além disso, a semente deste fruto é uma importante fonte de fibras insolúveis (Zibadi e Watson, 2004).

Além da utilização do fruto do maracujazeiro pela indústria alimentícia, tem sido empregado o extrato de suas folhas, principalmente da espécie *Passiflora incarnata* Linn para a elaboração de suplementos, infusões e/ou tinturas. O consumo de seus extratos hidroalcoólicos tem sido associado a efeitos ansiolíticos em experimentos com animais (Dhawan et al., 2001). Os chás das folhas de *Passiflora* são amplamente utilizados na medicina popular em países da América e Europa como sedativo, diurético, no tratamento de hipertensão e de algumas doenças de pele (Dhawan et al., 2004).

Rudnicki et al., (2007) realizaram um experimento *ex-vivo* avaliando os efeitos antioxidantes e antiglicação dos extratos etanólicos das folhas de *P. alata* e *P. edulis* e concluíram que estes extratos podem ser considerados possíveis antioxidantes naturais, por serem capazes de controlar o estresse oxidativo induzido por ferro nas células hepáticas de ratos.

Gupta et al., (2012) avaliaram o efeito antidiabetogênico da *P. incarnata* L. em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina. Este estudo mostrou que os extratos metanólicos das folhas de *P. incarnata* podem ser uma alternativa ou um complemento no tratamento da diabetes mellitus, pois apresentaram resultados significativos na redução dos níveis de glicose sanguínea além de terem apresentado melhoras em alguns parâmetros como a tolerância oral a glicose, peso corporal, perfil lipídico e regeneração das ilhotas de Langerhans.

O **Quadro 1** apresenta os principais flavonoides encontrados em algumas espécies de *Passiflora* e sua localização. Pode –se observar que não há estudos referentes às espécies de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Quadro 1. Principais flavonoides encontrados em algumas espécies de *Passiflora* e sua localização.

Espécie	Parte da planta	Flavonoides	Referência
<i>P. alata</i>	Folha	Vitexina-2''-O-raminosídeo; homoorientina; orientina; isovitexina; vitexina; hiperosídeo; apigenina; 2''-xilossilvitexina; rutina.	Zucolotto et al., 2011; Müller et al., 2005; Pereira et al., 2004; Ulubelen, 1982; Freitas, 1985; Oga et al., 1984; Moraes et al., 1997; Pereira et al., 2005.
	Pericarpo	vitexina-2''-O-raminosídeo	Zucolotto et al., 2011;
<i>P. edulis</i> variedade flavicarpa	Folha	luteolina-2; luteolina-6-C-quinovosídeo; luteolina-6-C-fucosídeo; vicenina-2; 6,8-di-C-glicosilcrisina; espinosina; homoorientina; orientina; isovitexina; rutina.	Zucolotto et al., 2011; Li et al., 2011; Deng et al., 2010
	Pericarpo	vicenina-2; 6,8-di-C-glicosilcrisina; espinosina; homoorientina.	Zucolotto et al., 2011.
	Polpa	homoorientina; rutina	Zeraik, 2010; Zeraik et al., 2011.
	Casca	Homoorientina	Zeraik et al., 2011.
<i>P. tripartita</i> variedade mollissima	Mesocarpo	Homoorientina	Zeraik et al., 2011.
	Folha	vicenina-2; swertisina; homoorientina; orientina; isovitexina; vitexina.	Zucolotto et al., 2011.
	Pericarpo	homoorientina; orientina; isovitexina.	Zucolotto et al., 2011
	Folha	vitexina-2''-O-ramnosídeo	Zucolotto et al., 2011
	Folha	vitexina-2''-O-ramnosídeo; homoorientina; orientina; isovitexina; vitexina.	Zucolotto et al., 2011; Menghini et al., 1993.
<i>P. incarnata</i>	Folha	isovitexina; hiperosídeo; vitexina; apigenina; crisina.	Müller et al., 2005; Singh et al., 2012
	Flor, fruto, folha e caule.	vicenina-2; isoorientina-2''-O-β-glucopirionidase; isoshaftosídeo; shaftosídeo; homoorientina; orientina; quercetina; apigenina.	Elsas et al., 2010.

Flavonoides	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
6,8 – di – c – glicosilerisina	H	H	glucose	glucose	H	H	
Apigenina	OH	H	H	H	H	H	H
Crisina	H	H	H	H	H	H	H
Homoorientina	OH	OH	glucose	H	H	H	H
Isoshaftosideo	OH	H	arabinose	glucose	H	H	H
Isovitexina	OH	H	glucose	H	H	H	H
Luteolina – 6 – C – fucosideo	OH	OH	fucose	H	H	H	H
Luteolina – 6 – C – quinovosideo	OH	OH	quinose	H	H	H	H
Quercetina	OH	OH	H	H	H	H	H
Orientina	OH	OH	H	glucose	H	H	H
Rutina	OH	H	H	H	H	OH	O - rutinosila
Shaftosideo	OH	H	glucose	arabinose	H	H	H
Swertisina	OH	H	glucose	H	CH ₃	H	H
Vicenina - 2	OH	H	glucose	glucose	H	H	H
Vitexina	OH	H	H	glucose	H	H	H
Vitexina – 2'' – O – raminosideo	OH	H	H	glucose-O - ramnose	H	H	H

Figura 3. Principais flavonoides encontrados em algumas espécies de *Passiflora* spp.

Diante do apresentado, nota-se que os trabalhos são focados na identificação de novas moléculas e nas atividades farmacológicas de seus flavonoides e alcaloides, contudo há uma falta de consenso em relação à composição destes compostos em *Passiflora* spp e a falta de dados em relação às eventuais diferenças entre as espécies.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar e comparar os frutos e infusões das folhas das espécies de *Passiflora* (*Passiflora edulis* Sims variedades BRS Sol do Cerrado, Ouro Vermelho e Gigante Amarelo, *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora setacea* DC e *Passiflora tenuifila* Killip) em relação aos teores de fenólicos totais, proantocianidinas, vitamina C, flavonoides, alcaloides, controle potencial de glicemia pós-prandial (inibição de α -amilase e α -glicosidase) e capacidade antioxidante *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

As amostras de frutas *in natura* ($n = 30-50$ frutos/ espécie) foram obtidas diretamente da Embrapa - Cerrados, e foram separadas em pericarpo e polpa com semente, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas, somente os pericarpos foram triturados em graal com pistilo. Após liofilização, separaram-se as sementes da polpa, obtendo-se as frações pericarpo, polpa e semente das amostras que foram individualmente homogeneizadas em moinho analítico (modelo A10 S2, IKA Works Inc., Wilmington, NC) sob refrigeração, e posteriormente armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (freezer) até o momento da análise. As folhas previamente desidratadas, também foram obtidas diretamente da Embrapa – Cerrados e homogeneizadas em moinho analítico (modelo A10 S2, IKA Works Inc., Wilmington, NC) sob refrigeração, e posteriormente armazenadas a temperatura ambiente até o momento da análise.

As Passifloras foram cultivadas na área experimental da Embrapa Cerrados (CAPC), Planaltina DF. A condução do maracujá foi realizada em espaldeira vertical e com irrigação por gotejamento durante todo o período seco. A correção do solo (Latosolo Vermelho Argiloso) foi realizada dois anos antes com calcário dolomítico para elevar $V\% = 60$. O clima da região é do tipo AW, caracterizado por chuvas concentradas no verão e invernos secos, com baixa ou ausência de precipitação nos meses de maio a setembro (Melo 1999). As amostras foram coletadas no período chuvoso (Dezembro/2011 a Março de 2012). Folhas completamente desenvolvidas foram obtidas da porção mediana de pelo menos 8 plantas adultas e foram desidratadas à temperatura de 56°C em estufa de ventilação forçada durante 5 dias (até a massa permanecer constante) e armazenadas à temperatura ambiente até a realização das análises.

3.2. Métodos

3.2.1. Peso médio e porcentagem de pericarpo e polpa com sementes

O peso médio foi determinado pesando-se vinte frutos inteiros das variedades de *Passiflora* spp. Após pesagem, os frutos foram separados em pericarpo e polpa com semente e pesados novamente. A porcentagem de pericarpo foi determinada através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ pericarpo} = \frac{P_1 \times 100}{P_2}$$

onde P_1 refere-se ao peso do pericarpo e P_2 ao peso do fruto inteiro. E a porcentagem de polpa com semente foi determinada através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ polpa com semente} = \frac{P_1 \times 100}{P_2}$$

onde P_1 refere-se ao peso da polpa com semente e P_2 ao peso do fruto inteiro.

3.2.2. Determinação de umidade

A determinação de umidade das variedades comerciais de *Passiflora* foi feita pesando-se cerca de 2 gramas de amostra de pericarpo e polpa com semente, em liofilizador a vácuo (Dura-Top MP, Bulk Tray Dryer, FST Systems ®) durante 96 horas (AOAC, 2005). A determinação foi feita em triplicata, e os resultados foram expressos como percentual, na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.2.3. Preparo das infusões

As folhas secas das diversas espécies de *Passiflora* foram utilizadas para o preparo de infusões, de acordo com o método de Kodama et al., (2010), como descrito a seguir.

O procedimento foi realizado em triplicata imergindo-se cerca de 1,5 g de amostra em

200 mL de água destilada a 97°C por 5 minutos. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº6 e tiveram seu volume ajustado com água destilada para balão volumétrico de 200 mL.

3.2.4. Determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro*

3.2.4.1. Extração

As amostras de folhas secas, pericarpo, polpa e sementes liofilizadas foram extraídas, em triplicata, com metanol aquoso 70% (armazenado em freezer) na proporção de 1:20 (m/v) para pericarpo, polpa e sementes, e na proporção de 0.2:20 (m/v) para folha, com agitador magnético e barra magnética por 1 hora a 4 °C. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar sob-refrigeração a 4°C até o momento da análise e diluídos, se necessário, em metanol aquoso 70%.

3.2.4.2. Fenólicos Totais

Este ensaio foi realizado de acordo com Singleton et al., (1999), modificado por Genovese et al., (2003). Utilizou-se 0,25 mL dos extratos obtidos, adicionou-se a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho a 37 °C durante 30 minutos para desenvolvimento de cor e posterior medição da absorbância.

A absorbância a 750 nm foi determinada em espectrofotômetro Hewlett – Packard 8453 (Palo Alto, EUA) e o conteúdo de fenólicos totais calculado utilizando-se curva-padrão de catequina (Sigma chemical Co., St. Louis, EUA), após descontar a interferência causada pela vitamina C. Os resultados obtidos foram expressos como mg de catequina por 100 g de amostra (b.s.).

3.2.4.3. Sequestro de radicais livres - DPPH[•]

A capacidade antioxidante foi avaliada utilizando-se o método do sequestro de radicais livres do DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra, método proposto por Brand-Williams et al., (1995) com algumas modificações (Duarte – Almeida et al., 2006). Uma solução metanólica de DPPH[•] (0,05 mM) foi preparada para apresentar em torno de 0,4 de absorbância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 200 µL da solução de DPPH[•], 40 µL de metanol para o grupo controle, o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox e para os extratos obtidos das amostras, adequadamente diluídos, quando necessário. As leituras de absorbância foram efetuadas a 517 nm no tempo zero e após 20 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca SynergyTM H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) a 25°C.

Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoramento do DPPH}^{\bullet} = [(A_{517(C)} - A_{517(A)}) / A_{517(C)}] \times 100$$

onde, $A_{517(C)}$ refere-se à absorbância do controle a 517 nm e $A_{517(A)}$ refere-se à absorbância da amostra a 517 nm.

A curva padrão foi preparada com uma solução de Trolox em metanol grau analítico em diferentes concentrações e suas respectivas porcentagens de descoramento. Os resultados foram expressos como µmoles equivalentes de Trolox por g (b.s).

3.2.4.4. Determinação do poder redutor do ferro – método FRAP

A capacidade de redução do ferro foi determinada de acordo com Benzie e Strain (1996) com modificações. O reagente de FRAP foi preparado na concentração de 10:1: 1 com as seguintes soluções: (a) tampão acetato de sódio (Dinâmica) 300 mM a pH 3,6; (b) solução de 2, 4,6-tripiridil-s-triazine (TPTZ – Flucka Chemicals Suisse) 10 mM em ácido clorídrico (VETEC) 40 mM e (c) solução de cloreto férrico (Synth) 20 mM. O reagente foi preparado no momento da

análise. Como padrão foi utilizado o reativo ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (TROLOX – Flucka Chemicals Suisse) em concentração de 50 a 400 μM . A leitura da absorbância foi feita em 593 nm utilizando-se espectrofotômetro de microplaca SynergyTM H1 a 37°C. Os resultados foram expressos em mmol equivalentes de Trolox por g (b.s.).

3.2.4.5. Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

A Capacidade de absorção de radicais de oxigênio foi determinada de acordo com Dávalos et al., (2004), com as modificações a seguir. O extrato hidrometanólico das amostras (25 μL), obtido em 3.2.3.1, com as devidas diluições em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, o controle e uma curva padrão de Trolox (0,002 M) foram misturados com 150 μL de uma solução de fluoresceína (40 nM) e incubados a uma temperatura de 37°C por 15 min antes da adição de 25 μL da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (APPH) (153 mM), que dá início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nm ex/520 nm em) foi verificada a cada 1 minuto até o tempo final de 80 min, em espectrofotômetro de fluorescência, marca Biotek modelo Synergy H1. A capacidade antioxidante foi determinada pela curva resultante da perda de fluorescência da fluoresceína versus a concentração de antioxidante. Uma curva padrão de trolox foi feita a cada ensaio, nas concentrações de 6,25 μM a 100 μM , e os resultados foram expressos em μmoles equivalentes de Trolox/g de amostra (b.s.).

