UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA - FCE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

Análise do perfil de carotenoides majoritários de polpa de *Passiflora maliformis* cultivada no Cerrado brasileiro

Maria Lua dos Reis Bento

Brasília–DF

2024

Maria Lua dos Reis Bento

Análise do perfil de carotenoides majoritários de polpa de *Passiflora maliformis* cultivada no Cerrado brasileiro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia, sob orientação da Prof.ª Dr.ª Lívia de Lacerda de Oliveira, Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento da Universidade de Brasília (UnB).

Brasília–DF

2024

Maria Lua dos Reis Bento

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia, sob orientação da Prof.ª Dr.ª Lívia de Lacerda de Oliveira, e Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento da Universidade de Brasília (UnB).

Aprovado em ___/___/___

_____

Prof.ª Dr.ª Lívia, de Lacerda de Oliveira
Universidade de Brasília
Orientador

_____

Prof.ª Dra. Marileusa D. Chiarello
Universidade de Brasília (UnB)
Avaliadora interna

_____

Prof.ª Dra. Iriani Rodrigues Maldonade
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Hortaliças)
Avaliadora externa

AGRADECIMENTOS

Agradeço incondicionalmente a Deus e a Nossa Senhora pelos teus planos para minha vida, pois são sempre maiores que meus próprios sonhos, por não revelarem o final da minha jornada, tornando cada descoberta mais emocionante e pela sabedoria infinita que orientou cada escolha e iluminou cada passo incerto. Obrigada por orquestrar os encontros certos e as despedidas necessárias.

Agradeço também pela minha família. Aos meus pais, sem eles, com certeza eu não teria chegado onde estou hoje, com o apoio de cada um à sua maneira. E aos meus irmãos, que não importa quantas vezes a gente brigue, eu sei que, no fim das contas, sempre poderei contar com vocês! Agradeço, ao meu namorado, que me mostrou que o amor é paciente, gentil e incondicionalmente apoiador, especialmente nos momentos difíceis e de incertezas. E não poderia faltar, o melhor dos cunhados, Vitor, obrigada pelas nossas conversas e por todos os “Momento dos cunhas”.

Agradeço aos meus amigos de infância, Luiza, Larissa e Matheus, pelas amizades que fiz durante a minha jornada na faculdade, Marina, Lore e Manu, pela lealdade, boas risadas, dicas para a vida e muito café. Não posso esquecer da minha amiga Milena, obrigada pelas boas fofocas, risadas e livros incríveis!

Obrigada a todos que acreditaram em mim.

RESUMO

A *Passiflora maliformis* faz parte do gênero mais diversificado da família Passifloraceae, sendo utilizado para diferentes fins. A polpa do *Passiflora maliformis* possui em sua composição fitoquímicos, entre os quais se destacam os carotenoides. Devido ao seu potencial de promoção à saúde, eles estão sendo cada vez mais explorados. O presente trabalho visa à análise do teor de carotenoides da polpa de *P. maliformis* cultivada no campo experimental da Embrapa Cerrados. A extração exaustiva de carotenoides foi realizada em tubo de teflon, utilizando como solventes o acetato de etila e o metanol, com agitação em vórtex e centrifugação. Os extratos foram concentrados num evaporador rotativo, secos sob fluxo de N_2 e armazenados a -20°C, sob atmosfera de N_2, até a análise. A separação dos carotenoides ocorreu em sistema HPLC-DAD-APCI$^+$-MS (coluna C30, fase A: MeOH:MTBE:H_2O (81:15:4) e fase B: MeOH:MTBE:H_2O (16:80,4: 3,6) em gradiente, fluxo: 1mL/min). O carotenoide majoritário identificado foi o β-caroteno. Os carotenoides incolores, fitoeno e fitoflueno, também foram identificados na polpa de *P. maliformis*.

Palavras-chave: *Passiflora maliformis,* carotenoides, identificação, HPLC-DAD-MS

ABSTRACT

The *Passiflora maliformis,* part of the most diverse genus of the Passifloraceae family, is used for different purposes. The pulp of *Passiflora maliformis* has phytochemicals in its composition, among which the carotenoids stand out. Due to their health-promoting potential, they are being increasingly explored. The present work aims to analyze the carotenoid content of *P. maliformis* pulp grown in the experimental field of Embrapa Cerrados. The exhaustive extraction of carotenoids was performed in a Teflon tube, using ethyl acetate and methanol as solvents, with vortex agitation and centrifugation. The extracts were concentrated in a rotary evaporator, dried under N_2 flow, and stored at -20°C under N_2 atmosphere until analysis. Separation of carotenoids was performed on the HPLC-DAD-APCI+-MS system (C30 column, phase A: MeOH: MTBE: H2O (81:15:4) and phase B: MeOH: MTBE: H2O (16:80.4: 3.6) in gradient, flow rate: 1mL/min). The major carotenoid identified was β-carotene. The colorless carotenoids, phytoene and phytofluene, were also identified in *P. maliformis* pulp.

Key-words: *Passiflora maliformis,* total carotenoids, identification, HPLC-DAD-MS

EPÍGRAFE

"Os rios sabem: não há pressa.
Um dia chegaremos lá"
-Ursinho Pooh

SUMÁRIO

Introdução 10
Revisão da Literatura 14
Passiflora 14
Passiflora maliformis 16
Carotenoides 17
Definição, estrutura química e funções dos carotenoides 17
Métodos de identificação de carotenoides 20
Objetivos 24
Materiais e métodos 25
Obtenção de amostras e preparação 25
Extração de carotenoides 25
Separação, identificação e quantificação de carotenoides por HPLC-DAD-MS 25
Resultados e Discussão 27
Conclusão 33
Référências 34

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é considerado o mais representativo da família Passifloraceae, com mais de 530 espécies, a maioria das quais tem como centro de origem a América Tropical, com destaque para o Brasil e a Colômbia (FALEIRO, 2021). Dezenas de espécies do gênero *Passiflora* apresentam importância comercial atual e potencial (CARLOSAMA *et al*., 2020).

As Passifloras possuem diversos efeitos benéficos para a saúde humana. Elas são ricas em antioxidantes como vitamina C, flavonoides e carotenoides, que combatem os radicais livres e protegem as células contra danos oxidativos. Ademais, seus compostos anti-inflamatórios, como flavonoides e alcaloides, ajudam a reduzir a inflamação no corpo (DUARTE *et al*.,2021).

Classicamente, são conhecidas por seus efeitos ansiolíticos e sedativos suaves, graças aos seus compostos relaxantes no sistema nervoso central (DUARTE *et al*.,2021). Esses efeitos, descritos na Farmacopeia Brasileira (2° Edição), podem aliviar a ansiedade, o estresse e melhorar a qualidade do sono. Em relação à saúde cardiovascular, os antioxidantes presentes na passiflora podem reduzir o risco de doenças como hipertensão e aterosclerose (DUARTE *et al*., 2021). Há evidências de que o fruto, popularmente conhecido como maracujá, pode ser útil no controle da glicemia, beneficiando pessoas com diabetes ao melhorar a sensibilidade à insulina e regular o metabolismo da glicose (DUARTE *et al*., 2021). Essas frutas também possuem compostos com efeitos imunomoduladores, fortalecendo o sistema imunológico e auxiliando na defesa contra infecções e doenças, tornando, assim, esses frutos uma opção interessante para promover a saúde e o bem-estar geral do organismo (DUARTE *et al*., 2021).

Apesar do elevado potencial comercial, sensorial, nutricional e bioativo encontrado em diversas espécies do gênero *Passiflora*, observa-se uma subutilização do gênero. No Brasil, por exemplo, ocorrem cerca de 150 espécies nativas, porém apenas as espécies *P. edulis* e *P. alata* são cultivadas com finalidade comercial (DO CARMO SANTOS *et al*., 2021).

Neste contexto, a Rede Passitec foi organizada para gerar informações e tecnologias para diferentes áreas do conhecimento, de sorte a viabilizar a rápida inserção no mercado de fruteiras da biodiversidade brasileira, prevendo, também, o aproveitamento integral da planta (EMBRAPA, 2019). As pesquisas conduzidas pela Rede contam com a produção agrícola sustentável, a geração de ingredientes e de

produtos de diversas espécies de *Passiflora*, e com a inserção das novas tecnologias no mercado, além de contribuírem para que o brasileiro usufrua dos benefícios da sua biodiversidade, estão gerando opções de renda para os produtores da Agricultura Familiar de diversas regiões brasileiras, o que tem favorecido para a melhoria da qualidade de vida destas populações.

Uma das espécies que vem sendo estudada no contexto da Rede Passitec é a *Passiflora maliformis*, também conhecida como maracujá-maçã, maracujá-cabaça e maracujá-osso. Esta é uma espécie originária de países da América tropical, tais como Equador, Colômbia e Venezuela, sendo utilizada para seu consumo natural, fabricação de sobremesas e sucos (BISWAS; MISHRA; BIST, 2021). Além das características sensoriais atrativas ao consumidor, a *Passiflora maliformis* também apresenta características nutricionais interessantes (RAMAIYA *et al*., 2018; RAMAIYA *et al*., 2019), incluindo a presença de compostos bioativos (RAMAIYA *et al*., 2014).

No entanto, ainda há uma ampla lacuna na literatura quando se trata do estudo de carotenoides em frutos do gênero *Passiflora*, incluindo a *P. maliformis*. Devido a outras características dessa espécie, é possível sua utilização na produção de perfumes, devido à fragrância de suas flores e utilização em produtos vitamínicos e inovação de sabores nas indústrias de bebidas, por sua riqueza em vitamina C e minerais (CUENCA MARIN, 2019). Nas sementes, há uma grande concentração de óleo, cerca de 37%, podendo ser utilizado na indústria alimentícia, na gastronomia e na cosmetologia (ATUHWERA, 2021). Além disso, o fruto possui um elevado teor de nutracêuticos, incluindo carotenoides (ATUHWERA, 2021).

Os carotenoides são majoritariamente encontrados em vegetais e são hidrocarbonetos insaturados, de natureza lipossolúvel, com presença de ligações duplas conjugadas ao longo da sua estrutura básica de C40 (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, 2022). A presença desta característica é responsável pela sua forma molecular, facilidade de oxidação fototérmica, propriedades de absorção de luz e, consequentemente, a cor dos carotenoides, que varia entre o amarelo e o vermelho (MESQUITA, TEIXEIRA, SERVULO, 2017; LIKKIE *et al*., 2024). Além disso, são classificados em carotenos, formados apenas por átomos de Carbono e Hidrogênio, como o β-caroteno, α-caroteno e o licopeno; e xantofilas, contendo pelo menos um constituinte oxigenado, como a luteína, a zeaxantina e a astaxantina (MESQUITA, TEIXEIRA, SERVULO, 2017; MURADOR *et al*., 2021, ZHANG *et al*., 2024).