3.2.5. Quantificação e caracterização das proantocianidinas

3.2.5.1 Determinação colorimétrica de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado

As amostras de folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) foram extraídas, em triplicata, com acetona aquosa 80% (armazenada em freezer) na proporção de 1:20 (m/v) para pericarpo, polpa e semente, e na proporção de 0,2: 20 (m/v) para folhas, com agitador magnético e barra magnética por 1 hora a 4 °C. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar sob refrigeração a 4°C até o momento da análise e diluídos, se necessário em acetona aquosa 80%.

O método do butanol acidificado utilizado para a quantificação das proantocianidinas foi o método cromogênico descrito por Porter et al., (1986). Foi preparada uma solução de n-butanol e ácido clorídrico concentrado na proporção de 3 para 2, e a seguir 77 mg de sulfato de ferro hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em meio litro do butanol acidificado. Adicionou-se 2,5 mL desta solução a 250 μL do extrato devidamente diluído em um tubo de ensaio. Do mesmo modo, uma curva padrão foi preparada, variando de 0 a 2,4 mg/mL de tanino quebracho (QT, Unitan, Buenos Aires, Argentina). Os tubos foram tampados e deixados em banho a 95 ° C por 15 minutos; então, após leve agitação, tiveram sua absorbância medida em espectrofotômetro a 540 nm em cubeta de vidro de caminho ótico de 1 cm. A quantidade de proantocianidinas foi calculada com base na curva padrão e expressa em mg equivalentes de tanino quebracho por g de amostra em b.s.

3.2.5.2 Determinação colorimétrica de proantocianidinas pelo método DMAC

As amostras de folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) foram extraídas, em triplicata, com acetona: água: ácido acético (70: 29,5: 0,5 v/v/v) na proporção de 0,5: 10 (m/v), em ultrassom por 30 minutos. Em seguida foram colocadas sob agitação com barra magnética por 1 hora a 4°C. Os extratos foram centrifugados a 2000 rpm a 10°C por 10 minutos e coletou-se o sobrenadante. Os sobrenadantes foram armazenados em frascos de vidro âmbar sob refrigeração a 4°C até o momento da análise e diluídos em etanol aquoso 80%.

O método DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyde, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foi realizado de acordo com Prior et al., (2010). As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Foi preparada uma solução reagente de DMAC (0,1 %) em etanol: água: ácido clorídrico (75: 12,5: 12,5 v/v/v). Adicionou-se 210 μL desta solução a 70 μL do extrato devidamente diluído. Do mesmo modo, uma curva padrão foi preparada, variando de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de procianidina B2 (HPLC, purity > 99%, Extrasynthese). A leitura da absorbância foi realizada a cada minuto durante 30 minutos a 640 nm utilizando-se espectrofotômetro de microplaca SynergyTM H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) a 25°C. Os resultados foram expressos como mg equivalente de procianidina B2/g de amostra (b.s).

3.2.5.3 Caracterização estrutural das proantocianidinas

3.2.5.3.1 Preparo das amostras

A extração das proantocianidinas das frações pericarpo, polpa, semente e folha das diferentes espécies de *Passiflora* foi realizada segundo Robbins et al., (2009). As amostras foram misturadas com acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5 v/v/v) e agitadas em vortex por 30 segundos. Os extratos foram então colocados em banho a 37 °C por 12 horas. Em seguida, foram colocados em ultrassom (UC-3200TA, Ningbo HaiShu Sklon E- Instruments Co, China) a 37 °C por 1 hora. Os extratos obtidos foram deixados em repouso, ao abrigo da luz, por 30 minutos e em seguida centrifugados por 5 minutos a 3200 g. O resíduo foi re-extraído mais uma vez e os sobrenadantes foram combinados. Para concentração dos extratos e eliminação da acetona foi utilizado Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40 °C. Cerca de 3 g de Sephadex LH-20, preparada em seringa própria de 60 mL, foi embebida e equilibrada com água por 4 horas. A coluna de LH-20 foi acondicionada com 25 mL de acetona aquosa 50%, seguido de 25 mL de metanol e, finalmente, 50 mL de metanol aquoso 30%. O extrato aquoso foi adicionado à coluna Sephadex LH-20, previamente acondicionada. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 30 mL de metanol aquoso 30%. A eluição das proantocianidinas foi feita com 70 mL de acetona. Foi utilizado manifold Visiprep 24 DL (Supelco, Bellefonte, PA). Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5 v/v/v) e filtradas em filtros de polivinilideno (PVDF) (Chromspec, Ontario, CA) de 0,45 µm de poro.

3.2.5.3.2 Identificação e quantificação das proantocianidinas

A identificação das proantocianidinas foi realizada de acordo com Robbins et al., (2009). A separação das proantocianidinas (PACs) foi realizada em HPLC Agilent 1260 Infinity Series System acoplado ao detector de fluorescência. Como fase móvel, foram utilizados diclorometano/ácido acético e metanol/ácido acético. A detecção da fluorescência foi conduzida em 230 nm de comprimento de excitação e 321 nm de comprimento de emissão. A coluna

cromatográfica analítica utilizada foi Develosil (100 Diol-5, 250 × 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula, Phenomenex).

3.2.6. Determinação dos flavonoides por CLAE/ DAD

3.2.6.1. Extração dos flavonoides dos frutos de *Passiflora* spp

A extração foi realizada segundo Arabbi et al., (2004) com adaptações, as amostras foram extraídas com metanol aquoso 70 % (armazenado em freezer) na proporção de 2:200 (m/v), através de agitador magnético, por duas horas a 25 °C. Os extratos obtidos foram filtrados em papel-filtro Whatman nº 6. Para concentração dos extratos foi utilizado rotaevaporador em temperaturas de banho de 40 °C (até aproximadamente 20 mL). As amostras concentradas, já sem metanol, tiveram o seu volume ajustado com adição de água em um balão volumétrico de 20 mL. Uma alíquota de 6 mL (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de Poliamida. As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos flavonoides foi feita com 40 mL de metanol seguido de 40 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado manifold Visiprep 24DL da Supelco. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol (grau cromatográfico) e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação dos flavonoides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.6.2 Extração dos flavonoides das folhas de *Passiflora* spp

As amostras de folhas secas foram extraídas com metanol aquoso 70% (armazenado em freezer) na proporção de 0,5:200 (m/v), com agitador magnético e barra magnética por 2 horas a 4 °C. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. Para concentração dos extratos será utilizado Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40°C (até ~2 mL). As amostras concentradas, livres de metanol, tiveram então seu volume ajustado com metanol (grau HPLC) para balão volumétrico de 2 mL e foram filtradas

utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 μm de poro. As extrações foram realizadas em duplicata e a quantificação dos flavonoides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/ DAD)

A separação dos flavonoides foi realizada em coluna C18 Synergi 4 μ Fusion RP (250 x 4,6 mm; 4 μm) (Phenomenex, EUA) de acordo com Arabbi et al., (2004) com algumas modificações. Foi utilizado um gradiente de solvente, constituído por: (A) Água: Tetrahydrofurano: Ácido trifluoroacético (98: 2: 0,1) e (B) Acetonitrila. A proporção do solvente B foi crescente e nas seguintes proporções, 10% por 10 minutos, 15% por 2 minutos, 25% por 2 minutos, 80% por 3 minutos e 10% por 3 minutos em fluxo de 1 mL/minuto a 25°C. Para limpeza da coluna, foi alterada a porcentagem inicial do solvente B para 90% e, em seguida, foi reequilibrada nas condições iniciais por 10 minutos. A calibração foi realizada com os padrões homoorientina, orientina, vitexina e isovitexina obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). O cromatógrafo líquido utilizado foi o do sistema Hewlett Packard 1100, constituído por injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de diodo (DAD), controlados pelo software ChemStation. Os cromatogramas foram obtidos utilizando-se λ 270 e 370 nm. As amostras foram injetadas em duplicata. Os resultados foram expressos em μg por g de amostra (b.s.).

3.2.7 Determinação dos flavonoides por UPLC/ MS

3.2.7.1 Extração

As amostras foram extraídas com metanol aquoso 80 % na proporção de 0,5:25 (m/v) em ultrassom (UC-3200TA, Ningbo HaiShu Sklon E- Instruments Co, China), por vinte minutos a 37 °C e agitadas em vortex por 10 segundos a cada 5 minutos de ultrassom. Os extratos obtidos foram centrifugados por 4 minutos a 4000 rpm. O resíduo foi re-extraído mais uma vez e os sobrenadantes foram combinados. Os extratos foram filtrados utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 μm de poro. As extrações foram realizadas em

duplicata e a quantificação dos flavonoides foi realizada em cromatógrafo UPLC Waters Aquity equipado com espectrômetro de massa acoplado ao sistema de ionização por eletronebulização (ESI) e software MassLynx (Waters Corp.).

3.2.7.2 Identificação e quantificação dos flavonoides

A separação dos flavonoides foi realizada em cromatógrafo UPLC Waters Aquity equipado com espectrômetro de massa acoplado ao sistema de ionização por eletronebulização (ESI) e software MassLynx (Waters Corp.) A coluna cromatográfica analítica utilizada foi Acquity™ UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula), Waters. No cromatógrafo líquido foram utilizados ácido fórmico 1% e acetonitrila como fase móvel. A acetonitrila foi utilizada na proporção de 5% por 0,5 minuto aumentando para 10% após 1,5 minutos, 15% após 0,5 minuto, 40% após 1,5 minutos, 50% após 1,5 minutos, 60% após 1,5 minutos, 100% após 5,1 minutos e 5% após 2,9 minutos. O espectrômetro de massa foi operado em modo negativo sob as seguintes condições: voltagem do capilar 3 kV, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C e vazão do gás de dessolvatação (N₂) 650 L/h. O comprimento de onda 260 nm foi utilizado para apresentação dos cromatogramas.

3.2.8 Determinação de alcaloides

3.2.8.1 Extração

As amostras foram extraídas com metanol aquoso 80 % na proporção de 0,5:25 (m/v) em ultrassom (UC-3200TA, Ningbo HaiShu Sklon E- Instruments Co, China), por vinte minutos a 37 °C e agitadas em vortex por 10 segundos a cada 5 minutos de ultrassom. Os extratos obtidos foram centrifugados por 4 minutos a 4000 rpm. O resíduo foi re-extraído mais uma vez e os sobrenadantes foram combinados. Os extratos foram filtrados utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em duplicata e a quantificação dos alcaloides foi realizada em cromatógrafo UPLC Waters Aquity equipado com espectrômetro de massa acoplado ao sistema de ionização por eletronebulização (ESI) e software MassLynx (Waters Corp.).

3.2.8.2 Identificação e quantificação dos alcaloides

A separação dos alcaloides foi realizada em cromatógrafo UPLC Waters Aquity equipado com espectrômetro de massa acoplado ao sistema de ionização por eletronebulização (ESI) e software MassLynx (Waters Corp.) A coluna cromatográfica analítica utilizada foi Acquity™ UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula), Waters. No cromatógrafo líquido foram utilizados ácido fórmico 1% e acetonitrila como fase móvel. A acetonitrila foi utilizada na proporção de 5% por 0,5 minuto aumentando para 10% após 1,5 minutos, 15% após 0,5 minuto, 40% após 1,5 minutos, 50% após 1,5 minutos, 60% após 1,5 minutos, 100% após 5,1 minutos e 5% após 2,9 minutos. O espectrômetro de massa foi operado em modo negativo sob as seguintes condições: voltagem do capilar 3 kV, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C e vazão do gás de dessolvatação (N₂) 650 L/h. O comprimento de onda 260 nm foi utilizado para apresentação dos cromatogramas.

3.2.9 Determinação do perfil de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência

A identificação e a quantificação dos açúcares foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por índice de refração. As amostras foram extraídas com etanol aquoso 80%. Uma alíquota dos extratos foi aquecida a 70 °C em banho de água, seguida de agitação em vortex e centrifugação. Parte do sobrenadante (1 mL) foi evaporada até a secagem em evaporador reacti-therm III, por cerca de uma hora a 40 °C. O resíduo seco foi ressuspensão em água e filtrado em filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, MA) de 0,45 µm de poro. Os açúcares foram detectados e quantificados em cromatógrafo a líquido equipado com refratômetro. Para as análises, foram utilizados a coluna Sugar-Pak (Waters, Milford, USA), em gradiente isocrático, fase móvel composta por água contendo 5% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e fluxo de 0,5 mL/min, em temperatura ambiente. A curva padrão foi feita com padrões de glicose, frutose e sacarose (5, 10, 50, 100, 500, 1000 e 1500 µg/mL). Os resultados foram expressos em mg/100 g amostra (b.s.).

3.2.10 Determinação de Vitamina C

As análises do ácido ascórbico foram realizadas segundo Abe et al., (2011). As amostras foram homogeneizadas com ácido metafosfórico 3% (m/v), em proporção 0,2:2 (m/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® de 0,45 µm. Foi preparada uma solução reagente de DTT (ditiotreitól) em trizina: DTT: água (0,4: 0,38: 10 m/m/v). Adicionou-se 250 µL desta solução em 250 µL do sobrenadante filtrado e após 30 minutos adicionou-se 500 µL de tampão cloreto de potássio 2 mM, pH 2,5 corrigido com ácido ortofosfórico para a análise da vitamina C total. As amostras foram analisadas em CLAE utilizando coluna BondapakTMC18 (3,9 × 300 mm; 10 µm) (Waters, IRL), fase móvel composta por tampão cloreto de potássio 2 mM, pH 2,5 corrigido com ácido ortofosfórico, fluxo de 0,8 mL/minuto. A curva padrão foi feita com padrão de ácido ascórbico Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA) de concentrações 10 e 100 µg/mL. A detecção foi realizada por UV a 254 nm. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra (b.s).

3.2.11 Determinação da atividade inibitória da α -amilase e α -glicosidase

3.2.11.1 Obtenção dos extratos

As amostras foram extraídas com metanol aquoso 70%. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman n° 1. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes. Para concentração dos extratos e remoção do metanol foi utilizado Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40 °C. O volume foi então ajustado com água para balão volumétrico de volume adequado e uma alíquota do extrato (pipetada sob agitação lenta) foi adicionada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com 50 mL de metanol seguido de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5 v/v). As frações eluídas em metanol e metanol:amônia foram combinadas, rotaevaporadas até secagem completa e ressuspensas em 10 mL de metanol.

3.2.11.2 Inibição da α -amilase

Este ensaio foi baseado no método descrito por Ali et al., (2006) e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de maltose pela ação da enzima α -amilase sobre o amido. Para tanto, foi preparada uma solução 0,5 mg/mL da enzima α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI-A, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) dissolvida em tampão fosfato 0,2 M (pH 6,9). O substrato utilizado na reação foi amido de batata 0,5% (m/v), também dissolvido em tampão fosfato 0,2 M, com breve aquecimento. Neste ensaio, 40 μ L do extrato, 160 μ L de água destilada e 400 μ L da solução de amido 0,5% foram adicionados a um tubo de ensaio e incubados a 25 °C por 3 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 200 μ L de solução enzimática em tempos diferentes (0, 1, 2, 3 minutos). Uma alíquota de 200 μ L da solução obtida foi retirada e adicionada em outro tubo de ensaio contendo 100 μ L de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 96 mM), o qual foi colocado imediatamente em banho a 85 °C. Após 15 minutos, a mistura foi retirada do banho e diluída com 900 μ L de água destilada. A atividade da α -amilase foi determinada pela leitura a 540 nm em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) utilizando-se espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). O controle positivo da reação representava 100% da atividade enzimática e foi conduzido da mesma forma, utilizando 40 μ L e metanol no lugar do extrato. Para o branco da reação, a solução enzimática foi substituída por água destilada e o procedimento foi realizado da mesma maneira descrita acima. No tempo zero, as amostras foram adicionadas a solução de DNS imediatamente após a adição de enzima. A produção de maltose foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Produção de maltose} = A_{540\text{nm}} (\text{amostra ou controle}) - A_{540\text{nm}} (\text{branco})$$

Onde A_{540} representa a absorbância referente à produção de maltose do controle ou do extrato. Através da absorbância de maltose produzida, pode-se calcular a porcentagem de maltose gerada pela equação da reta obtida pela curva padrão.

A porcentagem de inibição de formação de maltose foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [(\% \text{ maltose produzida no extrato no tempo 3 minutos} / \%$$

$$\% \text{ maltose produzida no controle no tempo 3 minutos}) \times 100]$$

Os resultados obtidos foram expressos em μg de amostra em base seca/mL do meio de reação e também em μg equivalente de catequina/mL do meio de reação necessários para inibir em 50% a formação de maltose.

3.2.11.3 Inibição da α -glicosidase

Este ensaio foi baseado no método descrito por Watanabe et al., (1997) com algumas modificações realizadas por Kim et al., (2000) e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de glicose liberada na quebra do substrato pela enzima. A enzima α -glicosidase (EC 3.2.1.20, tipo I, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) – 0,7 U / 10 μg / mL – isolada de fungo, foi dissolvida em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) contendo 2,0 g/L de albumina bovina sérica (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 0,2 g/L de azida sódica (NaN_3). O substrato utilizado na reação foi o p-nitrofenil- α -D-glicosídeo, também dissolvido em tampão fosfato (pH 7,0). Para o ensaio, 100 μL da solução enzimática foram adicionados a 20 μL de extrato em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), a qual foi incubada por 5 minutos a 37 °C. Após incubação, foram adicionados 100 μL de substrato. Procedeu-se outra incubação por 5 minutos a 37 °C. Foram efetuadas leituras de absorbância a 405 nm no tempo zero e após 10 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os extratos foram diluídos em várias proporções ($1/2$, $1/3$, $1/5$, $1/10$, $1/20$, $1/40$), em cada análise realizada, de modo a obter linearidade em relação à porcentagem de inibição da amostra. Os cálculos foram efetuados a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs}_{405 \text{ nm}}(\text{controle}) - \text{Abs}_{405 \text{ nm}}(\text{amostra})}{\text{Abs}_{405 \text{ nm}}(\text{controle})} \times 100$$

Onde $Abs_{405\text{ nm}}$ (controle) refere-se à absorvância do controle a 405 nm e $Abs_{405\text{ nm}}$ (amostra) à absorvância da amostra a 405 nm.

Os resultados obtidos foram expressos em μg de amostra em base seca/mL do meio de reação e também em μg equivalente de catequina/ mL do meio de reação necessários para inibir em 50% a formação de glicose.

3.12 Análise dos resultados

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizado o programa Statistica versão 10.0 da StatSoft (Tulsa, E.U.A.). A comparação das médias foi realizada por análise de variância (ANOVA) e pelo teste LSD ($P < 0,05$). A comparação das médias foi realizada por ANOVA ($P < 0,05$), teste de Tukey e as correlações avaliadas segundo teste de Pearson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Tabela 1** apresenta os valores de peso médio, % pericarpo, % polpa com semente e teores de umidade (%) das frações pericarpo e polpa com semente dos frutos das diferentes espécies de *Passiflora* analisadas, no mesmo estágio de maturação. O peso médio dos frutos variou de 22 g (*P. tenuifila*) a 443 g (*P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado). A porcentagem de pericarpo de todas as espécies correspondeu a mais de 50% do fruto, exceto *P. setacea* que apresentou 43% de pericarpo. O teor de umidade variou de 74 a 89% para os pericarpos e de 56 a 87% para as polpas com sementes. O pericarpo de *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo foi a que apresentou maior teor de umidade e a da *P. alata*, o menor. Entre as polpas, a *P. alata* foi a que apresentou o maior teor de umidade (87%), *P. tenuifila*, o menor.

Estes resultados mostram a ampla variabilidade encontrada nos frutos das diversas espécies de *Passiflora*, o que também pode ser confirmado nas **Figuras 4 e 5**. *P. tenuifila* apresenta frutos pequenos e com pouca polpa. Todas as variedades de *P. edulis* e a *P. alata* apresentam frutos grandes, e a *P. setacea*, embora com frutos pequenos, estes apresentam elevada porcentagem de polpa.

Tabela 1. Peso médio, % pericarpo, % polpa com semente e teores de umidade (%) das frações pericarpo e polpa com semente dos frutos das diferentes espécies analisadas.

Espécies de <i>Passiflora</i>		Peso médio dos frutos (g)	% pericarpo	% polpa com sementes	Umidade Pericarpo (%) *	Umidade Polpa com Sementes (%)
<i>P. edulis</i>	Ouro Vermelho	288±11 ^c	50±3 ^b	50±3 ^b	84±2 ^b	76±2 ^b
	Gigante Amarelo	319±24 ^b	54±4 ^b	46±3 ^c	89±1 ^a	77±2 ^b
	Sol do Cerrado	443±39 ^a	58±4 ^b	41±3 ^c	85±2 ^b	61±6 ^c
<i>P. tenuifila</i>		22±3 ^f	77±3 ^a	23±3 ^d	85±2 ^b	56±1 ^d
<i>P. alata</i>		130±5 ^d	60±4 ^b	40±6 ^c	74 ± 3 ^d	87,1 ± 0,4 ^a
<i>P. setacea</i>		52±4 ^e	43±2 ^c	57±3 ^a	80±3 ^c	75±3 ^b

Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

* pericarpo.

Figura 4. Frutos das espécies de *Passiflora* analisadas. 1 – *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho. 2 – *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo. 3 – *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado.

Figura 5. Frutos das espécies de *Passiflora* analisadas. 1 – *P. tenuifila*. 2 – *P. alata*. 3 – *P. setacea*.

4.1 Perfil de açúcares dos frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora* spp

A **Tabela 2** apresenta o conteúdo de açúcares encontrado nos frutos de diferentes espécies de *Passiflora* separados em suas frações constituintes pericarpo, polpa e semente. Neste estudo, os frutos de *Passiflora* spp apresentaram alto teor total de açúcares e como era esperado, o conteúdo de açúcares foi maior em todas as polpas. Sacarose, glicose e frutose foram os açúcares predominantes em *Passifloras*. As polpas de *P. setacea*, *P. alata* e *P. tenuifila* foram as que apresentaram maiores teores de sacarose, glicose e frutose, respectivamente.

O teor de açúcares no suco de maracujá das variedades amarela e roxa foi determinado por Chan e Kwok (1975) utilizando CG e derivatização, e foram encontradas concentrações similares de frutose, D – glucose e sucrose nos sucos das duas variedades. Chau e Huang (2004)

verificaram que as sementes cruas de *P. edulis* (variedade não especificada) apresentam uma pequena quantidade de carboidratos.

Geralmente, o *ratio* glucose/frutose é importante para determinar o conteúdo natural de frutose em frutas (Ramaiya et al., 2012). No presente estudo, os valores de *ratio* foram praticamente iguais (*ratio* aproximadamente iguais a 1,0 nas polpas de todos os cultivares de *P. edulis* e *P. setacea*) ou ligeiramente maiores (1,06 para polpa de *P. tenuifila* e 1,13 para polpa de *P. alata*).

Tabela 2. Conteúdo de açúcares nos frutos de diferentes espécies de *Passiflora* separados em suas frações constituintes pericarpo, polpa e sementes (mg/100 g amostra b.s.).

Espécies de <i>Passiflora</i>			Açúcar não redutor	Açúcar redutor		G/F <i>ratio</i>
			Sacarose	Glicose	Frutose	
<i>P. edulis</i> variedade BRS	Ouro Vermelho	Pericarpo	392 ± 16	185 ± 7	239 ± 6	-
		Polpa	1384 ± 74	509 ± 1	511 ± 9	0,99
		Sementes	30 ± 4	11 ± 1	12 ± 2	-
	Gigante Amarelo	Pericarpo	316 ± 5	84 ± 2	117 ± 2	-
		Polpa	1111 ± 61	503 ± 6	517 ± 13	0,97
		Sementes	28 ± 3	16 ± 2	15 ± 0,1	-
	Sol do Cerrado	Pericarpo	468 ± 23	194 ± 2	269 ± 2	-
		Polpa	1087 ± 62	637 ± 3	636 ± 15	1,00
		Sementes	38,74 ± 0,02	23 ± 1	25 ± 2	-
<i>P. tenuifila</i>		Pericarpo	104 ± 3	715 ± 3	680 ± 10	-
		Polpa	295 ± 3	875 ± 2	823 ± 17	1,06
		Sementes	73 ± 6	156 ± 11	151 ± 14	-
<i>P. alata</i>		Pericarpo	1081 ± 5	60±4	209 ± 4	-
		Polpa	1163 ± 44	910 ± 28	802 ± 43	1,13
		Sementes	82 ± 10	37 ± 9	33 ± 8	-
<i>P. setacea</i>		Pericarpo	499 ± 13	504 ± 13	328 ± 11	-
		Polpa	1551 ± 37	600 ± 14	606 ± 4	0,99
		Sementes	35 ± 3	22 ± 4	22 ± 4	-

4.2 Teores de fenólicos totais dos frutos e folhas de diferentes espécies de *Passiflora* spp

No presente estudo, foram avaliados os teores de fenólicos totais dos frutos e folhas de diferentes espécies de *Passiflora* separados em suas frações constituintes folha, pericarpo, polpa e semente (**Figura 6**). O teor médio de fenólicos totais dos pericarpos foi de 361 ± 112 mg equivalentes de catequina/100 g, sendo o pericarpo de *P. tenuifila* o que apresentou maior teor de fenólicos totais.

O teor de fenólicos totais das sementes de *P. setacea* foi o maior, cerca de 26 vezes superior às sementes de todas as variedades de *P. edulis* e *P. alata*, 4 vezes superior às sementes de *P. tenuifila*.

Observou-se que as folhas apresentaram teor médio de fenólicos totais de 1500 ± 200 mg equivalentes de catequina/100 g, cerca de seis vezes maior que o teor médio das polpas (242 ± 108 mg equivalentes de catequina/100 g). Ainda, os teores das folhas foram bem mais homogêneos que os apresentados pelas polpas das diferentes espécies.

Figura 6. Teor total de compostos fenólicos das folhas e frutos (pericarpio, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora*, através da capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg EC/100 g amostra b.s.).

4.3 Capacidade antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante das folhas e frutos de diferentes espécies de *Passiflora* separados em suas frações constituintes folha, pericarpo, polpa e sementes foi analisada por meio de três diferentes ensaios – capacidade de sequestro do DPPH[•] (Brand-Williams et al., 1995) (**Figura 7**), capacidade redutora do ferro (FRAP) (Benzie e Strain, 1996) (**Figura 8**) e pela capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (Dávalos et al., 2004) (**Figura 9**).

Em relação à capacidade de sequestro do radical DPPH[•], pericarpo de *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, polpa de *P. tenuifila* e semente de *P. setacea*, foram as que mais se destacaram. Já as que apresentaram menor capacidade de sequestro do radical DPPH[•] foram pericarpo de *P. setacea*, polpa de *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado e semente de *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho.

De acordo com um estudo realizado por Vasco et al., (2008), a capacidade de sequestro do radical DPPH[•] em polpa de *P. edulis* variedade flavicarpa foi de $0,5 \pm 0,3$ μ moles equivalentes de trolox/g amostra. Entretanto, no presente estudo encontraram-se um valores muito mais elevados em relação às polpas de todas as variedades de *P. edulis* analisadas. Esta diferença poderia ser devida à maior eficiência da extração utilizada neste estudo (metanol aquoso 70%), embora Vasco et al., (2008) tenham utilizado dois solventes diferentes para a extração (metanol aquoso 50% e acetona aquosa 70%). Contudo, essa diferença também pode ser justificada por fatores extrínsecos tais como as condições climáticas, o local, a época de plantio e diferença entre os cultivares, fatores que sabidamente afetam os teores de antioxidantes (Tomás-Barberan e Espín, 2001).