Seres humanos não são capazes de produzir carotenoides, e devem consumi-los por meio da alimentação, sendo encontrados de forma mais frequente em frutas e hortaliças, mas também em algas marinhas. Nos estudos das áreas da ciência dos alimentos e da nutrição, seja pela maior presença nos alimentos ou pela função que exercem no organismo humano, destacam-se as seguintes substâncias: licopeno, α-caroteno, β-caroteno, α-criptoxantina, β-criptoxantina, luteína, zeaxantina e violaxantina (BEMFEITO *et al.*, 2020).

Esses compostos estão sendo cada vez mais explorados devido ao seu potencial de promoção à saúde. A atividade mais conhecida dos carotenoides é ser precursor da vitamina A, um retinol, contudo, são poucos os que possuem essa propriedade. O representante clássico desse potencial é o β-caroteno, originando duas moléculas de retinol a partir de sua clivagem (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). No entanto, os carotenoides também exercem efeitos positivos na saúde, independente de exercerem a atividade pró-vitamina A, atuando em tecidos específicos, como a importância na manutenção da saúde visual (luteína e zeaxantina) e cardiovascular, além de atuar no retardo de algumas doenças crônicas por desempenhar atividade antioxidante (BOHN, 2019).

Em maracujás, os estudos que analisaram o perfil de carotenoides demonstraram que os principais carotenoides encontrados nos frutos são ζ-caroteno, a luteína, a zeaxantina, a β-criptoxantina, o licopeno e o β-caroteno (CAMPOS-RODRIGUEZ *et al.*, 2023). Esses compostos possuem uma diversidade estrutural e funções benéficas específicas aos organismos (SOARES, 2021), revelando a importância de saber os carotenoides presentes nos frutos além dos carotenoides totais.

Sabe-se que tanto o perfil quanto o teor de carotenoides em vegetais podem variar amplamente devido às condições climáticas as quais as plantas estão submetidas durante o seu cultivo. Isso inclui variações na temperatura, exposição aos raios solares, disponibilidade de água e exposição a queimadas. Assim, tendo em vista que a região do Cerrado brasileiro apresenta naturalmente condições consideradas adversas, é esperado e tem sido observado uma ampla riqueza de compostos bioativos em frutos cultivados nesta região (FERREIRA *et al.*, 2007).

Pesquisas que analisaram o teor de carotenoides e outros fitoquímicos em maracujás (RODRIGUEZ *et al.*, 2019; MUÑOZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2023; DO CARMO SANTOS *et al.*, 2021; BALCÁZAR-ZUMAETA *et al.*, 2024) mostraram que se a safra analisada for colhida em diferentes estações do ano, há uma diferença no teor de

carotenoides. Por exemplo, Sepúlveda *et al*. (1996), relataram diferenças na cor do suco de *Passiflora edulis* em diferentes épocas de colheita, sendo possível observar que o teor de carotenoides nos maracujás colhidos no inverno foi mais alto do que no verão, gerando, portanto, suco com cor mais intensa. Vinna-Silva *et al*. (2008) constataram que os frutos colhidos no período de maio a setembro, com temperaturas mais amenas e de menor precipitação, apresentaram um suco com maiores conteúdos de acidez, matéria seca, sólidos solúveis totais do que os frutos da época de colheita entre os meses de outubro a dezembro, caracterizada por temperaturas médias/altas e de maior precipitação.

Hipotetiza-se que a nova cultivar de *Passiflora maliformis* (cv. BRS MM) produzida na Embrapa Cerrados apresente um rico perfil de carotenoides. Dito isso, o objetivo do presente trabalho é realizar a identificação abrangente do perfil de carotenoides da polpa de *P. maliformis*- (cv. BRS-MM), cultivada no Cerrado brasileiro.

REVISÃO DA LITERATURA

Passiflora

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae. A princípio, conhecia-se esta planta com o nome de "granadilla", porque seu fruto se parecia com a *Punica granatum* ou romã (CERVI, 1997). Mais tarde, recebeu a denominação de Passiflora, passionária ou flor-da-paixão. O nome de flor-da-paixão se deve à primeira espécie descoberta (atualmente *Passiflora incarnata* L.) pelo que representavam, para os seus conhecedores, homens de fé católica, partes da flor e folhas em relação a alguns instrumentos da paixão de Cristo (CERVI, 1997) (Figura 1). Assim, as folhas recordavam a lança que transpassou o Salvador na cruz; as gavinhas, o açoite; a corona de filamentos, de coloração vermelha e azul, a coroa de espinhos; os três estiletes simulavam os três cravos e as cinco anteras representavam as chagas do crucificado (CERVI, 1997).

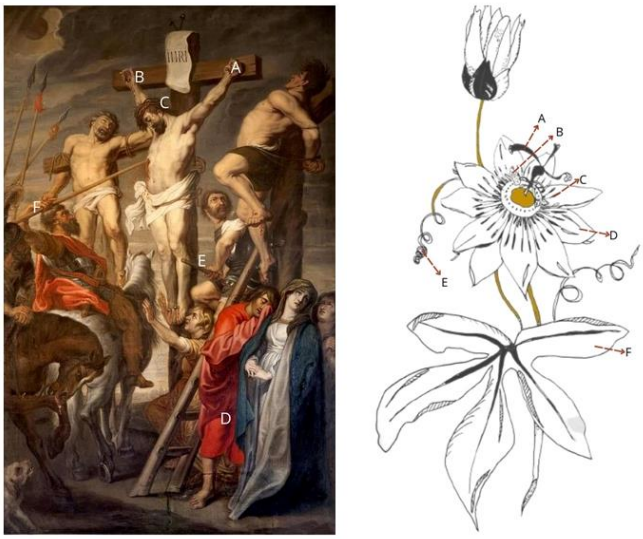


Figura 1 Comparação das partes da flor de Passiflora com a paixão de Cristo. A. Estigmas: pregos que prenderam Cristo na cruz. B. Anteras: como as feridas; C. Filamentos da Coroa: como a coroa de espinhos; D. Pétalas e sépalas: como os apóstolos que o acompanharam; E. Zarcillos: como os chicotes que o açoitaram; F. Folhas: como as mãos que o acusaram e a lança que o feriu. Fonte: Peter Paul Rubens – La Crucifixion (1861) e *Pinterest*.

As passifloras são cultivadas e utilizadas há muito tempo na alimentação, mas possuem outras funcionalidades importantes, como a medicinal e a ornamental. (OLIVEIRA, FALEIRO, JUNQUEIRA, 2017; PAIVA *et al.*, 2021). Elas, por sua vez, têm seu uso comercial definido principalmente pelos seus frutos para consumo *in natura* e para fabricação de bebidas, farinhas, doces e sucos. No entanto, apresentam também potencial para uso como planta ornamental devido à beleza e diversidade das folhagens e

das flores dos maracujazeiros de muitas espécies (OLIVEIRA, FALEIRO, JUNQUEIRA; 2017).

Considerando o aspecto medicinal, folhas, flores, raízes e frutos extraídos de espécies silvestres e comerciais de passifloras são utilizados para combater diferentes enfermidades, tais como, verminoses, tumores gástricos e estresse, fazendo parte do conhecimento tradicional associado à cultura de diferentes povos (OLIVEIRA, FALEIRO, JUNQUEIRA; 2017). A polpa, a casca e em alguns casos as sementes e folhas são utilizadas para a produção de ingredientes enriquecidos em fibras, antioxidantes naturais, extratos enriquecidos em bioativos e outros produtos intermediários de uma gama de alimentos, medicamentos e cosméticos (EMBRAPA, 2019).

O cultivo das passifloras é de grande relevância para a economia brasileira, contribuindo para a geração de empregos no campo, no setor de venda de insumos, na agroindústria e nas cidades, além de ser importante opção de geração de renda para micros, pequenos, médios e grandes produtores. Diferentes espécies de maracujá são opções para os fruticultores, por gerar renda ao longo de todo o ano, com diferentes opções de mercado e de agregação de valor ao produto (OLIVEIRA, FALEIRO, JUNQUEIRA; 2017; PAIVA *et al*., 2021).

Além disso, seu plantio pode ser realizado em diversos estados brasileiros, colocando o Brasil como maior produtor mundial, apresentando no ano de 2022 uma produção de 697.859 toneladas (ALTENDORF, 2018; IBGE, 2023). Cerca de 90% das 400 espécies do gênero *Passiflora* são oriundas das regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo o maior foco de abastecimento geográfico o Centro-Norte do Brasil (PAIVA *et al*., 2021).

A Embrapa é uma empresa voltada para a inovação, que foca a geração de conhecimentos e tecnologias para a agropecuária brasileira. A Embrapa Cerrados é detentora de uma das maiores coleções de germoplasma de *Passifloras* do mundo, com mais de 200 acessos entre espécies e variedades, que vem sendo usada como fonte de genes para o melhoramento genético das espécies comerciais. Atualmente, a coleção vem sendo utilizada também para gerar variedades para uso diversificado, para valorizar a biodiversidade e oferecer alternativas de renda ao produtor rural com foco nos alimentos funcionais e no mercado de ornamentais (EMBRAPA, 2023).

A Rede Passitec, vinculada a Embrapa Cerrados foi organizada para gerar informações e tecnologias para diferentes áreas do conhecimento, de sorte a viabilizar a

rápida inserção no mercado de fruteiras da biodiversidade brasileira, prevendo também o aproveitamento integral da planta (EMBRAPA, 2023).

Passiflora maliformis

A espécie *P. maliformis* é cultivada comercialmente na Colômbia, onde é conhecida como cholupa. Ocorre em populações naturais na América Central, no norte da América do Sul, incluindo Equador, Colômbia, Venezuela, e na Amazônia brasileira (OCAMPO *et al.*, 2015). Espécies silvestres de maracujazeiro têm apresentado grande potencial para uso em programas de melhoramento genético. Sendo assim, passaram a ser coletados acessos silvestres na região do Cerrado, os quais estão sendo utilizados no programa de melhoramento genético de espécies silvestres de maracujazeiro realizado na Embrapa, além de serem alternativas para diversificar os sistemas produtivos com novos alimentos para consumo *in natura* e processamento industrial e para uso como plantas funcionais-medicinais e ornamentais (FALEIRO *et al*., 2015; 2018; SILVA *et al*., 2015).