Pericarpo e polpa da espécie *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho e sementes de *P. setacea* apresentaram a maior capacidade redutora do ferro (FRAP), e a menor capacidade foi apresentada por polpa de *P. alata*, pericarpo e sementes de *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo. Todos os pericarpos apresentaram maior capacidade redutora do ferro que as respectivas polpas. As folhas de *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, pericarpo e polpa de *P. tenuifila* e sementes de *P. setacea* apresentaram a maior capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), e a menor capacidade foi apresentada na folha de *P. tenuifila*, pericarpo de *P. edulis* cultivar Sol do Cerrado, polpa de *P. setacea* e semente de *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo.

Figura 7. Capacidade de sequestro de radicais livres das folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora*, através do método da capacidade sequestrante do DPPH ($\mu\text{moles ET}/100 \text{ g b.s.}$).

Figura 8. Capacidade antioxidante das folhas e frutos (pericarpio, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora*, através da capacidade de redução de ferro (FRAP) (mmoles ET/ 100 g amostra b.s.).

Figura 9. Capacidade antioxidante das folhas e frutos (pericarpio, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora*, através da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (mmoles ET/ 100 g amostra b.s.).

No presente estudo podemos verificar que pericarpo e folha da espécie *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, semente da espécie *P. setacea*, polpa e pericarpo da espécie *P. tenuifolia* foram as que mais se destacaram em relação à capacidade de sequestro do radical DPPH[•], capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), respectivamente, e, portanto poderiam ser consideradas as melhores fontes de antioxidantes.

4.4 Coeficiente de correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro*

Ou et al., (2002) determinaram a capacidade antioxidante de 927 amostras de vegetais e através dos métodos de ORAC e FRAP, e concluíram que os resultados obtidos pelo método de ORAC são mais representativos, pois este método reflete o sequestro do radical peroxil pelas amostras analisadas. Em contraste, o método FRAP estima apenas a atividade redutora do Fe (III), o que não seria relevante em modelos fisiológicos. O coeficiente de correlação de Pearson obtido por Ou et al., (2002) entre ORAC e FRAP foi de 0,707.

A **Tabela 3** apresenta os coeficientes de correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* para *Passiflora* spp. Houve uma correlação significativa entre os teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro*, sendo que os valores mais altos foram obtidos entre os teores de fenólicos totais e capacidade de sequestro do DPPH[•] ou capacidade redutora do ferro (FRAP). Já a capacidade redutora do ferro (FRAP) e a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) apresentaram uma baixa correlação entre si.

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* (Capacidade de sequestro do DPPH[•], capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade de absorção do radical oxigênio – (ORAC)).

METODOLOGIA	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Fenólicos totais X DPPH [•]	0,991
Fenólicos totais X FRAP	0,976
Fenólicos totais X ORAC	0,904
DPPH [•] X FRAP	0,989
DPPH [•] X ORAC	0,871
FRAP X ORAC	0,810

Os compostos fenólicos são substâncias oriundas do metabolismo secundário vegetal com função de proteção contra agentes agressores como herbívoros, bactérias, vírus além de servir para a atração de polinizadores. Os taninos, uma classe de polifenólicos, possuem a característica de redução da palatabilidade e digestibilidade (Harborne, 1997; Wink, 2003; Kessler, 2006). A alta concentração de compostos fenólicos em sementes seria, portanto, um mecanismo de defesa contra doenças e pestes. Uma possível resposta para a presença de polifenólicos em sementes, de acordo com Martín et al., (1991), Islam et al., (2003) e Latanzio et al., (2005), derivaria da cobertura externa desta estrutura, o tegumento ou testa, garantindo proteção da semente contra parasitas.

4.5 Teores de proantocianidinas

As proantocianidinas (PACs) contribuem de forma significativa para o consumo de polifenóis na dieta ocidental, devido à sua ampla distribuição entre as diferentes espécies vegetais (Santos-Buelga e Scalbert, 2000). Entretanto, não existem muitos dados disponíveis na literatura científica sobre o perfil qualitativo e quantitativo desses compostos nos alimentos, o que se deve, principalmente, a dificuldade de se encontrar um método apropriado para caracterizá-los e/ou quantificá-los.

A reação do butanol acidificado age sobre proantocianidinas por autocatálise, auto-oxidação (requer O_2) e oxidação direta (requer a ligação de íons metálicos nas hidroxilas vicinais do anel B), formando antocianidinas. A coloração vermelha se deve em grande parte à estrutura de ressonância obtida pelo ganho da olefina no anel C e, em menor grau, ao deslocamento batocrômico causado pela ligação do íon metálico na hidroxila em meta do anel B (Porter et al., 1986).

O método DMAC otimizado por Prior et al., (2010) para análise de *cranberry* tem sido considerado o mais adequado analiticamente e tem sido utilizado para quantificar as proantocianidinas em alimentos analisados pelo Programa Nacional de Análise de Alimentos e Nutrientes do USDA - EUA (NFNAP). O mecanismo da reação do reagente DMAC com uma molécula de proantocianidina não está claramente definido, embora acredita-se que ele reaja com compostos apresentando grupos hidroxila meta orientados na molécula de flavonoide e com uma ligação simples na posição 2 e 3 no anel C (Mcmurrough e McDowell, 1978).

Neste trabalho, foram detectados teores amplamente variáveis de proantocianidinas, e para *P. edulis*, as polpas das 3 variedades apresentaram teores mais elevados que os pericarpos/ sementes, respectivamente. Na quantificação do teor de proantocianidinas pelo método do n-butanol de Porter et al., (1986), pericarpo de *P. tenuifila*, polpa e semente de *P. setacea* apresentaram o maior teor de proantocianidinas. As sementes de *P. setacea*, surpreendentemente, apresentaram teores de proantocianidinas equivalentes a mais de dez vezes os encontrados nas outras espécies. Já pericarpo e semente da espécie *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo e polpa da espécie *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado apresentaram os menores teores de proantocianidinas. Entretanto, Watson e Dallwitz (2012) afirmam que as proantocianidinas estão

ausentes nas espécies de *Passiflora*. Dessa forma, utilizou-se um segundo método (DMAC), para confirmar a presença desse tipo de taninos nos frutos do maracujá. Através deste método, pericarpo de *P. tenuifila* foi o que mais se destacou, porém sua polpa e semente não apresentaram teores detectáveis de proantocianidinas. Ainda, não houve correlação entre os resultados obtidos através dos dois métodos, e o elevado teor de proantocianidinas das sementes de *P. setacea* não foi confirmado pelo método DMAC (**Tabela 4**).

Tabela 4. Teores de proantocianidinas pelo método do n-butanol (mg equivalentes de tanino quebracho/g amostra b.s.) e DMAC (mg equivalente de procidina B2/g de amostra b.s.) nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) nas diferentes espécies de *Passiflora*.

Espécies de <i>Passiflora</i>			Proantocianidinas	
			n-butanol	DMAC
<i>P. edulis</i> variedade BRS	Ouro Vermelho	Folhas	12,3 ± 0,5 ^a	2,4 ± 0,3 ^c
		Pericarpo	15,6 ± 1,5 ^k	106 ± 6 ^b
		Polpa	26,1 ± 0,8 ^{h,j}	1,32 ± 0,08 ^o
		Sementes	6,97 ± 1,27 ^m	48 ± 4 ^g
	Gigante Amarelo	Folhas	n.d	n.d
		Pericarpo	4,7 ± 0,1 ^o	1,9 ± 0,1 ^m
		Polpa	24,6 ± 1,4 ^h	1,6 ± 0,1 ⁿ
		Sementes	5,2 ± 0,5 ^{o, p}	84 ± 3 ^c
	Sol do Cerrado	Folhas	n.d	n.d
		Pericarpo	11,6 ± 0,5 ^l	14,4 ± 0,3 ^l
		Polpa	23,3 ± 1,2 ^{h, i}	3,9 ± 0,3 ^k
		Sementes	6,1 ± 0,9 ⁿ	2,7 ± 0,3 ^l
<i>P. tenuifila</i>		Folhas	n.d	n.d
		Pericarpo	53 ± 5 ^b	223 ± 15 ^a
		Polpa	25,96 ± 0,06 ^h	n.d
		Sementes	38,6 ± 2,7 ^d	n.d
<i>P. alata</i>		Folhas	20,2 ± 0,5 ^b	3,9 ± 0,7 ^b
		Pericarpo	29,8 ± 2,6 ^f	70 ± 7 ^d
		Polpa	36,7 ± 3,2 ^e	n.d
		Sementes	7,3 ± 0,4 ^m	13 ± 1 ^j
<i>P. setacea</i>		Folha	n.d	n.d
		Pericarpo	28,2 ± 0,2, ^{f, g}	33 ± 2 ^h
		Polpa	45,8 ± 1,1 ^c	61,4 ± 2,6 ^e
		Semente	556 ± 48 ^a	50,6 ± 0,9 ^f

n.d.- não detectado.

4.6 Caracterização estrutural e identificação das proantocianidinas

As proantocianidinas são compostos de grande complexidade e diversidade estrutural, cuja análise requer a utilização de uma metodologia específica, como a separação cromatográfica baseada no grau de polimerização, a qual permite a identificação e a quantificação de diversos compostos de estruturas variadas de forma categórica (Santos-Buelga e Williamson, 2003).

Fluorescência é o sistema de detecção mais utilizado para identificação, uma vez que é conhecido por sua seletividade e fornece um sinal mais forte que a detecção por absorção ultravioleta para proantocianidinas (Lazarus et al., 2001).

Dessa forma, os oligômeros de proantocianidinas foram separados por cromatografia a líquido com detector de fluorescência. O perfil das PACs observado nas espécies de *Passiflora* e suas frações é apresentado na **Tabela 5** e os cromatogramas nas **Figuras 10 e 11**.

De modo geral, nas amostras analisadas foram detectados monômeros a tetrâmeros, estando a maior parte presente na forma de monômeros e dímeros. As sementes de todas as espécies analisadas apresentaram teores variados de monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros e foram as que mais se destacaram em relação ao conteúdo de proantocianidinas.

Os estudos epidemiológicos mostram que alimentos ricos em PACs apresentam efeitos benéficos contra doenças cardiovasculares. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a absorção intestinal de lipídeos, secreção de quilomícrons pelo intestino e secreção de VLDL no fígado são reprimidos pela ação das PACs, levando à redução da hiperlipidemia (Quesada et al., 2011).

Este é o primeiro estudo que mostra a presença de PACs em *Passiflora* spp.

Figura 10. Cromatograma obtido por CLAE acoplado à fluorescência a partir da extração do pericarpo de *Passiflora* spp demonstrativo do perfil de distribuição das proantocianidinas ($\lambda_{EX}=230$ nm, $\lambda_{Em}=321$ nm).

Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE acoplado à fluorescência a partir da extração do sementes de *Passiflora* spp demonstrativo do perfil de distribuição das proantocianidinas ($\lambda_{EX}=230$ nm, $\lambda_{Em}=321$ nm).

Tabela 5. Conteúdo de proantocianidinas (mg/100 g amostra b.s.) identificadas nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passiflora* spp.

Espécies de <i>Passiflora</i>		Monômero	Dímero	Trímero	Tetrâmero	Pentâmero	Hexâmero	Heptâmero	Polímero
<i>P. edulis</i> variedade BRS	Ouro Vermelho	Pericarpo	$2 \pm 0,01^m$	$0,4 \pm 0,01^r$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Polpa	$0,6 \pm 0,01^p$	$1,5 \pm 0,01^o$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$5 \pm 0,2^d$
		Semente	$20 \pm 0,1^e$	103 ± 5^f	20 ± 1^d	$4 \pm 0,3^c$	n.d.	n.d.	n.d.
	Gigante Amarelo	Folha	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Pericarpo	$3,5 \pm 0,01^l$	$1,3 \pm 0,01^p$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Polpa	$3 \pm 0,01^k$	$4 \pm 0,1^l$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Semente	$17 \pm 0,1^i$	133 ± 10^e	30 ± 2^c	$7,4 \pm 0,1^a$	n.d.	n.d.	n.d.
	Sol do Cerrado	Folha	n.d.	$3 \pm 0,1^m$	$1,5 \pm 0,01^h$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Pericarpo	$1,1 \pm 0,01^o$	$1,3 \pm 0,01^p$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Polpa	$7 \pm 0,01^i$	9 ± 1^j	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$6 \pm 0,1^c$
	<i>P. tenuiflora</i>	Semente	$34 \pm 0,2^d$	145 ± 7^d	32 ± 1^b	$6,4 \pm 0,1^b$	n.d.	n.d.	n.d.
		Folha	n.d.	$4 \pm 0,1^l$	$3 \pm 0,1^l$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>P. alata</i>	<i>P. tenuiflora</i>	Pericarpo	$9 \pm 0,1^h$	$12 \pm 0,1^h$	$2 \pm 0,2^g$	$0,7 \pm 0,01^f$	n.d.	n.d.	$13 \pm 0,1^a$
		Polpa	82 ± 1^c	312 ± 10^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Semente	620 ± 5^a	2339 ± 40^a	31 ± 1^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>P. alata</i>	Folha	$3 \pm 0,01^k$	9 ± 1^j	$4 \pm 0,1^e$	$1 \pm 0,1^e$	$0,8 \pm 0,01^a$	n.d.	$3 \pm 0,01^e$
		Pericarpo	$3 \pm 0,01^k$	$11 \pm 0,2^l$	$3 \pm 0,1^f$	$1,3 \pm 0,1^d$	$0,6 \pm 0,01^b$	$0,1 \pm 0,01^a$	$9 \pm 0,1^b$
		Polpa	$1,5 \pm 0,01^n$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>P. setacea</i>	<i>P. setacea</i>	Semente	$13 \pm 0,6^g$	$89 \pm 0,01^g$	26 ± 1^c	$4,5 \pm 0,2^c$	n.d.	n.d.	n.d.
		Folha	$1,6 \pm 0,01^n$	$2,4 \pm 0,01^n$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Pericarpo	n.d.	$1 \pm 0,01^q$	$0,2 \pm 0,01^i$	$0,04 \pm 0,01^g$	n.d.	n.d.	$9 \pm 0,1^b$
	<i>P. setacea</i>	Polpa	$2,3 \pm 0,01^l$	$7 \pm 0,01^k$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Semente	374 ± 9^b	$502 \pm 0,01^b$	$40 \pm 0,01^a$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Folha	$0,3 \pm 0,01^q$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. - não detectado. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

4.7 Determinação de flavonoides dos frutos de *Passiflora* spp.

No presente estudo foi realizado um screening nas frações pericarpo, polpa e sementes das espécies de *P. edulis* variedades BRS Ouro Vermelho, Gigante Amarelo e Sol do Cerrado, *P. alata* e *P. setacea* para identificar a presença de possíveis flavonoides. Os picos dos possíveis flavonoides foram identificados através de seus espectros UV, devido às suas bandas de absorção características: banda II, com $\lambda_{\text{máx}}$ entre 250 – 295 nm, resultante do anel A (**Figura 1**) e a banda I, $\lambda_{\text{máx}}$ entre de 300 – 385 nm, resultante do anel B (Figura 1). As flavonas apresentam um $\lambda_{\text{máx}}$ entre 250 – 280 nm na banda II e um $\lambda_{\text{máx}}$ entre 310 – 350 nm na banda I, os flavonóis apresentam um $\lambda_{\text{máx}}$ entre 250 – 280 nm na banda II e um $\lambda_{\text{máx}}$ entre 330 – 385 nm na banda I e as flavanonas apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ entre 275 – 295 nm na banda II e um $\lambda_{\text{máx}}$ entre 300 – 330 nm na banda I (Mabry et al., 1970).

A **Figura 12** mostra o perfil cromatográfico dos padrões homoorientina, orientina, isovitexina e vitexina a 270 e 370 nm e as **Figuras 13, 14 e 15** mostram o perfil cromatográfico a 270 e 370 nm das frações pericarpo, polpa e semente das espécies analisadas.

Figura 12. Perfil cromatográfico dos padrões de flavonoides detectados a 270 e 370 nm. 1 – homoorientina (Tr = 6,320 min.), 2 – orientina (Tr = 9,191 min.), 3 – isovitexina (Tr = 10,028 min.) e 4 – vitexina (Tr = 10,183). A cor azul indica o comprimento de onda a 270 nm e a cor vermelha o comprimento de onda a 370 nm. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura 13. Perfil cromatográfico dos flavonoides dos pericarpos de *Passiflora* spp detectados a 270 e 370 nm. A- *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, 1^{a,b,c}: flavona. B – *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo, 1^{a,b,c,d,e,f,g}: flavona. C – *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado, 1^{a,b,c,d,e,f}: flavona. D – *P. alata*, 11^{a,b,c}: flavona, 2^{a,b,c}: flavonol. E – *P. setacea*, 1^{a,b}: flavona, 2^{a,b}: flavonol, 3: flavanona. Coluna Prodigy 5μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Figura 14. Perfil cromatográfico dos flavonoides das polpas de *Passiflora* spp detectados a 270 e 370 nm. A- *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, 1^{a,b}: flavona. B – *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo, 1^{a,b,c}: flavona. C – *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado, 1^{a,b,c}: flavona. D – *P. alata*. E – *P. setacea*, 1: flavona, 2: flavona, 3: flavonol, 3: flavonol, 3: flavonol, 3: flavonol.

Figura 15. Perfil cromatográfico dos flavonoides das sementes de *Passiflora* detectados a 270 e 370 nm. A- *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, 4: composto desconhecido, 5: piacetanol. B – *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo, 4: composto desconhecido, 5: piacetanol, 6: proantocianidina. C – *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado. D – *P. alata*, 5: piacetanol. E – *P. setacea*, 7: composto desconhecido, 5: piacetanol. Coluna Prodigy 5 μ ODS (3) 250 x 4,60 mm.

Nos pericarpos e polpas da espécie *P. edulis* variedades BRS Ouro Vermelho, Gigante Amarelo e Sol do Cerrado foram identificados possíveis flavonoides da classe flavona, somente as sementes de *P. edulis* variedades BRS Ouro Vermelho e Gigante Amarelo apresentaram possíveis flavonoides da classe flavanona.

A espécie *P. alata* apresentou possíveis flavonoides da classe flavona e flavonol, apenas em seu pericarpo. Pericarpo e polpa da espécie *P. setacea* apresentaram a presença de flavona, flavonol e flavanona e suas sementes apenas flavanona.

Os flavonoides encontrados em espécies de *Passiflora* são principalmente do tipo C-glicosídeos, nos quais os açúcares apresentam pouca diversificação, sendo o principal a glicose, e estão diretamente ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono resistente à hidrólise, apenas nas posições 6 e 8 do núcleo dos flavonoides (Jay, 1996).

A grande maioria dos trabalhos sobre os flavonoides do maracujá foi realizada em folhas e partes aéreas (Zeraik et al., 2010) o que torna difícil a comparação deste estudo com outras referências.

Assim como Matsui et al., (2010) este trabalho também detectou a presença do estilbeno piceatanol (3,4,3',5'-tetrahidroxi-trans-estilbeno) nas sementes de *P. edulis* variedades BRS Ouro Vermelho (2mg/100 g b.s.) e Gigante Amarelo (3mg/100 g b.s.) e *P. alata* (10 mg/100 g b.s.). Este composto possui funções antialérgicas e inibição da síntese da melanina e é encontrado em um número limitado de plantas (Matsuda et al., 2001; Yokozama e Kim, 2007).

4.8 Compostos fenólicos em folhas de *Passiflora* spp e suas respectivas infusões

Foram avaliados os teores de fenólicos totais, proantocianidinas e capacidade antioxidante *in vitro* em extratos em metanol aquoso 70% e infusões das folhas de diferentes espécies de *Passiflora* (**Tabela 6**). As folhas apresentaram teor médio de fenólicos totais de 1500 ± 200 mg equivalentes de catequina/100 g, cerca de duas vezes maior que o teor médio das polpas (242 ± 108 mg equivalentes de catequina/100 g). As infusões preparadas a partir das folhas apresentaram elevada concentração de compostos fenólicos, sendo que a eficiência de solubilização foi de 76 a 100% (valor médio de 90%) em relação ao extrato metanólico.

O extrato metanólico e a infusão das folhas da espécie *P. edulis* cultivar Gigante Amarelo, foram as que mais se destacaram em relação à capacidade de sequestro do radical DPPH[•]. Já os

extratos metanólicos das espécies *P. tenuifila* e *P. setacea* e a infusão da espécie *P. setacea* apresentaram a menor capacidade de sequestro do radical DPPH'.

Na análise da capacidade redutora do ferro (FRAP) a espécie *P. edulis* cultivar Sol do Cerrado foi a que mais se destacou nos extratos analisados. Entretanto os extratos da espécie *P. setacea* apresentaram a menor capacidade redutora do ferro (FRAP) no presente estudo.

O extrato metanólico e a infusão das folhas da espécie *P. edulis* cultivar Ouro Vermelho, foram as que mais se destacaram em relação a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). Já o extrato metanólico e a infusão da espécie *P. tenuifila* apresentaram a menor capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).

Os dois métodos espectrofotométricos utilizados para a quantificação de proantocianidinas não permitiram conclusões definitivas sobre a presença destes compostos em folhas de *Passiflora* spp. Somente as espécies *P. edulis* cultivar Ouro Vermelho e *P. alata* apresentaram teores de proantocianidinas pelo método do n-butanol. Através do método DMAC, todas as folhas apresentaram proantocianidinas, sendo que a espécie *P. tenuifila* foi a que mais se destacou e a espécie *P. edulis* cultivar Sol do Cerrado a que apresentou o menor teor.

Tabela 6. Teor de fenólicos totais (mg equivalentes de catequina/100g amostra b.s.), teores de proantocianidinas pelo método do n-butanol (mg equivalentes de tanino quebracho/g amostra b.s.) e DMAC (mg equivalente de procianidina B2/g de amostra b.s.), capacidade de sequestro do DPPH[•] (μ mol equivalentes de Trolox/g amostra b.s.), poder redutor do ferro FRAP (mmol equivalentes de Trolox/g amostra b.s.) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (mmoles ET/100 g amostra b.s.) nos extratos metanólicos, acetônicos e infusão das folhas de *Passiflora* spp.

Espécies de <i>Passiflora</i>		Fenólicos Totais	Proantocianidinas		Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i>		
			n-butanol	DMAC	DPPH [•]	FRAP	ORAC
<i>P. edulis</i>	Ouro Vermelho	Extrato	12,3 $\pm$ 0,5 ^a	2,4 $\pm$ 0,3 ^c	42 $\pm$ 2 ^d	3,1 $\pm$ 0,1 ^e	486 $\pm$ 15 ^a
		Infusão	n.d.	n.a.	36 $\pm$ 1 ^e	4,1 $\pm$ 0,2 ^c	405 $\pm$ 5 ^b
	Gigante Amarelo	Extrato	n.d.	2,6 $\pm$ 0,1 ^c	49 $\pm$ 4 ^a	3,04 $\pm$ 0,10 ^e	446 $\pm$ 4 ^c
		Infusão	n.d.	n.a.	44 $\pm$ 1 ^b	5,1 $\pm$ 0,3 ^a	396 $\pm$ 3 ^d
<i>Passiflora tenuiflora</i>	Sol do Cerrado	Extrato	n.d.	1,3 $\pm$ 0,1 ^d	42 $\pm$ 4 ^{c,d}	3,7 $\pm$ 0,2 ^d	386 $\pm$ 36 ^d
		Infusão	n.d.	n.a.	40 $\pm$ 1 ^d	4,6 $\pm$ 0,1 ^b	300 $\pm$ 5 ^f
<i>Passiflora alata</i>	Passiflora alata	Extrato	n.d.	16,6 $\pm$ 0,3 ^a	36 $\pm$ 1 ^e	2,4 $\pm$ 0,1 ^f	166 $\pm$ 5 ⁱ
		Infusão	n.d.	n.a.	24 $\pm$ 1 ^h	2,3 $\pm$ 0,1 ^f	96 $\pm$ 7 ^j
<i>Passiflora setacea</i>	Passiflora setacea	Extrato	20,2 $\pm$ 0,5 ^b	3,9 $\pm$ 0,7 ^b	36 $\pm$ 2 ^f	1,97 $\pm$ 0,04 ^f	368 $\pm$ 5 ^e
		Infusão	n.d.	n.a.	28 $\pm$ 1 ^g	2,8 $\pm$ 0,1 ^e	298 $\pm$ 6 ^f
<i>Passiflora setacea</i>	Passiflora setacea	Extrato	n.d.	2,9 $\pm$ 0,3 ^c	28 $\pm$ 1 ^g	1,8 $\pm$ 0,1 ^f	231 $\pm$ 3 ^g
		Infusão	n.d.	n.a.	20 $\pm$ 1 ⁱ	2,4 $\pm$ 0,3 ^e	197 $\pm$ 2 ^h

n.a. – não analisado. n.d – não detectado. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A **Tabela 7** apresenta os coeficientes de correlação entre os métodos testados. Ao contrário do que foi observado para as frações folha, pericarpo, polpa e sementes (**Tabela 3**), não houve correlação significativa entre os valores de capacidade antioxidante determinados pelos métodos de DPPH[·], FRAP, ORAC e os teores de fenólicos totais dos extratos metanólicos e infusões determinados com o reagente de Folin-Ciocalteu. Esses resultados indicam a presença de outros compostos responsáveis pela capacidade antioxidante das folhas de *Passiflora* spp. Comparando-se a correlação obtida entre os métodos testados nas frações folhas, pericarpo, polpa e sementes pode-se afirmar que a capacidade antioxidante dos frutos de *Passiflora* spp está diretamente relacionada ao seu conteúdo de fenólicos totais.

Tabela 7. Coeficiente de correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* (Capacidade de sequestro do DPPH[·], capacidade redutora do ferro (FRAP) e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)).

METODOLOGIA	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Fenólicos totais X DPPH [·]	-0,196
Fenólicos totais X FRAP	0,126
Fenólicos Totais X ORAC	0,651
DPPH [·] X FRAP	0,723
DPPH [·] X ORAC	0,778
FRAP X ORAC	0,485

4.9 Determinação de flavonoides nas folhas de *Passiflora* spp.

A composição e o teor de flavonoides presentes nas folhas de *Passiflora* spp foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/DAD). Os flavonoides são normalmente encontrados como derivados glicosilados. Neste estudo, os teores foram expressos em concentração equivalente das respectivas agliconas, por serem compostos que realmente tem significado biológico. A **Tabela 8** mostra que há diferenças significativas nos teores de flavonoides nas folhas de *Passiflora* spp, inclusive para folhas da mesma espécie.

Tabela 8. Composição e teor de flavonoides presentes em folhas de *Passiflora* spp das espécies *Passiflora edulis* cultivares Sol do Cerrado, Ouro Vermelho e Gigante Amarelo, *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora setacea* DC e *Passiflora tenuifila* Killip expresso em mg/100 g de amostra em b.s..