Essa espécie de maracujá pode ser cultivada em várias regiões do Brasil com altitude de até 1.200 m, temperatura ideal entre 20°C e 30°C e precipitações anuais de 800 mm a 1.500 mm. (OLIVEIRA, FALEIRO, JUNQUEIRA, 2019). Os acessos de *P. maliformis* coletados no Brasil apresentam algumas variações no tamanho e na coloração dos frutos, que podem ser verdes, verde-amarelado, amarelos e rosados.

Nutricionalmente, Ramaiya *et al*., (2018a), observaram que o suco obtido da polpa de *P. maliformis* contém nutrientes essenciais, sendo rico em fibras (3.63%), proteínas (2.20%) e carboidratos (0.45%). Os açúcares predominantes no suco do maracujá foram a sacarose, predominando nos frutos não maduros, e a glicose e frutose, mais presentes nos frutos mais maduros (RAMAIYA *et al*., 2013). Já nas sementes de *P. maliformis*, analisadas no estudo de Ramaiya *et al*., (2018b) foi encontrado alto teor de fibra bruta (22.01%) e proteínas (10.44%). Além disso, as sementes também apresentaram minerais importantes como sódio, magnésio, ferro, zinco, cobre, potássio e cálcio.

Além disso, Ramaiya *et al*. (2013) observaram que a *Passiflora maliformis* obteve uma quantidade equivalente a 277mg GAE. L^{-1} de fenólicos totais e uma atividade antioxidante maior em relação às outras passifloras. A quantidade de açúcar encontrado foi equivalente a 62.63g, considerado moderado em relação aos outros frutos analisados neste estudo.

Por fim, potenciais efeitos benéficos foram observados no extrato das folhas de *P. maliformis*, que exibiu uma atividade antibacteriana notável, principalmente contra a *B.*

subtilis, devendo-se esse efeito parcialmente ao seu maior conteúdo fenólico e a maior atividade antioxidante em comparação com a *P. quadrangularis* e a *P. edulis* analisadas (RAMAIYA *et al*., 2014).

Ainda em relação aos valores nutricionais dessas espécies, são poucos os estudos que utilizam a *P. maliformis*, e que até onde se sabe, não abordam o perfil de carotenoides.

Carotenoides

Definição, estrutura química e funções dos carotenoides

Os carotenoides são uma classe de pigmentos naturais amplamente distribuídos em vegetais e frutas e adicionados como aditivos, sendo responsáveis pela cor amarelo a avermelhada de muitos alimentos. A ocorrência de carotenoides na natureza é abrangente e eles podem ser encontrados em vários seres vivos naturalmente, tanto na forma livre como esterificada com ácidos graxos, sendo que algumas espécies de bactérias, fungos, algas e plantas superiores são capazes de produzir estes pigmentos (VALDUGA *et al*., 2009; LIKKEI *et al*., 2024). Em animais, como crustáceos (camarão, lagosta, siri), aves (flamingo) e peixes (truta e salmão) esses pigmentos são acumulados no organismo por meio da alimentação (SAINI *et al*., 2020). Nos organismos que realizam fotossíntese, os carotenoides desempenham um papel essencial, contribuindo tanto para a captação de luz quanto para a fotoproteção. Em organismos não fotossintéticos, eles desempenham o papel de fotoproteção, assim como ação contra o estresse oxidativo (SAINI;KEUM 2019; REIS-MANSUR *et al*., 2019).

Quimicamente, os carotenoides podem ser definidos como tetraterpenoides de 40 carbonos, formados pela união de oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, caracterizando uma molécula linear e simétrica, com a ordem invertida na posição central (BHATT; PATEL, 2020). Suas moléculas apresentam uma estrutura contendo um conjunto de ligações duplas conjugadas (l.d.c.), que representam uma das suas principais características. Este conjunto de l.d.c. formam o cromóforo da molécula e correspondem a região na qual ocorre a absorção no UV-Vis, determinando a cor observada e fornecendo importantes características para sua identificação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A cor de cada carotenoide está ligada ao número de l.d.c, quanto mais l.d.c tiver uma molécula, maior será o valor do comprimento de onda. São necessárias pelo menos 7 ligações duplas conjugadas para que um carotenoide tenha cor perceptível. Logo, um carotenoide acíclico mais insaturado, com 11 ligações duplas conjugadas, é vermelho e

absorve nos comprimentos de onda mais longos (λmax a 444, 470 e 502 nm) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Por outro lado, os carotenoides fitoeno e fitoflueno, que apresentam 3 l.d.c. (286 nm) e 5 l.d.c. (347 nm), respectivamente, são carotenoides incolores.

Além disso, os carotenoides são classificados conforme os átomos presentes em sua molécula, em carotenos, compostos apenas por átomos de carbono e hidrogênio, e xantofilas, que para além do carbono e do hidrogênio, também têm oxigênio na molécula, como parte de um grupo funcional (ou seja, hidroxilo, epóxido, carbonilo) (MERCADANTE *et al*., 2017). Além de serem encontrados em sua forma livre, os carotenoides também podem ser encontrados na natureza esterificados as moléculas de ácidos graxos. Para poder formar um éster, o carotenoide deve ter pelo menos um grupo hidroxila, uma vez que a ligação éster é formada quando um ácido carboxílico (ácido graxo) reage com um grupo álcool (xantofila hidroxilada), com a eliminação de uma molécula de água. Como os carotenos têm apenas carbono e hidrogênio na sua estrutura, não são capazes de formar ésteres. Da mesma forma, as xantofilas com outros grupos funcionais oxigenados, diferentes dos hidroxilados, não são capazes de formar ésteres (MERCADANTE *et al*., 2017).

Os seres humanos, já que não são capazes de sintetizar carotenoides, devem adquiri-los por meio da dieta, sendo essencial o seu consumo para o corpo humano (RAM *et al*. 2020, MAOKA, 2020). Atualmente, existem mais de 600 carotenoides já conhecidos, entretanto apenas 40 são encontrados na dieta humana, os principais são α-caroteno, β- caroteno, licopeno e luteína, sendo predominantemente de origem vegetal (BEMFEITO *et al*., 2020; SOARES, 2021). Nos estudos das áreas da ciência dos alimentos e da nutrição, seja pela maior presença nos alimentos ou pela função que exercem no organismo humano, se destacam as seguintes substâncias: licopeno, α-caroteno, β-caroteno, α-criptoxantina, β-criptoxantina, luteína, zeaxantina e violaxantina (BEMFEITO *et al*., 2020).

Do ponto de vista nutricional, os carotenoides são importantes por serem precursores de vitamina A, por meio de uma conversão que ocorre naturalmente no fígado (BEMFEITO *et al*., 2020). No entanto, apenas alguns carotenoides são convertidos nesse nutriente, para ter atividade provitamina A, é necessário apresentar pelo menos um anel β e uma cadeia poliênica C_{11} (BEMFEITO *et al*., 2020).

Além da atividade provitamina A, os carotenoides possuem ação antioxidante ao absorverem a energia do oxigênio singlete, levando à sua dissipação e a alterações no

estado energético. Isto é possível graças às numerosas ligações duplas conjugadas que absorvem a energia da luz e à presença de anéis de ciclohexano com grupos hidroxilo e grupos cetona presentes nos carotenoides (BARAN, MIZIAK, BONIO, 2020). Sendo assim, essa propriedade antioxidante orquestra vias importantes nos animais, incluindo fotoproteção, proteção cardiovascular, imunoproteção e antienvelhecimento (SIANI *et al*., 2020).

Os carotenoides têm a capacidade de absorver a radiação ultravioleta, graças à qual atuam como um filtro, contrariando o efeito de fotoenvelhecimento da pele, a irritação e, consequentemente, o cancro. Além disso, os carotenoides podem prevenir a descoloração da pele, melhorando seu tom, sendo utilizados tanto em tratamentos para uniformizar a coloração da pele quanto em preparações autobronzeadoras. Os carotenoides também previnem as sardas (BARAN, MIZIAK, BONIO, 2020), apresentam efeito antiacne, como a normalização das glândulas sebáceas, limpam os folículos pilosos e estimulam o processo de esfoliação da epiderme (SATHASIVAM, KIJ, 2018). Outra ação importante dos carotenoides, exercida especialmente pelos isômeros luteína e zeaxantina, é o efeito protetor ocular. Estes carotenoides se acumulam na mácula e atuam na proteção contra o desenvolvimento da degeneração macular relacionada à idade (MROWICKA *et al*., 2022).

Visto os efeitos citados acima, é importante reconhecer a relevância dos carotenoides e seus derivados para a saúde humana, o que tem sido refletido na vasta gama de aplicações na indústria dos cuidados de saúde e dos nutracêuticos (SATHASIVAM, KI, 2018). A importância crescente da utilização de carotenoides na melhoria da qualidade dos alimentos levou também a um aumento da procura de carotenoides no mercado global (SATHASIVAM, KI, 2018).

Tendo em vista que a região do Cerrado brasileiro apresenta naturalmente condições consideradas adversas, é esperado e tem sido observado uma ampla riqueza de compostos bioativos em frutos cultivados nesta região, incluindo carotenoides, como o que foi encontrado em amostras de *Passiflora tenuifila* inteiras (SANTOS *et al*., 2021).

Assim, o consumo de alimentos fonte de carotenoides deve ser estimulado para que se obtenham benefícios provenientes destas moléculas, fazendo com que a determinação do perfil de carotenoides de alimentos naturais que possam ser incluídos na dieta seja de extrema importância.

Métodos de identificação de carotenoides

Extração de carotenoides

É difícil definir um método geral para a extração de carotenoides uma vez que a extração ideal depende não só da polaridade dos carotenoides, mas também das características da matriz (teor de umidade, presença de parede celular, etc). Outros parâmetros a ter em consideração são os riscos ambientais e para a saúde, com alguns solventes, as técnicas demoradas, os custos ou mesmo a viabilidade (PÉREZ-GÁLVEZ A, 2018).

Em procedimentos de extração de carotenoides de amostras de alimentos, são utilizados solventes orgânicos variados: acetona, etanol, tetrahidrofurano (THF), hexano, tolueno, éter dietílico, metanol, acetato de etila, diclorometano, éter de petróleo, clorofórmio e butanol. (KOPEC *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2003; GIUFFRIDA *et al.*, 2018). Menos frequentemente, éter dietílico, diclorometano e etanol também são aplicados. A polaridade dos solventes utilizados deve ser levada em consideração, visto que a extração de carotenos é favorecida pela utilização de solventes não polares (hexano), enquanto as xantofilas são normalmente mais bem extraídas com solventes polares (acetona ou etanol [EtOH]) (LOPÉZ *et al.*, 2023).

Embora a extração líquido-líquido e sólido-líquido sejam as técnicas mais frequentemente aplicadas em amostras humanas e alimentares, outros métodos de extração foram descritos para a análise de carotenoides (por exemplo, extração com fluido supercrítico (SFE) (ALZATE, 2013), extração com líquido pressurizado (PLE) (L. JAIME et L., 2010), extração por solvente acelerada (ASE) (H. SUN *et al.*, 2012), extração pressurizada com água quente (PHWF) (MUSTAFA, TREVINO, TURNER, 2012) extração assistida por ultrassom (UAE) (ALZATE, 2013; LIANFU, ZELONG, 2008, LI *et al.*, 2013) e extração assistida por micro-ondas (MAE) (PASQUET *et al.*, 2011; KHA, NGUYEN, ROACH, 2013, HIRANVARACHAT *et al.*, 2013) têm sido utilizadas como alternativas de extração verde, que favorecem a proteção do meio ambiente. Estas opções são benéficas no laboratório, uma vez que as extrações tradicionais com solventes orgânicos se caracterizam pela utilização de grandes volumes de solventes e longos tempos de extração, e apresentam frequentemente um baixo rendimento de extração de bioativos, baixa seletividade e reprodutibilidade. No entanto, a aplicação de forças mecânicas (por exemplo, sonicação, autoclave e batedores de

esferas) é também uma opção interessante para melhorar a extração de carotenoides (AMORIM-CARRILHO *et al*., 2014).

Separação e identificação de carotenoides

No que diz respeito à caracterização química dos compostos de amostras complexas, os métodos cromatográficos são habitualmente aplicados para separar individualmente as moléculas e facilitar a sua detecção. Neste contexto, destaca-se a aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) devido à sua versatilidade, fácil adaptabilidade à determinação de uma vasta gama de compostos e precisão (MACIEL *et al*., 2020).

HPLC é uma técnica de separação que se baseia na interação entre os componentes da amostra, uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária é uma matriz sólida ou líquida imobilizada dentro da coluna cromatográfica. Ela é chamada de "estacionária" porque permanece fixa durante o processo de separação. O papel da fase estacionária é fornecer uma superfície na qual os componentes da amostra podem interagir de maneira seletiva. A interação entre os componentes da amostra e a fase estacionária é influenciada por diferentes propriedades químicas, como polaridade, tamanho, forma e carga (SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2011).

A fase móvel é o solvente que flui continuamente através da coluna cromatográfica. Ela carrega os componentes da amostra através da coluna e é responsável por transportá-los da fase estacionária. A composição da fase móvel pode ser ajustada para otimizar a separação dos componentes da amostra. A fase móvel pode ser composta por uma variedade de solventes e aditivos, dependendo das propriedades dos componentes da amostra e das características da fase estacionária (SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2011).

Durante o processo de HPLC, os componentes da amostra interagem de maneira diferente com a fase estacionária e a fase móvel. Alguns componentes podem ter uma afinidade maior pela fase estacionária e, portanto, interagem mais fortemente com ela, resultando em uma migração mais lenta através da coluna. Outros componentes podem ter uma afinidade maior pela fase móvel e, portanto, são transportados mais rapidamente pela coluna. Essas diferenças na interação entre os componentes da amostra e as fases estacionária e móvel levam à separação dos componentes ao longo do tempo, com os componentes mais fortemente retidos pela fase estacionária eluindo mais tarde do que

aqueles com menor afinidade pela fase estacionária (SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2011).

São conhecidos vários tipos de colunas de HPLC, classificadas pelo seu modo de separação. Dentre todas as existentes, as habitualmente utilizadas para carotenoides são a C18 e C30. As colunas C18 são eficazes para a separação de uma ampla variedade de analitos, especialmente aqueles com cadeias curtas e baixos pesos moleculares. No entanto, as colunas C30, com cadeias alquílicas mais longas, oferecem melhor forma e seletividade para analitos de cadeia longa, superando significativamente a coluna C18 na separação e seletividade da forma molecular. As colunas C30 são particularmente eficazes na separação e alta resolução de isômeros geométricos de carotenos menos polares, como licopeno e β-caroteno (AMORIM-CARRILHO *et al*., 2014).

Diante disso, Emenhiser *et al*. (1996) descreve sobre a vantagem da coluna C30 polimérica em relação à coluna C18, em que há a possibilidade de separar maior número de isômeros, além de ser a única coluna capaz de separar isômeros de carotenoides não-simétricos, como 13-cis-,13'-cis-, 9-cis- e 9'-cis-luteína.

A escolha da composição da fase móvel é uma das decisões mais relevantes no desenvolvimento de um método de HPLC que pode afetar a retenção e, potencialmente, a seletividade das amostras (SANDER; RIMMER; WILSON, 2020). A mais aplicada é a de fase reversa, sendo recomendada para fins de análise geral, uma vez que permite a detecção de compostos hidrofóbicos e compostos polares (ŽUVELA *et al*., 2019). Neste caso, os carotenoides hidrocarbonados são altamente retidos na separação, pois neste método, utiliza-se uma fase estacionária de menor polaridade em relação à fase móvel, permitindo que a retenção da amostra aumente conforme o aumento da hidrofobicidade dos solutos e da fase estacionária (ŽUVELA *et al*., 2019).

Após a separação dos carotenoides individuais por HPLC, as moléculas são normalmente identificadas de acordo com características fornecidas por diferentes detectores, que incluem, principalmente UV-vis, detector de arranjo de diodo (DAD) e espectrômetro de massas (MS), usualmente acoplados ao equipamento de HPLC.

O detector de absorbância UV/Vis é o mais comum em cromatografia líquida, uma vez que todos os carotenoides absorvem na região UV/Vis. Os detectores UV/Vis possuem tipos diferentes, dentre eles, os detectores de diodos (DAD), que podem varrer uma gama de comprimentos de 190 a 800 nm (PETRY; MERCADANTE, 2019).

Na análise de carotenoides, os DAD são os detectores mais utilizados, uma vez que possuem características importantes do espectro UV/Vis para a identificação. Embora

um DAD adquira absorções numa vasta gama de comprimentos de onda, é necessário escolher um comprimento de onda específico para processar o cromatograma; por exemplo, 450 nm é frequentemente selecionado por ser o comprimento de onda de absorção máxima do β-caroteno e a maioria dos carotenoides apresenta também o seu λmax nesta região. No entanto, os cromatogramas também precisam ser processados em outros comprimentos de onda para alguns carotenoides específicos, como, por exemplo: fitoeno a 286 nm, fitoflueno a 348 nm e licopeno e astaxantina 470 nm (PETRY; MERCADANTE, 2019).

O espectrômetro de massa (MS) é na prática o detector responsável por satisfazer os requisitos atuais de sensibilidade exigidos, tornando-se assim um detector ideal para a cromatografia líquida. A espectrometria de massa é uma técnica viável para a análise qualitativa e quantitativa de compostos ionizáveis através da fragmentação obtida (razão m/z) dos analitos (MACIEL *et al.*, 2020). As principais vantagens do HPLC-MS são: a capacidade de identificar compostos desconhecidos a partir de matrizes complexas (amostras alimentares, ambientais, biológicas, etc.); resolver os problemas de coeluição, uma vez que existem dois parâmetros de identificação (tempo de retenção e fragmentação (informação estrutural *m/z*), destacando-se a fragmentação, onde é possível selecionar e separar as transições desejadas, mesmo que no cromatograma total de íons os compostos estejam co-eluídos e a capacidade de analisar compostos termolábeis não passíveis de CG-MS (NAZÁRIO *et al*., 2015).

Sendo assim, os principais parâmetros utilizados para a identificação de carotenoides vindos do HPLC-DAD - MS são: tempo de retenção e ordem de eluição na coluna, estrutura espectral fina (%III/II) dada pelo cálculo da razão III/II multiplicada por 100, onde III é a altura do pico correspondente ao maior comprimento de onda e II à do comprimento de onda intermediário, definindo-se o mínimo entre os dois picos como linha de base; comprimento de onda máximo (λmáx), intensidade de pico cis (%Ab/II) e dados do MS (molécula protonada *m/z*) (FARIA, 2011).

A análise do perfil de carotenoides de *Passiflora* é um tópico ainda pouco explorado cientificamente, ainda mais quando se trata de espécies selvagens e pouco comuns, como no caso da *P. maliformis.* O presente estudo busca, portanto, realizar a identificação do perfil de carotenoides majoritários da polpa de *P. maliformis* cultivada no Cerrado brasileiro.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente trabalho tem como propósito a análise do perfil de carotenoides majoritários da polpa de *P. maliformis* produzida na Embrapa Cerrados por HPLC-DAD-(APCI)-MS.

Objetivos específicos

- Extrair carotenoides da polpa de *Passiflora maliformis* cultivada no Cerrado Brasileiro;
- Realizar a separação dos carotenoides presentes no extrato em HPLC;
- Realizar a identificação dos carotenoides majoritários da polpa de *Passiflora maliformis* cultivada no Cerrado Brasileiro por meio de HPLC-DAD-MS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de amostras e preparação

Frutos maduros de *P. maliformis* foram obtidos no campo experimental da Embrapa Cerrados (15°36'13,02" S, 47°43'17,34" W, Distrito Federal, Brasil) em junho de 2022. Os frutos foram higienizados em solução de hipoclorito de sódio a 10% (v, v) por 20 minutos, em seguida foram despolpados, e a polpa foi separada das sementes por peneiração. As polpas foram imediatamente congeladas em embalagem a vácuo a -80°C. A polpa foi liofilizada, moída e armazenada em vácuo a -80° C, protegida da luz até a análise.

Extração de carotenoides

As extrações foram realizadas em triplicata e em ambiente de baixa luminosidade, seguindo o método utilizado por Petry e Mercadante (2016), com pequenas adaptações. Os carotenoides foram extraídos exaustivamente a partir de aproximadamente 1,0g de polpa liofilizada de *P. maliformis*. A extração foi realizada em tubo de teflon, com hyflosupercel® e utilizando acetato de etila (EtOAc) e metanol (MeOH) como solventes. Resumidamente, 5mL de EtOAc foram adicionados ao tubo contendo amostra e hyflosupercel®, a mistura foi então agitada em vórtex (modelo vortex) por 3 minutos, e em seguida centrifugada (modelo centrífuga) por 10 minutos a 4000g, e 4° C. Este procedimento foi repetido até que o sobrenadante ficasse incolor. Em seguida, adicionaram-se 5 ml de metanol e repetiram-se os mesmos passos de vórtex e centrifugação até o sobrenadante ficar incolor. Os sobrenadantes foram combinados e o extrato foi concentrado em um evaporador rotativo (Buchi, R-II, Flawil, Switzerland), sendo depois seco sob fluxo de nitrogênio. Os extratos secos foram armazenados numa atmosfera de nitrogênio, a -80° C, protegidos da luz até a análise.