Espécies de <i>Passiflora</i>		Homoorientina*	Orientina**	Isovitexina***
<i>P. edulis</i>	Ouro Vermelho	38 ± 1	n.d.	47 ± 6
	Gigante Amarelo	42 ± 1	n.d.	21 ± 1
	Sol do Cerrado	22,1 ± 0,4	n.d.	11 ± 3
<i>P. tenuifila</i>		8 ± 2	n.d.	n.d.
<i>P. alata</i>		20 ± 1	20 ± 2	n.d.
<i>P. setacea</i>		15,2 ± 0,3	n.d.	n.d.

n.d – não detectado. Resultados expressos em média ± desvio padrão. *LOD – 1, 4 µg/mL; LOQ – 0, 45 µg/mL. **LOD – 1, 12 µg/mL; LOQ – 0, 36 µg/mL. ***LOD – 0,54 µg/mL; LOQ – 0,18 µg/mL.

Neste estudo, a homoorientina foi detectada nas folhas de todas as espécies analisadas, a orientina foi identificada apenas em uma variedade (*P. alata*) e a isovitexina foi observada nas folhas das três cultivares de *P. edulis*.

Abourashed et al., (2002) realizaram um estudo com folhas de 115 amostras de diferentes espécies de *Passiflora*, onde homoorientina, orientina e isovitexina foram detectas em 51 espécies e a vitexina foi detectada em 38 espécies de *Passiflora*. Nas espécies de *P. alata* e *P.*

edulis avaliadas por Abourashed et al., (2002) não foram encontrados os flavonoides pesquisados, porém a variedade *P. edulis* “Golden nugget” apresentou homoorientina, orientina e isovitexina e na espécie *P. tenuifila* foram detectados os flavonoides homoorientina, isovitexina e vitexina na espécie de *P. tenuifila*. Entretanto, no presente estudo apenas o flavonoide homoorientina foi identificado nas folhas desta espécie (**Figuras 16 – 22**).

Outro estudo realizado por Li et al., (2011) comparou a atividade ansiolítica dos flavonoides das espécies *P. edulis* ‘edulis’ e *P. edulis* ‘flavicarpa’. Foram identificados na espécie *P. edulis* ‘flavicarpa’ lucenin-2, vicenin-2, homoorientina, isovitexina, luteolina-6-C-quinosídeo e luteolina-6-C-fucosídeo, entretanto nenhum flavonoide foi identificado na outra espécie avaliada, porém, as duas espécies apresentaram efeito ansiolítico.

Müller et al., (2005) identificaram em extratos metanólicos das folhas de *P. alata* os seguintes flavonoides: isovitexina, vitexina, hiperosídeo e apigenina. Zucolotto et al., (2012) também avaliaram os flavonoides C glicosídeos nas folhas das espécies de *Passiflora* e encontraram homoorientina, orientina e isovitexina nas folhas de *P. alata*.

Figura 16. Cromatograma em 270 nm dos padrões usados. 1: homoorientina (Tr = 6,740 min.), 2: orientina (Tr = 8,015 min.), 3: vitexina (Tr = 10,699 min.), 4: isovitexina (Tr = 11,009 min.). Coluna C18 Synergi 4 μ Fusion RP (250 x 4,6mm;4 μ m).

Figura 17. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. edulis* cultivar Ouro Vermelho detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1: homoorientina, 4: isovitexina. Coluna C18 Synergi 4 μ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4 μ m).

Figura 18. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. edulis* cultivar Gigante Amarelo detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1: homoorientina, 4: isovitexina. Coluna C18 Synergi 4 μ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4 μ m).

Figura 19. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. edulis* cultivar Sol do Cerrado detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1: homoorientina, 4: isovitexina. Coluna C18 Synergi 4 μ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4 μ m).

Figura 20. Perfil cromatográfico do flavonoide da folha de *P. tenuifolia* detectado a 270 nm. O algarismo arábico sobreposto ao cromatograma expressa a identificação do flavonoide. 1: homoorientina. Coluna C18 Synergi 4 μ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4 μ m).

Figura 21. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. alata* detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1:homoorientina, 2: orientina. Coluna C18 Synergi 4 μ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4 μ m).

Figura 22. Perfil cromatográfico dos flavonoides da folha de *P. setacea* detectados a 270 nm. Os algarismos arábicos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonoides. 1: homoorientina, 2: isovitexina. Coluna C18 Synergi 4 μ Fusion RP (250 x 4,6mm; 4 μ m).

4.10 Perfil de flavonoides por UPLC/MS

Há um crescente interesse científico no estudo dos compostos fenólicos, em especial os flavonoides e os taninos, devido a suas propriedades antioxidantes e outras atividades biológicas com efeito benéfico à saúde (Gil et al., 2000).

Os flavonoides apresentam vários efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica e vasodilatadora. Além disso, estas substâncias inibem a peroxidação lipídica e reduzem o risco de doenças cardiovasculares, efeitos estes relacionados à sua atividade antioxidante, caracterizada pela capacidade de sequestrar radicais livres em organismos vivos (Hollman et al., 1996; Cook e Samman, 1996; Hollman e Katan, 1999).

A composição e o teor de flavonoides nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora* foi determinado por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) equipado com espectrômetro de massa.

Um grande número de espécies de *Passiflora* vem sendo estudada quanto a sua composição de compostos fenólicos. Estudos anteriores concluíram que as espécies de *Passiflora* são ricas em flavonas C-glicosiladas (Xu et al., 2013).

A **Tabela 9** apresenta a composição e o teor de flavonoides nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) nas diferentes espécies de *Passiflora*.

Neste estudo, a homoorientina foi detectada em todas as frações analisadas, e seus teores variaram de 0,1 a 632 mg/100 g de amostra b.s.. Os maiores teores de flavonoides foram encontrados nas folhas (*P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado > *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo > *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho > *P. alata* > *P. setacea* > *P. tenuifila*), em comparação com as partes constituintes dos frutos. O flavonoide encontrado em maior concentração, tanto em folhas como em frutos, foi a homoorientina, seguida pela isovitexina. Tanto orientina como vitexina foram detectadas em concentrações relativamente bem inferiores, ou não foram detectadas (e.g. frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea*).

Em relação aos frutos, o pericarpo concentra os maiores teores tanto de homoorientina como de isovitexina, em comparação com a polpa e as sementes.

Através da análise feita por CLAE/DAD nas folhas de Passifloras os teores de homoorientina variaram de 8 a 42 mg/100 g de amostra b.s., pode -se justificar esta diferença nos

teores devido à sensibilidade dos métodos utilizados.

A orientina, diferentemente da análise por CLAE/DAD, foi detectada nas folhas de todas as espécies de *Passiflora* analisadas. Pericarpo e polpa de todas as variedades de *P. edulis* também apresentaram teores de orientina.

Na análise feita por CLAE/DAD nas folhas de *Passiflora* spp, o composto vitexina não foi detectado em nenhuma das espécies analisadas, entretanto ele foi identificado e quantificado em todas as folhas nas análises realizadas por UPLC/MS.

O composto isovitexina foi detectado nas frações folha, pericarpo, polpa e sementes de todas as espécies analisadas, com exceção das sementes de *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho e *P. tenuifila*.

Um estudo realizado em 1990 usando CLAE por Mareck et al., com sucos industrializados de maracujá amarelo, detectou os flavonoides isovitexina, vitexina e orientina. Zeraik e Yariwake (2010) identificaram por CL-EM/EM os flavonoides: isoorientina e isovitexina na polpa de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Ichimura et al., (2006) analisaram por CL-EM/EM as cascas de *P. edulis* (variedade não especificada), encontrando o flavonoide homoorientina (2 mg/100 g), neste estudo, o mesmo composto também foi detectado no pericarpo de todas as variedades de *P. edulis* analisadas (19 – 26 mg/100 g).

Tabela 9. Composição e o teor de flavonoides identificados nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora* expressos em mg/100g de amostra b.s..

Espécies de <i>Passiflora</i>			Homoorientina	Orientina	Isovitexina	Vitexina
<i>P. edulis</i> variedade BRS	Ouro Vermelho	Folha	456	4,3	229	2
		Pericarpo	19	0,6	1	n.d.
		Polpa	5	0,2	0,2	n.d.
		Sementes	0,1	n.d.	n.d.	n.d.
	Gigante Amarelo	Folha	554	5,5	101	1
		Pericarpo	24	1	0,6	n.d.
		Polpa	3,1	0,1	0,1	n.d.
		Sementes	0,8	n.d.	0,2	n.d.
	Sol do Cerrado	Folha	632	8,5	86	1
		Pericarpo	26	0,8	1	n.d.
		Polpa	2,4	0,1	0,1	n.d.
		Sementes	0,3	n.d.	0,1	n.d.
<i>P. tenuifila</i>		Folha	32	0,5	2,5	0,3
		Pericarpo	7,7	n.d.	0,4	n.d.
		Polpa	0,1	n.d.	0,2	n.d.
		Sementes	0,02	n.d.	n.d.	n.d.
<i>P. alata</i>		Folha	144	4,4	94	11
		Pericarpo	7,6	0,1	1	n.d.
		Polpa	0,2	n.d.	0,2	n.d.
		Sementes	0,1	n.d.	0,03	n.d.
<i>P. setacea</i>		Folha	117	1,1	61	1
		Pericarpo	0,9	n.d.	0,2	n.d.
		Polpa	0,1	n.d.	0,2	n.d.
		Sementes	0,1	n.d.	0,1	n.d.

n.d.- não detectado.

4.11 Alcaloides

Abourashed et al., (2003) realizaram um estudo com 104 espécies de *Passiflora* utilizando CLAE, e identificaram e quantificaram cinco alcalóides β -carbolínicos em 53 espécies de *Passiflora*, entre elas a *P. alata*, onde foram detectados os alcaloides harmana, harmina e harmalina. O alcalóide harmina foi o mais abundante sendo identificado e quantificado em 47 espécies. O alcaloide harmalol foi o menos abundante, sendo identificado em apenas 4 espécies das 104 espécies analisadas.

Neste estudo, o alcaloide harmalina não foi detectado em nenhuma das espécies de *Passiflora* analisadas, e harmalol não foi analisado por falta do padrão. O alcaloide harmana foi o mais abundante nas espécies analisadas em comparação com harmina (**Tabela 10**).

As variedades de *P. edulis*, apresentaram a maior concentração de alcaloides, e os teores foram significativamente mais elevados nas polpas, relativamente iguais em pericarpo, sementes e folhas. *P. alata* foi a única espécie que não apresentou alcaloides.

Tabela 10. Composição e teores de alcaloides presentes nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das diferentes espécies de *Passiflora*, expresso em mg/100 g de amostra em b.s..

Espécies de <i>Passiflora</i>			Harmana	Harmina
<i>P. edulis</i> variedade BRS	Ouro Vermelho	Pericarpo	0,001	n.d.
		Polpa	0,1	0,007
		Semente	0,001	n.d.
		Folha	0,03	n.d.
	Gigante Amarelo	Pericarpo	0,01	0,001
		Polpa	0,1	0,01
		Semente	0,002	0,002
		Folha	0,02	0,001
	Sol do Cerrado	Pericarpo	0,03	0,007
		Polpa	0,2	0,02
		Semente	0,004	0,004
		Folha	0,01	n.d.
<i>P. tenuifila</i>		Pericarpo	0,0005	n.d.
		Polpa	0,001	n.d.
		Semente	n.d.	n.d.
		Folha	0,01	0,001
<i>P. alata</i>		Pericarpo	0,006	0,001
		Polpa	n.d.	n.d.
		Semente	0,001	n.d.
		Folha	0,005	n.d.
<i>P. setacea</i>		Pericarpo	n.d.	n.d.
		Polpa	0,003	n.d.
		Semente	0,0005	n.d.
		Folha	0,008	n.d.

n.d. não detectado

4.12 Vitamina C

Embora polpa e pericarpo de maracujá tenham sido previamente consideradas ricas em vitamina C (Zeraik et al., 2010), neste estudo a análise de pericarpo e polpa das diferentes espécies por CLAE-DAD não permitiu detectar vitamina C. Em todas as amostras observou-se pico com o mesmo tempo de retenção ao do padrão, porém com espectro UV diferente (**Figura 23**), indicando sobreposição com outros ácidos orgânicos.

Figura 23. Perfil cromatográfico da análise de ácido ascórbico total (após redução com DTT) por CLAE-DAD a 245 nm de polpa e pericarpo das diferentes espécies de *Passiflora* (1- Padrão Ácido Ascórbico; 2- Pericarpo *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho; 3- Polpa *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho; 4- Pericarpo *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo; 5- Polpa *P. edulis* variedade BRS Gigante Amarelo; 6- Pericarpo *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado; 7- Polpa *P. edulis* variedade BRS Sol do Cerrado; 8- Pericarpo *P. tenuiflora*; 9- Polpa *P. tenuiflora*; 10- Pericarpo *P. alata*; 11- Polpa *P. alata*; 12- Pericarpo *P. setacea*; 13 – Polpa *P. setacea*).

4.13 Determinação da atividade inibitória *in vitro* de α -amilase e α -glicosidase

Uma das estratégias terapêuticas para o tratamento da diabetes é a inibição das enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos, α -amilase e α -glicosidase.

A α -amilase está presente na saliva e no suco pancreático sendo responsável por clivar ligações glicosídicas α -1,4 de amilose, liberando dextrina, maltose e maltodextrose (Bischoff, 1994; Mccarter e Withers, 1994). A enzima α -glicosidase cliva as ligações glicosídicas dos carboidratos oferecendo ao organismo monossacarídeos passíveis de absorção. Desse modo a inibição dessas enzimas produziria efeitos anti-hiperglicêmicos. (Stuart et al., 2004).