Separação, identificação e quantificação de carotenoides por HPLC-DAD-MS

A separação dos carotenoides foi efetuada em coluna C30 YMC (5 µm, 250 x 4,6 mm i.d.) (Waters, Wilmington, NC, EUA), utilizando um cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japão). O equipamento tem um autoinjetor (SIL-20A), uma bomba binária (LC-20AD), um desgaseificador (DGU-20A3R), e está acoplado em série ao detector de arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu, SPD-M20A) e ao

espectrômetro de massas (LCMS 2020), que tem um analisador de massa de quadrupolo único e foi aplicada uma fonte de ionização química de pressão atmosférica (APCI).

A separação por HPLC foi realizada conforme os procedimentos definidos por Rodrigues *et al*. (2016), aplicando um gradiente linear com metanol (MeOH), éter metil terc-butílico (MTBE) e água ultrapura (H_2O), que compõem as fases móveis A (MeOH/MTBE/H2O, 81:15:4) e B (MeOH/MTBE/H2O, 16:80,4:3,6), com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção da amostra de 20µL. O gradiente foi desenvolvido da seguinte forma: 99% a 44% de solvente A em 39 min, 44% a 0% de solvente A em 6 min, retornando à condição inicial (99% de solvente A) em 5 min e mantido nesta condição por 5 min, totalizando uma corrida de 55 min, com temperatura da coluna mantida a 35°C. Os espectros UV-vis foram adquiridos entre 220 e 700 nm e os cromatogramas foram processados a 450 nm, 347 nm (para o fitoflueno) e 286 nm (para o fitoeno). Os espectros de massa foram obtidos utilizando a interface APCI em modo positivo, utilizando os parâmetros definidos por Murador *et al.* (2019): tensão do detector de 1,05 kV; temperatura da interface a 350°C; temperatura do DL e do bloco térmico de 300°C; caudal de gás de nebulização (N_2) de 2,0 L/min; caudal de gás de secagem (N_2) de 5,0 L/min. Os espectros de massa serão obtidos na gama de m/z de 300 a 1200 (MURADOR *et al*., 2019).

Para a identificação de carotenoides e ésteres de carotenoides na polpa de *P. maliformis* utilizamos os dados obtidos da eluição cromatográfica em coluna C30 (tempo de retenção - Rt e ordem de eluição) e as características dos espectros UV-Vis (λmax, estrutura fina espectral e intensidade do pico cis) e espectros de massas (molécula protonada ([M+H]+ e fragmentos na fonte), além da comparação com padrões autênticos e também comparação com dados consistentes da literatura (ANUNCIAÇÃO *et al*., 2019; BRITTON, 2004; CAMPOS DE SIQUEIRA *et al*., 2019; CHISTÉ *et al*., 2021; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; MARIUTTI; RODRIGUES; MERCADANTE, 2013; MERCADANTE *et al*., 2017; MURADOR *et al*., 2019; MURILLO *et al*., 2013; PETRY; MERCADANTE, 2016; RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2016b, 2013; RODRIGUES; MERCADANTE; MARIUTTI, 2019; SANTOS *et al*., 2021a; SILVA; MERCADANTE, 2002; ZEPKA; MERCADANTE, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Passiflora maliformis* cultivada no Cerrado Brasileiro, analisada no presente estudo, está apresentada na Figura 2. Os carotenoides da polpa de *Passiflora maliformis* foram extraídos e separados para identificação de seus compostos majoritários. Dez picos foram tentativamente identificados como carotenoides majoritários da amostra, após a separação por HPLC-DAD-MS, que gerou os dados apresentados na tabela 1 e o cromatograma apresentado na figura 3.



Figura 2. *Passiflora maliformis* cultivada no Cerrado brasileiro (amostra *in natura* e polpa liofilizada)

Os Picos 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12 são carotenos e o Pico 13 uma xantofila esterificada e os picos 2, 8, 9 e 14 não foram passíveis de identificação com os dados disponíveis para análise. A identidade dos picos presentes nos cromatogramas e suas

características estão apresentadas na Tabela 1, e a identificação tentativa é discutida segundo a ordem de eluição na coluna C30.

Tabela 1. Características cromatográficas, de UV-Vis e de massas dos carotenoides encontrados na polpa de *P. maliformis* cultivada no Cerrado brasileiro (dados obtidos por HPLC-DAD-APCI-MS)

Pico[a]	Carotenoide tentativamente identificado	Tr (min)[b]	λmáx (nm)[c]	%III/II[d]	$\%A_B/A_{II}$ [e]	$[M + H]^+$ (m/z)[f]
1	(13*Z*) ou (15*Z*) - Fitoeno	14,9	285	nc	nc	nd
2	Não identificado	15,5	425	nc	nc	nd
3	(13*Z*) ou (15*Z*) - Fitoflueno	16,3	331, 347, 366	66,16	-	543
4	(all-*E*)- Fitoflueno	18,5	331, 347, 366	87,09	-	543
5	mistura	19,4	425, 449, 479	-	-	821
6	(all-*E)*-Fitoeno	19,6	286	nc	-	545
7	Fitoflueno	21,3	332, 348, 367	69,59	-	543
8	Não identificado	21,9	399, 425	118	nc	nd
9	Não identificado	23,9	424, 449, 478	8	nc	nd
10	(13*Z*) ou (15*Z*) ζ-caroteno	25,3	285, 378, 399, 424	64,5	27,4	541
11	(all-*E)*- ζ-caroteno	30,0	379, 400, 425	87,3	-	nd
12	(all-*E)*- β -caroteno	30,7	452, 479	21,6	-	537
13	Auroxantina-butirato-miristato Auroxantina-caprato-caprilato Auroxantina-caproato-laurato	32,3	401, 423	53,63	-	881
14	Não identificado	39,2	402, 425	118	nc	nd

[a]Pico numerado de acordo com a figura 2. [b]Tempo de retenção numa coluna C_{30} YMC. [c]Obtido sob um gradiente de MeOH/MTBE/H2O; dados adquiridos entre 220 e 700 nm e processados a 450 nm, 286 nm e 347 nm. [d]Estrutura espectral fina. [e]Intensidade do pico cis. [f]Molécula protonada.

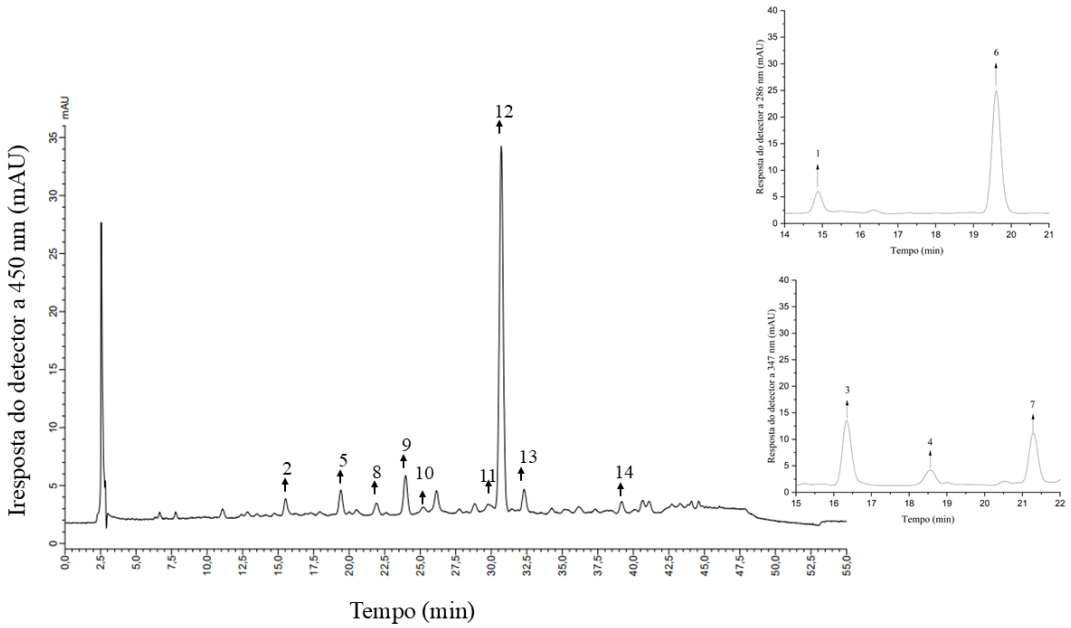


Figura 3. Cromatogramas, obtidos por HPLC-DAD (processados a 450 nm à esquerda e a 286 e 347 nm à direita), de extratos de carotenoides não saponificados de polpa *P. maliformis* cultivada no Cerrado Brasileiro.

Fitoeno e Fitoflueno (Figura 4). Os picos 1 e 6 foram identificados tentativamente como isômeros de fitoeno com base numa comparação das características UV-Vis com dados consistentes da literatura (DE ROSSO, MERCADANTE, 2007; PETRY, MERCADANTE, 2016).

Ademais, foi possível identificar a molécula protonada a *m/z* 545 no Pico 6, entretanto, as diferenças entre os espectros UV-Vis dos picos 1 e 6, não foram suficientes para a diferenciação das suas estruturas geométricas (isômeros Z/E), o que também foi observado em estudos anteriores (RODRIGUES, MERCADANTE, MARIUTTI, 2019; DE ROSSO, MERCADANTE, 2007). No entanto, foi atribuído tentativamente (13Z) - ou (15Z) -fitoeno ao pico 1 e (all-*E*)-fitoeno ao pico 6, de acordo com o conhecido padrão de ordem de eluição observado nas colunas C30. O fitoeno também foi detectado em três estudos anteriores que analisaram a polpa de *Passiflora edulis* (SILVA, MERCADANTE, 2002; MERCADANTE, BRITTON, RODRIGUEZ-AMAYA, 1998; DE OLIVEIRA, 2014).

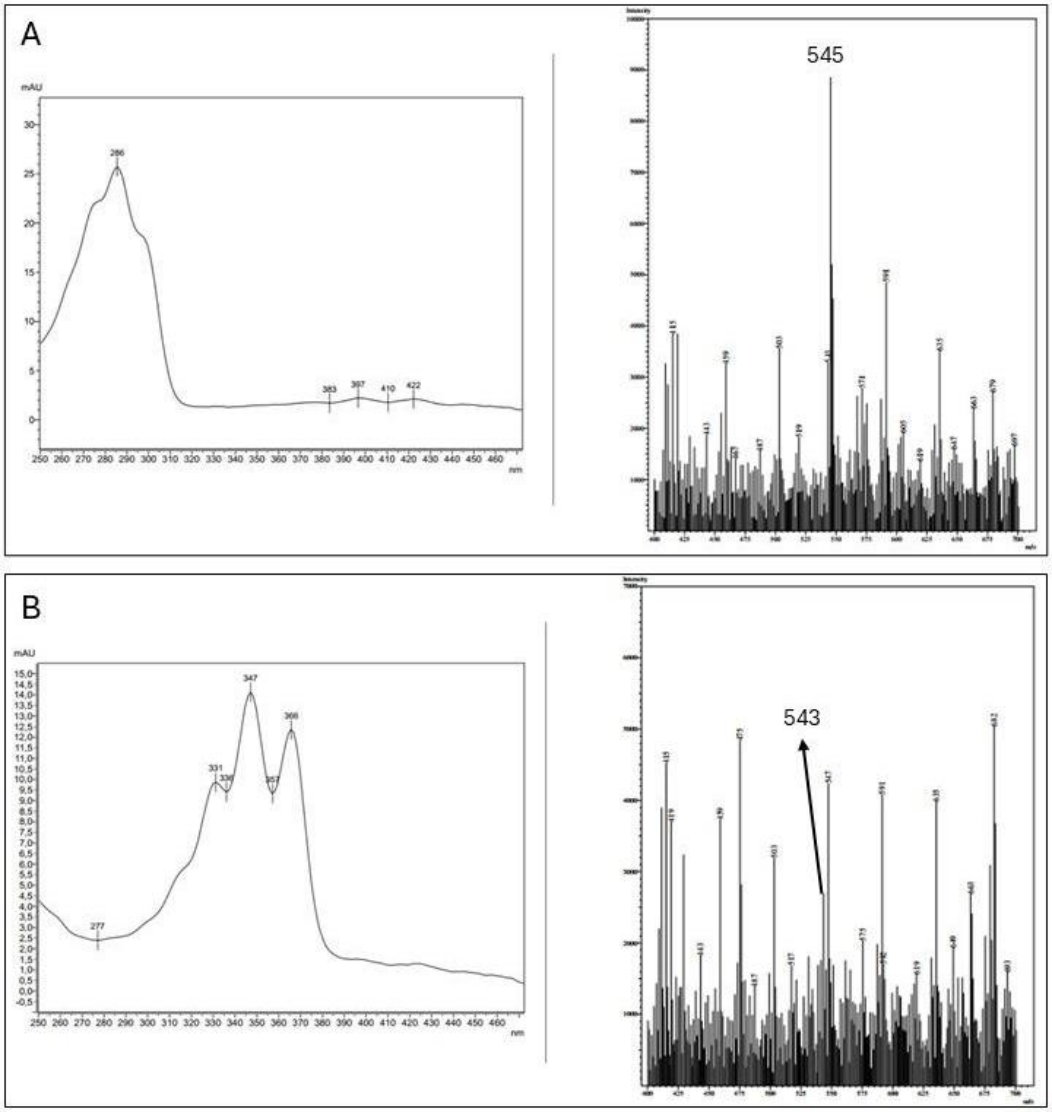


Figura 4. Espectros UV-Vis e de massas do fitoeno (A, 286 nm, *m/z* 545) e do Fitoflueno (B, 347 nm, *m/z* 543), carotenoides incolores identificados nos extratos da polpa de *Passiflora maliformis* cultivada no Cerrado Brasileiro.

O Pico 3 e o isômero *all-trans* (Pico 4) apresentaram os mesmos comprimentos de onda de absorção; no entanto, a estrutura espectral fina do Pico 3 (66,16%) é inferior comparado a do Pico 4 (87,09%). O Fitoflueno do Pico 7 apresentou a molécula protonada a *m/z* 543 nos espectros de massa; assim como os Picos 3 e 4.

Outros estudos também relataram a presença de fitoflueno em amostras de maracujá-amarelo *(Passiflora edulis flavicarpa*) (MERCADANTE, BRITTON, RODRIGUEZ-AMAYA, 1998, SILVA, MERCADANTE, 2002; WONDRACECK *et al*., 2011); e roxo (*Passiflora edulis sims*) (WONDRACECK *et al*.,2011).

Mistura. O Pico 5 foi caracterizado como uma mistura de carotenoides, devido a uma possível co-eluição de compostos, impedindo a identificação.

(13 *Z*) ou (15 *Z*)-ζ-caroteno. O pico 10 foi identificado considerando o λmax, tempo de retenção e a estrutura espectral fina no espetro UV-visível. A molécula protonada foi detectada a m/z 541. O isômero (all-*E)*- z-caroteno, Pico 11, foi identificado também por sua λmax e sua elevada estrutura espectral final (87,3%). A distinção entre os isômeros (Z) e (all *E*) foi feita com base na detecção do Pico (Z) a 285 nm e na redução da %III/II observada no Pico 10. Leite *et al*. (2024) propôs que o ζ-caroteno pode ser um importante carotenoide em Passifloras, além de ter sido detectado em estudos anteriores de polpa de *Passiflora edulis* (SILVA, MERCADANTE, 2002; MERCADANTE, BRITTON, RODRIGUEZ-AMAYA, 1998; WONDRACECK *et al*., 2011; KONTA *et al*., 2014) e em *Passiflora setacea* (WONDRACECK *et al*., 2011).

(all-*E)*- β-caroteno. O pico 12, foi identificado pelo método de comparação, tendo em conta características dos espectros UV-visível, comportamento cromatográfico e o espectro de massas. Este é o carotenoide mais difundido nas espécies de Passiflora e foi detectado em todos os estudos incluídos numa revisão de âmbito geral sobre a composição de carotenoides em plantas de Passifloras (LEITE *et al*., 2024).

Auroxantina. O Pico 13 foi identificado como um composto esterificado de auroxantina utilizando os valores de λmax, tempo de retenção, comparando com dados da literatura (PETRY, MERCADANTE, 2016). Baseando-se no valor da relação massa/carga encontrada (*m/z* 881), é possível alegar que esse pico se refere a três possíveis ésteres: auroxantina-butirato-miristato, auroxantina-caprato caprilato, auroxantina-caproato-laurato.

Os carotenoides identificados se mostram promissores para benefícios à saúde. A atividade provitamina A e a atividade antioxidante foi associada a carotenoides como β-caroteno (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al*., 2004a; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al*., 2004b). Esse carotenoide está sendo estrategicamente usado para combater a deficiência de vitamina A, considerando a gravidade dessa condição e as suas consequências fatais, para biofortificar diferentes culturas, particularmente as subdesenvolvidas, com escassez de dieta de origem animal (ZHENG *et al*., 2020). Tendo em consideração os potenciais benefícios deste carotenoide para a saúde, o consumo do *P. maliformis* pode contribuir para a obtenção desses compostos para a saúde humana.

Os carotenoides incolores, fitoeno e fitoflueno, encontrados na *Passiflora*, têm sido associados à diminuição do risco de desenvolvimento de câncer, atividade

antioxidante e anti-inflamatórias, prevenção de danos à pele, como o eritema induzido pela luz solar, e outros tipos de câncer (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2015; MAPELLI-BRAHM, MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, 2021; FULLER *et al.*, 2006, MAZIDI, FERNS, BANACH, 2020; SO, KWON, 2023).

Dessa forma, a utilização desses carotenoides na promoção da saúde e na formulação de cosméticos se mostra oportuna e em expansão no campo dos carotenoides (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Essa característica torna esses carotenoides especialmente interessantes para a proteção e saúde da pele, além de serem potenciais ingredientes ativos para a indústria dos nutricosméticos (AUST *et al.*,2005; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

Este estudo fornece uma identificação tentativa dos carotenoides encontrados nos extratos de polpa de *Passiflora maliformis.* Em relação à análise dos padrões de quebra da molécula, a utilização de um espectrômetro de massa com um analisador de massa de quadrupolo único tornou difícil a identificação de alguns picos. A análise é limitada porque fornece apenas informações sobre as massas dos íons presentes, sem detalhes suficientes sobre a estrutura da molécula (MERCADANTE *et al.*, 2017). Só é possível garantir que os fragmentos gerados da fonte vieram de uma molécula específica usando o MS/MS, assim, a atribuição inequívoca de $[M + H]^+$ pode ser confirmada pelos seus íons fragmentos derivados (PETRY, MERCADANTE, 2016).

Ademais, o método mais eficaz para identificação inequívoca de carotenoides é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), pois confirma a identidade de um carotenoide, contudo requer um alto nível de experiência para a determinação e interpretação dos espectros (BRITTON, 2022).

CONCLUSÃO

A espécie *Passiflora maliformis* cultivada no Cerrado Brasileiro se mostra promissora em relação ao seu perfil de carotenoides encontrados. Os principais picos tentativamente identificados na polpa foram β-caroteno e os carotenoides incolores fitoeno e fitoflueno, além disso, destaca-se no ζ-caroteno, amplamente encontrado em amostras de maracujá, ainda que em menor proporção.

Assim, o estudo acerca da composição e benefícios da *Passiflora maliformis* é relevante por ser uma matéria-prima com potencial funcional e medicinal, podendo ser utilizada em inovações tecnológicas no mercado nutricional, cosmetológico e farmacêutico.

Além disso, o incentivo para cultivo da *Passiflora* é pertinente, devido a suas possíveis aplicações industriais e *in natura,* além de ter potencial de contribuir para uma dieta saudável e equilibrada.

Considerando os fatores climáticos do Brasil, é possível inferir que o cultivo e o processamento do maracujá são tecnicamente viáveis e podem ser expandidos na região. O passo inicial mais importante é despertar o interesse do público e divulgar amplamente a iniciativa. Em seguida, é necessário desenvolver ações coordenadas entre agricultores, órgãos governamentais, instituições de pesquisa e outras agências. Estratégias como gestão pós-colheita, melhorias em armazenamento, embalagens e transporte, além da criação e fortalecimento de unidades de processamento, aumentarão a produção de maracujá na região.

Por fim, torna-se fundamental a realização de pesquisas futuras utilizando a *Passiflora maliformis*, visando um conhecimento aprofundado sobre esta planta. Estudos adicionais podem proporcionar novas informações sobre suas propriedades, potenciais benefícios medicinais e aplicações na indústria. Assim, sugerimos que futuros trabalhos se concentrem em explorar esses aspectos, contribuindo de forma significativa para o conhecimento científico sobre a *P. maliformis.*

RÉFÉRÊNCIAS

ALTENDORF, Sabine. **Minor tropical fruits**. Food outlook, v. 1, p. 67-75, 2018.

AMORIM-CARRILHO, K. T. *et al***. Review of methods for analysis of carotenoids**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 56, p. 49-73, 2014.

ATUHWERA, Agnes J. **Chemical composition of seeds from major passion fruit species: Passiflora edulis Sim, Passiflora eduli F flavicarpa and Passiflora maliformis grown in Uganda**. 2021. Tese de Doutorado. Kyambogo University (Unpublished work).