Os hipoglicemiantes orais acarbose, miglitol e voglibose, inibidores da α -amilase e α -glicosidase, embora sejam eficientes na inibição destas enzimas provocam efeitos indesejáveis, como toxicidade hepática e efeitos adversos no trato gastrointestinal, associados ao seu uso contínuo (Van de Laar, 2008; Etxeberria et al., 2012). Por este motivo, há um crescente interesse científico no estudo de novos inibidores de α -amilase e α -glicosidase naturais.

Alguns autores propõem que a alta capacidade antioxidante dos compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, pode ter efeito na redução do estresse oxidativo e progressão da diabetes mellitus (Matsui et al., 2001; Song et al., 2005; Know et al., 2006; Apostolidis et al., 2006). Soma-se a esses benefícios a atuação dos flavonoides na inibição direta das enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (Gonçalves, Genovese e Lajolo, 2010), com posterior diminuição da glicemia pós-prandial. Neste sentido, é de extremo interesse verificar se os compostos fenólicos presentes nas folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) das espécies de *Passiflora* apresentam capacidade inibitória das enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase.

A α -amilase foi avaliada através da formação de maltose resultante da ação dessa enzima sobre o amido presente no meio. A maltose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose (ligação α -1,4) reduz o DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) formando um produto de cor característica cuja absorbância máxima é determinada a 540 nm. Dessa forma, os açúcares, vitaminas e minerais eventualmente presentes nos extratos brutos foram eliminados e uma fração metanólica rica em flavonóides foi obtida através da purificação por extração em fase sólida em coluna de poliamida. A α -glicosidase foi avaliada pela ação desta sobre um substrato sintético p-

nitrofenil- α -d-glicosídeo, que ao ser hidrolisado libera um agente cromóforo (p-nitrofenil).

Os resultados (**Tabela 11**) mostram claramente que os compostos fenólicos presentes nas sementes são os mais potentes inibidores tanto da α -amilase como da α -glicosidase. Por outro lado, os compostos fenólicos do pericarpo e folhas de todas as variedades *P. edulis* mostram-se os menos eficientes na inibição da α -amilase, e os compostos fenólicos das folhas todas as variedades de *P. edulis* os menos eficientes na inibição da α -glicosidase.

Gonçalves et al., (2010) avaliaram o efeito do extrato de polpa purificada em poliamida de duas espécies de *Passiflora* (*P. ligularis* Juss e *P. alata* Curtis) na atividade da enzima α -amilase, e encontraram valores de IC₅₀ igual a 4,4 mg amostra amostra b.s/mL reação para polpa de *P. alata* Curtis, 4,6 mg amostra b.s/mL reação para polpa de *P. ligularis* Juss e 0,7 mg eq. de catequina/mL de reação para as polpas das duas espécies analisadas. Gonçalves et al., (2010) realizaram testes com extrato metanólico bruto e purificado em poliamida e apenas os extratos metanólicos apresentaram efeito sobre a enzima α -glicosidase (*P. alata* Curtis IC₅₀ 3,5 mg amostra b.s./ mL reação e 5,1 mg eq. catequina/ mL reação, *P. ligularis* Juss IC₅₀ 2,1 mg amostra b.s./ mL reação e 2,2 mg eq. catequina/ mL reação).

Montefusco - Pereira et al., (2013) avaliaram o efeito do extrato etanólico de folhas de *P. nítida* Kunth na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, α -amilase e α -glicosidase, e relataram IC₅₀ de 0,09 mg amostra/mL reação para α -amilase e 0,007 mg amostra/mL reação para α -glicosidase. No presente estudo encontraram-se valores mais elevados, portanto menos eficientes em relação às folhas de *Passifloras* analisadas, porém esta diferença pode ser justificada pela diferença entre as espécies e pelo método de extração no presente estudo, visto que Montefusco – Pereira et al., (2013) utilizaram um extrato hidroalcoólico das folhas com uma concentração 100 vezes maior e não purificado.

Tabela 11. Atividade inibitória de α -amilase e α -glicosidase de extratos enriquecidos em compostos fenólicos obtidos a partir de folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passiflora*.

Espécies de <i>Passiflora</i>			Atividade inibitória de α -amilase		Atividade inibitória de α -glicosidase	
			IC ₅₀ (μ g EC*/ mL reação)	IC ₅₀ (mg amostra b.s./ mL)	IC ₅₀ (μ g EC*/ mL reação)	IC ₅₀ (mg amostra b.s./ mL)
<i>P. edulis</i> variedade BRS	Ouro Vermelho	Pericarpo	23 $\pm$ 1	42 $\pm$ 0,04	5 $\pm$ 0,1	7 $\pm$ 0,4
		Polpa	2,1 $\pm$ 0,01	2,7 $\pm$ 0,04	7 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,04
		Semente	0,5 $\pm$ 0,01	1,7 $\pm$ 0,02	2 $\pm$ 0,01	4,5 $\pm$ 0,02
		Folha	27 $\pm$ 0,5	8 $\pm$ 0,3	32 $\pm$ 0,5	12 $\pm$ 0,3
	Gigante Amarelo	Pericarpo	22 $\pm$ 1	37 $\pm$ 2	7 $\pm$ 0,01	4,4 $\pm$ 0,2
		Polpa	3,5 $\pm$ 0,1	6 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,1
		Semente	0,2 $\pm$ 0,01	1,2 $\pm$ 0,02	1,3 $\pm$ 0,01	3,5 $\pm$ 0,02
		Folha	17 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,5	9 $\pm$ 0,1
	Sol do Cerrado	Pericarpo	23 $\pm$ 2	47 $\pm$ 2	14 $\pm$ 0,07	6,5 $\pm$ 0,01
		Polpa	2,5 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,3	3 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,3
		Semente	0,13 $\pm$ 0,01	1 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,01	4 $\pm$ 0,02
		Folha	10 $\pm$ 0,2	5 $\pm$ 0,1	21 $\pm$ 0,2	11 $\pm$ 0,1
<i>P. tenuifila</i>		Pericarpo	3,7 $\pm$ 0,1	4,7 $\pm$ 0,03	19,5 $\pm$ 0,1	6 $\pm$ 0,4
		Polpa	2 $\pm$ 0,03	2,5 $\pm$ 0,02	6,7 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,02
		Semente	2,5 $\pm$ 0,2	2 $\pm$ 0,1	3 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,1
		Folha	5,4 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 0,3	12 $\pm$ 0,1	8 $\pm$ 0,3
<i>P. alata</i>		Pericarpo	4 $\pm$ 0,1	7 $\pm$ 0,1	13 $\pm$ 0,1	6 $\pm$ 0,2
		Polpa	1 $\pm$ 0,01	2,5 $\pm$ 0,3	15 $\pm$ 0,01	6 $\pm$ 0,3
		Semente	0,4 $\pm$ 0,01	2,1 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	4 $\pm$ 0,3
		Folha	6,3 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,3	13 $\pm$ 0,1	8 $\pm$ 0,2
<i>P. setacea</i>		Pericarpo	3,7 $\pm$ 0,1	8,2 $\pm$ 0,4	12 $\pm$ 0,2	8 $\pm$ 0,4
		Polpa	1,5 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,1	10 $\pm$ 0,2	5 $\pm$ 0,1
		Semente	1,1 $\pm$ 0,01	2,7 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,01	2,5 $\pm$ 0,01
		Folha	8,1 $\pm$ 0,2	3 $\pm$ 0,3	11,7 $\pm$ 0,6	8,5 $\pm$ 0,2

EC- equivalente de catequina.

5. CONCLUSÕES

As espécies de *Passiflora* analisadas nesse estudo apresentaram grandes diferenças em seus teores de compostos fenólicos e, por conseguinte, em sua capacidade antioxidante *in vitro*.

Todos os pericarpos apresentaram teores de fenólicos totais maiores que suas respectivas polpas e sementes, exceto a espécie *P. setacea* que apresentou maior teor de fenólicos em suas sementes.

As infusões das folhas de *Passiflora* spp se mostraram excelentes fontes de compostos fenólicos. Pericarpo e folhas da espécie *P. edulis* variedade BRS Ouro Vermelho, sementes da espécie *P. setacea*, polpa e pericarpo da espécie *P. tenuifila* podem ser consideradas as melhores fontes de antioxidantes.

Extratos de folhas, pericarpo, polpa e sementes de todas as espécies de *Passiflora* analisadas apresentaram capacidade inibitória das enzimas α -amilase e α -glicosidase, sendo as sementes as amostras com maior atividade.

Os principais flavonoides encontrados em folhas e frutos de *Passiflora* spp foram homoorientina e isovitexina.

A presença de proantocianidinas em *Passifloras* spp, em concentrações relativamente elevadas nas sementes, foi determinada pela primeira vez

Dentre os alcaloides analisados neste estudo, o alcaloide harmalina não foi detectado em nenhuma das espécies de *Passiflora* analisadas. Já o alcaloide harmana foi o mais abundante em todas as espécies analisadas, principalmente nas polpas de *P. edulis* (0,1 – 0,2mg/100 g b.s.).

O estilbeno piacetanol apareceu em altas concentrações nas sementes de *P. edulis* variedades BRS Ouro Vermelho e Gigante Amarelo e *P. alata*, mas não em *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Em sumo, este trabalho mostrou que os frutos e as folhas de *Passifloras* podem ser considerados boas fontes de compostos bioativos, antioxidantes e com capacidade de inibição das enzimas do metabolismo de carboidratos, portanto, efeitos benéficos potenciais sobre a saúde humana.

6. BIBLIOGRAFIA

ABE, T. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). *J Sci Food Agric.* v. 92, p. 1679-1687, 2011.

ABOURASHED, E.A.; VANDERPLANK, J.; KHAN, I.A., High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants – I. Application to *Passiflora* Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, v. 40, p. 81-91, 2002.

AGRIANUAL 2013: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: AgraFNP, 2013. p.349-352.

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology.*, v. 107, p. 449-55, 2006.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.tml, 2010.

AOAC. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. 18ed., Washington, DC., 2005.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.I; SHETTY, K. Potential of select yogurts for diabetes and hypertension management, *Journal of Food Biochemistry*, v.30, p.699-717, 2006.
bioavailability. *Food Chemistry and Toxicology*, Oxford, v.37, p. 937-942, 1999.

ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I., LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52,p.1124-113, 2004.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-

industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, p. 191-203, 2006.

BENALLA, W.; BELLAHCEN, S.; BNOUHAM, M. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors [Review]. *Current Diabetes Reviews*, v. 6, p. 247-254, 2010

BENINCÁ, J. P.; MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTI, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chemistry*, v.104, p. 1097–1105, 2007.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 239,70-76, 1996.

BEUTNER, S.; BLOEDORN, B.; FRIXEL, S.; BLANCO, I. H.; HOFFMANN, T.; MARTIN, H. D.; MAYER, B.; NOACK, P.; RUCK, C.; SCHMIDT, M.; SCHULKE, I.; SELL, S.; ERNST, H.; HAREMZA, S.; SEYBOLD, G.; SEIS, H.; STAHL, W.; WALSH, R. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. *Journal of Science and Food Agriculture*, v. 81, p. 559-568, 2001.

BISCHOFF, H.; PULS, W.; KRAUSE, H.P.; SHUTT, H.; THOMAS, G.. Pharmacological properties of the novel glucosidase inhibitors BAY m 1099 (miglitol) and BAY o 1248. *Diabetes Research Clinical Practice*, v.1, p.53-57, 1985.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 2530, 1995.

CERVI, A.C. Espécies de *Passiflora* L. (Passifloriaceae) publicadas e descritas nos últimos 55 anos (1950-2005) na América do Sul e principais publicações brasileiras. *Estudos de Biologia*, v.27, p.19-24, 2005.

CHOI, S. U.; KIM, K. H.; LEE, C. H.; AHN, Y. J.; SONG, J. H.; BAEK, S. H.; KWON, D. H. Antiviral activity of quercetin 7- rhamnoside against porcine epidemic. *Antiviral Research* v. 81, p. 77 – 88, 2009.

CHAN, H.T.; KWOK, S.M.C. Identification and determination of sugars in some tropical fruit products. *J Food Sci*, v. 40, p. 419-420, 1975.

CHAU ,C.F.;HUANG, Y.L. Characterization of passion fruit seed fibres - a potential fibre source. *Food Chem*, v. 85, p. 189-194, 2004.

COMALADA, M.; BALLESTER, I.; BAILON, E.; SIERRA, S.; XAUS, J.; GALVEZ, J.; MEDINA, F.S.; DE ZARZUELO, A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, p. 1010 – 1021, 2006.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr Biochem*, v.7, p. 66-76, 1996.

CROZIER A.; CLIFFORD M. N.; ASHIHARA H. Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet. Oxford: Blackwell, 2006.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DÁVALOS A, GOMEZ-CORDOVES C, BARTOLOME B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 48-54, 2004.

DE ANGELIS, R.C. A importância dos alimentos vegetais na proteção da saúde:fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidade degenerativa. São Paulo:Atheneu,p. 83-92, 2005.

DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*. v.128, p. 148-153, 2010.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. *Journal of ethnopharmacology*, v. 94, p. 1-23, 2004.

DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 371-374, 2005.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NOVOA, A.V.; LINARES, A.F.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. *Plant foods for human nutrition*, v.61, n.4, p.187-192, 2006.

ELSAS, S. M.; ROSSI, D. J.; RABER, J.; WHITE, G.; SEELEY, C. A.; GREGORY, W. L. *Passiflora incarnata* L. (Passion flower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method. *Phytomedicine*. v. 17, p. 940-949, 2010.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 3°. Ed. Strasbourg, Council of Europe, 1v, 1996.

ETXEBERRIA, U., DE LA GARZA, A. L., CAMPIÓN, J., MARTÍNEZ, J. A., MILAGRO, F. I. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v.16, p.269–297, 2012.