AUST, Olivier *et al*. **Supplementation with tomato-based products increases lycopene, phytofluene, and phytoene levels in human serum and protects against UV-light-induced erythema.** International journal for vitamin and nutrition research, v. 75, n. 1, p. 54-60, 2005.

B. HIRANVARACHAT, S. DEVAHASTIN, N. CHIEWCHAN, G.S. VIJAYA RAGHAVAN, **Structural modification by different pretreatment methods to enhance microwave-assisted extraction of b-carotene from carrots**, J. Food Eng. 115 (2013) 190–197

BALCÁZAR-ZUMAETA, C. R., GUPIOC-JIMENEZ, M. A., CASTRO-ALAYO, E. M., VELAYARCE-VALLEJOS, F., & ZUTA-CHAMOLI, V. **Total polyphenols, carotenoids and antioxidant activity in Passiflora tripartita from four locations in northeastern Peru.** *Bioagro*, *36*(1), 37-48**.** 2024.

BARAN, Marzena Teresa; MIZIAK, Paulina; BONIO, Katarzyna. Characteristics of carotenoids and their use in the cosmetics industry. **Journal of Education, Health and Sport**, v. 10, n. 7, p. 192-196, 2020.

BEMFEITO, Carla Martino *et al*. **Carotenoides em alimentos: fatores interferentes na biossíntese e estabilidade frente ao processamento**. CORDEIRO, Carlos Alberto Martins. Tecnologia de Alimentos: tópicos físicos, químicos e biológicos. Belo Horizonte: Editora Científica, p. 445-465, 2020.

BHATT, T.; PATEL, K. Carotenoids: **Potent to Prevent Diseases Review.** Natural Products and Bioprospecting, v. 10, p. 109–117, 2020. doi: 10.1007/s13659-020-00244-2

BISWAS, Srishti; MISHRA, Ritesh; BIST, Ankur Singh. **Passion to profession: A review of passion fruit processing**. Aptisi Transactions on Technopreneurship (ATT), v. 3, n. 1, p. 48-57, 2021.

BOHN, T. **Carotenoids and markers of oxidative stress in human observational studies and intervention trials: Implications for chronic diseases.** *Antioxidants*, *8*(6), 179. 2019.

BRITTON, George. **Getting to know carotenoids**. In: Methods in enzymology. Academic Press, p. 1-56, 2022.

CAMPOS-RODRIGUEZ, J., ACOSTA-CORAL, K., MORENO-ROJO, C., & PAUCAR-MENACHO, L. M. **Maracuyá (Passiflora edulis): Composición nutricional, compuestos bioactivos, aprovechamiento de subproductos, biocontrol y fertilización orgánica en el cultivo.** *Scientia Agropecuaria*, *14*(4), 479-497. 2023.

CAZARIN, C. B. *et al*. **Passiflora edulis peel intake and ulcerative colitis: Approaches for prevention and treatment.** Experimental Biology and Medicine, v. 239, n. 5, p. 542–551, maio 2014

CERVI, Armando Carlos. **Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero Passiflora L., subgênero Passiflora**. Cyanus, 1997

COSTA, Ana Maria. **REDEPASSITEC: DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA USO FUNCIONAL E MEDICINAL DAS *PASSIFLORAS* SILVESTRES, 2020. Apresentação.** Disponível em: < https://www.cpac.embrapa.br/Passitec/ >. Acesso em: 07/06/2024.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. DE O. B. **Alimentos Funcionais - Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.

CUENCA MARIN, Karol Tatiana. **Estudio de mercado para la producción y comercialización de néctar de cholupa en el municipio de Neiva**, Huila. 2019.

DE JESUS, Onildo Nunes; FALEIRO, Fábio Gelape. **Classificação botânica e biodiversidade.** 2016.

DE OLIVEIRA, Gabrieli Alves *et al*. **Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit.** Food research international, v. 60, p. 154-162, 2014.

DE ROSSO, Veridiana V.; MERCADANTE, Adriana Z. **Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 55, n. 13, p. 5062-5072, 2007.

DO CARMO SANTOS, José Thiago *et al.* **Brazilian native passion fruit (Passiflora tenuifila Killip) is a rich source of proanthocyanidins, carotenoids, and dietary fiber**. Food research international, v. 147, p. 110521, 2021.

DUARTE, Isabella de Araújo Esteves *et al*. **Brazilian passion fruit as a new healthy food: from its composition to health properties and mechanisms of action.** Food & Function, v. 12, n. 22, p. 11106-11120, 2021.

EMBRAPA: **Sobre a Embrapa**, 2024. A Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/sobre-a-embrapa >. Acesso em: 07 de jun. de 2024.

FALEIRO, F. G. *et al*. **Caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro (Passiflora spp.) assistidos por marcadores moleculares: fase IV: resultados 2017-2021.** 2021

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, A. M. **Ações de pesquisa e desenvolvimento para o uso diversificado de espécies comerciais e silvestres de maracujá (Passiflora spp.).** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2015. 26 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 329)

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JESUS, O. N. de; COSTA, A. M. **Avanços e perspectivas do melhoramento genético de Passifloras no Brasil.** In: MORERA, M. P.; COSTA, A. M.; FALEIRO, F. G.; CARLOSAMA, A. R.; CARRANZA, C. Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico. Brasília, DF: Proimpress, 2018. p. 83.

FARIA, Juliana Pereira. **Composição de carotenóides no coquinho-azedo (Butia capitata (Mart.) Becc. Variedade Capitata).** 2011.

FERREIRA, P. M. P., FARIAS, D. F., VIANA, M. P., SOUZA, T. M., VASCONCELOS, I. M., SOARES, B. M., *et al*. (2007). **Phenolic compounds from fruits of Myrciaria cauliflora**. Journal of the Brazilian Chemical Society, 18(6), 1271-1274.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. **The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids.** Progress in Lipid Research, v. 43, n. 3, p. 228–65, 2004.

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

FULLER, BRYAN, DUSTIN SMITH, AMBER HOWERTON, AND DALE KERN. "**Anti-inflammatory effects of CoQ10 and colorless carotenoids.**" *J*ournal of cosmetic dermatology 5, no. 1, p. 30-38, 2006.

GIUFFRIDA, Daniele *et al*. **Recent analytical techniques advances in the carotenoids and their derivatives determination in various matrixes**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 66, n. 13, p. 3302-3307, 2018.

H. SUN, X. GE, Y. LV, A. WANG, **Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed,** J. Chromatogr. A 1237 (2012) 1–23.

HORVÁTH, Csaba (Ed.). **High-performance liquid chromatography: advances and perspectives.** 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) Produção de Maracujá. Available online:**https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br** (acesso em 20 de Fevereiro de 2024).

KONTA, Eliziane Mieko *et al*. **Evaluation of the antihypertensive properties of yellow passion fruit pulp (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.) in spontaneously hypertensive rats.** Phytotherapy Research, v. 28, n. 1, p. 28-32, 2014.

KOPEC, Rachel E. *et al*. Analysis methods of carotenoids. **Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals**, p. 105-148, 2012.

L. JAIME, I. RODRÍGUEZ-MEIZOSO, A. CIFUENTES, S. SANTOYO, S. SUAREZ, E. IBÁÑEZ, *et al*., **Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from Haematococcus pluvialis microalgae**, Food Sci. Technol. 43 (2010) 105–112.

L.M. ALZATE, D. GONZÁLEZ, J. LONDOÑO-LONDOÑO, Recovery of Carotenoids From Agroindustrial By-Products Using Clean Extraction Techniques: Supercritical Fluid Extraction and Ultrasound Assisted Extraction, III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, Cartagena de Indias (Colombia), 2013.

LEAL, Vivane Lopes; SILVA, Meire Ribeiro da; LANÇAS, Fernando Mauro. **Avanços recentes na miniaturização de colunas para cromatografia líquida**. Scientia Chromatographica, v. 9, n. 2, p. 117-133, 2017.

LEE, H.S.; CASTLE, W.S.; COATES, G.A. 2001. **High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA.** J. Chromatogr. A 913: 371–377.

LOBATO, Breno. **Estudo de caso do uso funcional do maracujá é incluído em relatório sobre bioeconomia sustentável da FAO**. Embrapa Cerrados, Brasília, 04 de Junho de 2019. Disponível em:<https://www.embrapa.br> . Acesso em: 07 de jun. de 2024.

LÓPEZ, Gerson-Dirceu *et al*. **Bacterial carotenoids: Extraction, characterization, and applications**. Critical Reviews in Analytical Chemistry, v. 53, n. 6, p. 1239-1262, 2023.

LOURENÇO-LOPES, Catarina *et al*. **A HPLC-DAD method for identifying and estimating the content of fucoxanthin, β-carotene and chlorophyll a in brown algal extracts**. Food Chemistry Advances, v. 1, p. 100095, 2022

MACIEL, Edvaldo Vasconcelos Soares *et al*. **Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review**. Analytica chimica acta, v. 1103, p. 11-31, 2020.

MAOKA, T. **Carotenoids as natural functional pigments**. Journal of Natural Medicines, v. 74, p. 1-76. 2020.

MAPELLI-BRAHM, Paula, and Antonio J. MELÉNDEZ-MARTÍNEZ. "T**he colourless carotenoids phytoene and phytofluene: Sources, consumption, bioavailability and health effects."** Current Opinion in Food Science 41, p. 201-209, 2021.

MARQUES, Lucas Maciel Mauriz; DE OLIVEIRA, Anderson Rodrigo Moraes. T**écnicas cromatográficas e o desafio na determinação de compostos presentes em matrizes complexas: Relato de um caso prático do produto natural piperlongumina.** 2013.

MARSTON A. **Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. Phytochemistry** 2007; 68:2786-2798.

MARZOCCHELLA, L. *et al*. **Dietary Flavonoids: Molecular Mechanisms of Action as AntiInflammatory Agents.** Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery, v. 5, n. 3, p. 200–220, 1 set. 2011.

MAZIDI, Mohsen; FERNS, Gordon A.; BANACH, Maciej. **A high consumption of tomato and lycopene is associated with a lower risk of cancer mortality: results from a multi-ethnic cohort.** Public health nutrition, v. 23, n. 9, p. 1569-1575, 2020.