FARMACOPOEIA, Ufficiale della Repubblica Italiana. 10°. Ed. Roma, Libreria dello Stato, p.1677-1679, 1998.

FREITAS, P. C. D. Estudo farmacognóstico comparativo de espécies brasileiras do gênero *Passiflora* L., São Paulo, 133 pp. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 1985.

GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.39 (3), p. 67-69, 2003.

GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J. Phytochemicals and Targets of Chronic Disease. In: *Phytochemicals – a new paradigm*. BIDLACK, W. r., OMAYE, S. T., MESKIN, M. S., JAHNER, D. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc, 1998. Chemistry, v. 53, p. 1370 – 1371, 2005.

GIL, M. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 4581–4589, 2000.

GONÇALVES, A.E.; LAJOLO, F.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 4666–4667, 2010.

GUPTA RK, KUMAR D, CHAUDHARY AK, MAITHANI M, SINGH R. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. instreptozotocin-induced diabetes in mice. *J Ethnopharmacol*. v.139, p. 801-806, 2012.

HANLINEVA, K.; TÖRRÖNEN, R.; BONDIA-PONS, I.; PEKKINEN, J.; HARBORNE, J.B. Insect feeding preferences. *Introduction to Ecological Biochemistry*, 4^a ed., cap. 5, p. 128-161, 1997.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic of flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p. 2379-2383, 1992.

HIRAI, S.; TAKAHASHI N.; GOTO, T.; LIN, S.; UEMURA, T.; YU,R.; KAWADA, T. Functional Food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators of Inflammation*, p. 1-8, 2010.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v.51, p.305-310, 1997.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food Chemistry and Toxicology, Oxford*, v.37, p. 937-942, 1999.

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. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 70, p. 718-721, 2006.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

ISLAM, F.M.A.; RENGIFO, J.; REDDEN, R.J.; BASFORD, K.E.; BEEBE, S.E. Association between seed coat polyphenolics (tannins) and disease resistance in common bean. *Plant foods for human nutrition*, v.58, p. 285-297, 2003.

JACQUES, A. C. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv.TUPY; Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul – Brasil, 2009.

JANEIRO, D.I.; QUEIROZ, M.S.R.; RAMOS, A.T.; SABAA-SRUR, A.U.O.; CUNHA, M.A.L.;

DINIZ, M.F.F.M. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v.18, p.274-732, 2008.

JAY, M. C-glycosylflavonoids. In: Harborne, J.B. (ed.) *The Flavonoids - Advances in Research Since 1986*. London: Chapman Hall, p. 64, 1996.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.44, p. 453-464, 2004.

KESSLER, A. Plant-insect interactions in the era of consolidation in biological sciences: *Nicotiana attenuata* as an ecological expression system. *Chemical Ecology. From gene to Ecosystem*, 19-38, 2006.

KIM, J. S.; KWON, C. S.; SON, K. H. Inhibition of α -glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 11, p. 2458-61, 2000.

KIM, S. M.; KANG, K.; JHO, E. H.; JUNG, Y.-J.; NHO, C. W.; UM, B.-H.; PAN, C.-H. Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza cuneata* against Oxidative Stress Induced by tert-Butyl Hydroperoxide. *Phytotherapy Research*, v. 25, p. 1011–1017, 2011.

KWON, Y.I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *Journal of Food Biochemistry*, v.32, p.15-31, 2008.

KOBORI CN, JORGE N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. *Ciência e Agrotecnologia*. v. 29, p. 1008 – 1014, 2005.

KODAMA, D. H.; GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.30, p. 1077-1082, 2010.

LATTANZIO, V.; TERZANO, R.; CICCIO, N.; CARDINALI, A.; DI VENERE, D.; LINSALATA, V. Seed coat tannins and bruchid resistance in stored cowpea seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.85, p. 839-846, 2005.

LAZARUS, S. A.; ADAMSON, G. E.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 3693–3701, 1999.

LI, H.; ZHOU, P.; YANG, Q.; SHEN, Y.; DENG, J.; LI, L.; ZHAO, D. Comparatives studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* ‘edulis’ and *Passiflora edulis* ‘flavicarpa’. *Journal of Ethnopharmacology*. v.133, p. 1085-1090, 2011.

LOWE G. M.; YOUNG, A. J. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biosyn*, v.385, p. 20-27, 2001.

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.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. The Systematic identification of flavonoids. New Yorj: Springer,p. 354, 1970.

MANZANO, S.; WILLIAMSON, G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 54, p. 1773–1780, 2010.

MARECK, U.; GALENSA, R.; HERRMANN, K. Identifizierung von Passionsfruchtsaft in Fruchtprodukten mittels HPLC. *Z Lebensm Unders Forsch*, v. 191, p.269-274, 1990.

MARTÍN, A.; CABRERA, A.; MEDINA, J.L. Antinutritional factors in faba bean. Tannin content in *Vicia faba*: possibilities for plant breeding. *Options Méditerranéennes, Série Séminaires*, n. 10,

p. 105-110, 1991.

MATSUI, T.; UEDA, T.; OKI, T.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, K.; α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.49, p.1952-1956, 2001.

MASCIO, P. D.; MATOS, H. R.; MEDEIROS, M. H. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch. Biochem. Biosyn.* V. 383, p. 56-59, 2000.

MATSUDA, H.; TOMOHIRO, N.; HIRABA, K.; HARIMA, S.; MATSUO, K.; YOSHIKAWA, M.; KUBO, M. Study on anti-Oketsu activity of rhubarb II. Anti-allergic effects of stilbene components from *Rheum undulatum* rhizoma (dried rhizome of *Rheum undulatum* cultivated in Korea). *Biol. Pharm. Bull.* v.24, p. 264-267, 2001.

MCCARTER, J.D.; WITHERS, S.J. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, v.4 (6), p.885-892, 1994.

MCMURROUGH, I.; MCDOWELL, J. Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. *Anal Biochem*, v.91, p.92-100, 1978.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do Maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. especial, p. 83-91, 2011.

MENGHINI, A.; CAPUCCELLA, M.; MERCATI, V.; MANCINI, L.; BURATA, M. Flavonoids contents in *Passiflora* spp. *Pharmacology Research Communications* v. 27, p. 13- 14, 1993.

MEYDANI, M.; HASAN, S. T. Dietary Polyphenols and Obesity (review). *Nutrients*, v. 2, p. 737-751, 2010.

MONTEFUSCO-PEREIRA, C.V.; CARVALHO, M. J.; BOLETI, A.P.A.; TEIXEIRA, L.S.;

Matos, H.R. ; Lima, Emerson Silva . Antioxidant, Anti-inflammatory and hypoglycemic effects of the leaf extract from *Passiflora nitida* Kunth. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 6, p. 1367-1378, 2013.

MORAES, M. L. L.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical fluid extraction of glycosylate flavonoids from *Passiflora* leaves. *Phytochem Anal.* v.8, p. 257-260, 1997.

MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* v. 37, n. 2, p. 399-403, 2005.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. SCHENKEL, E. P., GOSMMAN, G. MELLO, J.C.P.D., MENTZ, L.A. PETROVICK, P.R. (Eds.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC-Editora da Universidade/UFRGS, 2000. p.11-24.

OGA, S.; DE FREITAS, P. C. D.; DA SILVA, A. C. G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Medica.* v. 50, n. 4, p. 303-306, 1984.

ORHAN, D. D.; OZÇELİK, B.; OZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, p. 1-9, 2009.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E..K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p. 3122-3128, 2002.

PEREIRA, C.A.; VILEGAS, J.H.Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*: revisão da literatura. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 3, p. 1-12, 2000.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the C-glycosyflavone isomer pairs orienin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. *Phytochem Anal.* v.16, p. 295-301, 2005.

PHARMACOPÉÉ Française. 10. Ed. Paris, Adrapharm, 1v, 1980.

PHARMACOPOEIA Helvética. 7. Ed. Bern, Eidgenössische, 1v, 1987.

PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, *Phytochemistry*, v.25. 223-230, 1986.

POZZI, A.C.S. Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométricas de Flavonoides do “Maracujá” (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*). 2007, 86f. Mestrado. São Carlos, SP: Universidade de São Paulo, 2007.

PRIOR, R. L.; FAN, E.; JI, H.; HOWELL, A.; NIO, C.; PAYNE, M. J.; REED, J. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 90, p. 1473–1478, 2010.

QUEIROZ, R.F.; MAXIMIANO, F.P.; NUNES, T.D.S.; MOREIRA, D.A.C.; AZEVEDO, L.; SILVA, L.B.C. Avaliação do perfil lipídico, glicêmico, conteúdo de glicogênio hepático e cardíaco em ratos diabéticos suplementados com farinha de casca de maracujá (*Passiflora edulis*). *Revista Brasileira de nutrição clínica*, v. 23, p. 173-177, 2008.

QUESADA, H.; DÍAZ, S.; PAJUELO, D.; FERNÁNDEZ-IGLESIAS, A.; GARCIA-VALLVÉ, S.; PUJADAS, G.; SALVADÓ, M. J.; AROLA, L.; BLADÉ, C. The lipid-lowering effect of dietary proanthocyanidins in rats involves both chylomicron-rich and VLDL-rich fractions. *British Journal of Nutrition*, FirstView, 1-10, 2011.

RAMAIYA, S.D.; BUJANG, J.S.; ZAKARIA, M.H.; KING, W.S.; SAHRIR, M.A.S. Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. *J. Sci Food Agric*, v. 93, p. 1198-1205, 2012.

RAMOS, E. R. F. 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.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprvention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 18, p. 427 – 442, 2007.

RICE – EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biology & Medicine*, v.20, p.933-956, 1996.

ROBBINS, R. J.; LEONCZAK, J.; JOHNSON, J. C.; LI, J.; KWIK-URIBE, C.; PRIOR, R. L.; GU, L. Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography–fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 4831-4840, 2009.

ROJAS, J.; RONCEROS, S.; PALOMINO, R. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá), en ratas. *An. Fac. med.*, v.67, n.3, p.206-213, 2006.

RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M. R.; VEIGA PEREIRA, T. D.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; FONSECA MOREIRA, J. C. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*. v. 100, n. 2, p. 719-724, 2007

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, Bognor Regis, v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v. 49(2), p. 145-52, 2009

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 18, p. 567- 579, 2007

SILVA, S.R.; MERCADANTE, A.Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa) in natura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 2, p. 254-258, 2002.

SINGH, B.; SINGH, D. ; GOEL, R. K. Dual protective effect of *Passiflora incarnata* in epilepsy and associated post-ictal depression. *Journal of Ethnopharmacology*. v.139, p. 273-279, 2012.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total Phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods of Enzymology*, v. 299, p. 152-178, 1999.

SONG, Y.; WANG, J.; LI, X. K. ; CAI, L. Zinc and the diabetic heart. *Biometals*, v. 18, p. 325-32, 2005.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

STUART, A. R.; GULVE, E. A.; WANG, M. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chemistry Reviews*, v. 104, p. 1255–1282, 2004.

SUGIYAMA, H.; AKAZOME, Y.; SHOJI, T.; YAMAGUCHI, A.; YASUE, M.; KANDA, T; OHTAKE, Y. Oligomeric procyanidins in Apple polyphenol are main active componensts for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 4604-4609, 2007.

TOMÁS- BARBERÁN, F.; EESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of ruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric*. v.81, p. 853-876,2001.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia manni*. *Journal Nat Prod*. v.45, p. 783-738, 1982.

VAN DE LAAR, F. A. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, v.4, p.1189–1195, 2008.

VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSI, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO, F.H.; GOSMAN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extract inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. *Fitoterapia*, v. 78, p.112-119, 2007.

VASCO C, RUALES J, KAMAL-ELDIN A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem*. v. 111, p. 816-823, 2008.

WATANABE, Y.; KOMATSU, K. Biomechanical and morphological studies on the periodontal ligament of the rat molar after treatment with α -amylase in vitro. *Connect Tissue Research*, v. 36, p. 35-49, 1997.

WATSON, L., AND DALLWITZ, M.J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 18th May 2012.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B. The flavonoids. *Advances in research since 1986*. London: Chapman & Hall, p. 337 – 385, 1994.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE- EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, v. 36 (7), p. 838-849, 2004.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, v.64, p.3-19, 2003.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, v. 126 (2), p. 485-493, 2001.

WOODMAN O.; CHAN, E. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, v.31, p. 786-90, 2004.

XU,F.; WANG, C.; YANG, L.; LUO, H.; FAN, W.; ZI, C.; DONG, F.; HU,J.; ZHOU,J. C-dideoxyhexosyl flavones from the stems and leaves of *Passiflora edulis* Sims. *Food Chemistry*, v. 136, p. 94-99, 2013.

YOKOZAMA, T.; KIM, Y. Piacetannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol. Pharm. Bull*, v.30, p. 2007-2011, 2007.

YUN, J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature: a review. *Phytochemistry*, v. 71, p. 1625-1641, 2010.

ZERAIK, M.L., PEREIRA, C.A.M., ZUIN, V.G., YARIWAKE, J.H. Maracujá: um alimento funcional?. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, p. 459 – 471, 2010.

ZERAIK, M.L. ; J.H.YARIWAKE . Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. *Microchemical Journal (Print)*, v. 96, p. 86-91, 2010.

ZIBADI, S.; WATSON, R.R. Passion Fruit (*Passiflora edulis*) composition, efficacy and safety. Evidence- Based Integrative Medicine, v. 1, n. 3, p. 183 – 187, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonoides. In: In: Simões, C. M.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, L. A.; Mentez; Petrovick, P. R. (Ed) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora EFRGS, v. 23, p. 489 – 516, 2001.

ZUCOLOTTO, S. M; FAGUNDES, C. REGINATTO, F. H. ; RAMOS A. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Analysis of C- glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. Phytochemical Analysis, v.23, p. 232-239, 2011.