MEDINA, Deyber Arley Vargas *et al*. **An overview of open tubular liquid chromatography with a focus on the coupling with mass spectrometry for the analysis of small molecules**. Journal of Chromatography A, v. 1641, p. 461989, 2021.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J. **Analysis of geometrical isomers of dietary carotenoids**. In: Methods in enzymology. Academic Press, 2022. p. 369-398.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J. *et al*. **A comprehensive review on the colorless carotenoids phytoene and phytofluene.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 572, p. 188-200, 2015.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J.; STINCO, Carla M.; MAPELLI-BRAHM, Paula. **Skin carotenoids in public health and nutricosmetics: The emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene.** Nutrients, v. 11, n. 5, p. 1093, 2019.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J.; VICARIO, Isabel M.; FRANCISCO, Heredia. **Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides.** Archivos latinoamericanos de nutrición, v. 54, n. 2, p. 149-155, 2004a.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J.; VICARIO, Isabel M.; HEREDIA, Francisco J. **Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 54, n. 2, p. 209-215, 2004b.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids from Yellow Passion Fruit (Passiflora e dulis)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 46, n. 10, p. 4102-4106, 1998.

MERCADANTE, Adriana Zerlotti *et al*. **Carotenoid esters in foods-A review and practical directions on analysis and occurrence**. Food Research International, v. 99, p. 830-850, 2017.

MERCADANTE, Adriana Zerlotti *et al*. **Carotenoid esters in foods-A review and practical directions on analysis and occurrence**. Food Research International, v. 99, p. 830-850, 2017.

MESQUITA, S. da S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. **Carotenoides: propriedades, aplicações e mercado**. Revista Virtual de Química, v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017.

MROWICKA, Małgorzata *et al*. **Lutein and zeaxanthin and their roles in age-related macular degeneration—neurodegenerative disease**. Nutrients, v. 14, n. 4, p. 827, 2022.

MUHAMMAD, T. *et al*. **Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF-κB Signaling**. Nutrients, v. 11, n. 3, p. 648, 17 mar. 2019

MUÑOZ-ORDOÑEZ, F. J. *et al*. **The climactic conditions limit fruit production and quality in gulupa (Passiflora edulis Sims f. edulis) under integrated fertilization**. South African Journal of Botany, v. 153, p. 147-156, 2023.

MUSTAFA, L.M. TREVINO, C. Turner, **Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-products**, Molecules 17 (2012) 1809–1818.

NAVES, Maria Margareth Veloso. **Beta-caroteno e câncer.** Revista de Nutrição, v. 11, p. 99-115, 1998.

NAZARIO, Carlos ED *et al*. **Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview**. Journal of Chromatography a, v. 1421, p. 18-37, 2015.

OCAMPO, J. *et al*. **El cultivo de la Cholupa (Passiflora maliformis L.), una alternativa para la fruticultura colombiana**. Corporación Centro de Desarrollo Tecnológico de las Pasifloras de Colombia (CEPASS). Neiva, Colombia, 2015.

OLIVEIRA, C.; SILVA FERREIRA, A.C.; MENDES PINTO, M.; HOGG, T.; ALVES, F.; GUEDES DE PINHO, P. 2003. **Carotenoid compounds in grapes and their relationship to plant water status.** J. Agric. Food Chem. 51: 5967–5971.

OLIVEIRA, J. da S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, NTV. **As passifloras: diversidade e importância econômica.** 2019.

OLIVEIRA, J. da S.; FALEIRO, Fábio Gelape; JUNQUEIRA, N. T. V. **Importância dos maracujás (Passiflora L. spp.) e seu uso comercial**. 2017.

OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FONSECA, K. G.; ARAYA, S. **Genetic variability of Passiflora spp. based on ISSR and RAPD. Asian Journal of Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 9375-9378, 2019

PAIVA, Iracema de Azevedo Monte *et al*. **O maracujazeiro-do-mato (Passiflora Cincinnata mast.) e sua importância econômica: Uma revisão narrativa**. Research, Society and Development, v. 10, n. 7, p. e18210716464-e18210716464, 2021.

PÉREZ-GÁLVEZ A, Roca M. **Recent Developments in the Analysis of Carotenoids by Mass Spectrometry [Internet].** Progress in Carotenoid Research. InTech; 2018.

PETRY, F. C., & MERCADANTE, A. Z. **Composition by LC-MS/MS of new carotenoid esters in mango and citrus. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64(43), 8207-8224. 2016.

PETRY, Fabiane C.; MERCADANTE, Adriana Z. **Quantification and method validation.** 2019.

RAMAIYA, S. D. *et al*. **Nutritional, mineral and organic acid composition of passion fruit (Passiflora species).** 2018a.

RAMAIYA, Shiamala Devi; BUJANG, Japar Sidik; ZAKARIA, Muta Harah. **Nutritive values of passion fruit (Passiflora species) seeds and its role in human health**. Journal of Agriculture Food and Development, v. 4, n. 1, p. 23-30, 2018b.

RATHEE, P. *et al*. **Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review.** Inflammation & Allergy - Drug Targets, v. 8, n. 3, p. 229–235, 1 jul. 2009.

REIS-MANSUR MCPP, CARDOSO-RURR JS, SILVA JVMA, DE SOUZA GR, CARDOSO V DA S, MANSOLDO FRP, PINHEIRO Y, SCHULTZ J, LOPEZ BALOTTIN LB, DA SILVA AJR, LAGE C, DOS SANTOS EP, ROSADO AS, VERMELHO AB. **Carotenoids from uv-resistant antarctic microbacterium sp. Lemmj01.** Sci Rep 9, p. 9554. 2019.

RODRIGUES, Daniele Bobrowski; MERCADANTE, Adriana Zerlotti; MARIUTTI, Lilian Regina Barros. **Marigold carotenoids: Much more than lutein esters**. Food research international, v. 119, p. 653-664, 2019.

RODRÍGUEZ, N.C., MELGAREJO, L.M., BLAIR, M.W: **Purple Passion fruit, Passifora edulis Sims f. edulis, variability for photosynthetic and physiological adaptation in contrasting environments.** Agronomy 9(5), 231-248. 2019.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods.** 1st ed. Washington, DC, 2001

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J**. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2008, 100 p.

SAINI RK, KEUM Y-S. **Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 46, 657–674. 2019.

SAINI, Ramesh Kumar *et al*. **Dietary carotenoids in cancer chemoprevention and chemotherapy: A review of emerging evidence**. Pharmacological research, v. 157, p. 104830, 2020.

SANDER, Lane C.; RIMMER, Catherine A.; WILSON, Walter B. **Characterization of triacontyl (C-30) liquid chromatographic columns.** Journal of Chromatography A, v. 1614, p. 460732, 2020.

SATHASIVAM, Ramaraj; KI, Jang-Seu. **A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries**. Marine drugs, v. 16, n. 1, p. 26, 2018.

SEPÚLVEDA, E.; SÁENZ, C.; NAVARRETE, A.; RUSTOM, A. **Parámetros de color del jugo de granadilla (Passiflora edulis Sims): influência de la época de cosecha de la fruta.** Food Science and Technology International. Vol. 2. 1996. p. 29-33

SHAL, B. *et al*. **Anti-neuroinflammatory Potential of Natural Products in Attenuation of Alzheimer's Disease.** Frontiers in Pharmacology, v. 9, p. 548, 29 maio 2018

SILVA, Sandra Regina da; MERCADANTE, Adriana Z. **Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (Passiflora edulis flavicarpa) in natura.** Food Science and Technology, v. 22, p. 254-258, 2002.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., & DOLAN, J. W. **Introdução à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** John Wiley & Sons. 2010.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2011.

SNYDER, Lloyd R.; STADALIUS, M. A.; QUARRY, Mary Ann. **Gradient elution in reversed-phase HPLC-separation of macromolecules**. Analytical Chemistry, v. 55, n. 14, p. 1412A-1430A, 1983.

SO, Bohee; KWON, Ki Han. **Nutritional approaches of the changing consumer after the pandemic: Sustainable potential of phytoene and phytofluene for photoprotection and skin health.** Sustainability, v. 15, n. 5, p. 4416, 2023.

SOARES, Laura Silva. "**Revisão teórica: cultivo de microalgas para a produção de carotenoides.**" (2021).

SOARES, Laura Silva. **Revisão teórica: cultivo de microalgas para a produção de carotenoides.** 2021.

STAHL, Wilhelm; SIES, Helmut. **Photoprotection by dietary carotenoids: concept, mechanisms, evidence and future development.** Molecular nutrition & food research, v. 56, n. 2, p. 287-295, 2012.

STRATI, Irini F. *et al*. **Carotenoids from foods of plant, animal and marine origin: An efficient HPLC-DAD separation method.** Foods, v. 1, n. 1, p. 52-65, 2012.

T.C. KHA, M.H. NGUYEN, P.D. ROACH, C.E. STATHOPOULOS, **Effects of Gac aril microwave processing conditions on oil extraction efficiency, and b-carotene and lycopene contents**, J. Food Eng. 117, p. 486–491, 2013.

TETALI, S. D. **Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. Planta,** v. 249, p. 1–8, 2019.

V. PASQUET, J. CHÉROUVRIER, F. FARHAT, V. THIÉRY, J. PIOT, J. BÉRARD, *et al*., **Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction**, Process Biochem. 46, p. 59–67, 2011.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M.; JÚNIOR, A. F. **Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais.** Química Nova 2009, 32, 2429.

VIANNA-SILVA, Thais *et al*. **Qualidade do suco de maracujá-amarelo em diferentes épocas de colheita.** Food Science and Technology, v. 28, p. 545-550, 2008.

VON OPPEN-BEZALEL, Liki *et al*. T**he photoprotective effects of a food supplement tomato powder rich in phytoene and phytofluene, the colorless carotenoids, a preliminary study**. Glob. Dermatol, v. 2, p. 178-182, 2015.

WONDRACEK, Daniele Cristina *et al*. **Composição de carotenoides em passifloras do Cerrado.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 33, p. 1222-1228, 2011.

Y. LI, A.S. FABIANO-TIXIER, V. TOMAO, G. CRAVOTTO, F. CHEMAT, **Green ultrasoundassisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent, Ultrason.** Sonochem. 20, p. 12–18, 2013.

Z. LIANFU, L. ZELONG, **Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, Ultrason.** Sonochem. 15, p. 731–737, 2015.

ZHENG, Xiongjie; GIULIANO, Giovanni; AL-BABILI, Salim. C**arotenoid biofortification in crop plants: citius, altius, fortius. B**iochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1865, n. 11, p. 158664, 2020.

ZHOU, Yingyan; GUO, Guangsheng; WANG, Xiayan**. Development of Ultranarrow-Bore Open Tubular High Efficiency Liquid Chromatography**. Chinese Journal of Chemistr**y**, v. 40, n. 1, p. 137-152, 2022.

ŽUVELA, Petar *et al*. **Column characterization and selection systems in reversed-phase high-performance liquid chromatography**. Chemical reviews, v. 119, n. 6, p. 3674-3729, 2019.