



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA
DE ACESSOS DE MARACUJÁS DO CERRADO
COM BASE NO PERFIL DE CAROTENÓIDES**

DANIELE CRISTINA WONDRAČEK

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF
SETEMBRO/2009

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE
MARACUJÁS DO CERRADO COM BASE NO PERFIL DE CAROTENÓIDES**

DANIELE CRISTINA WONDRAECK

ORIENTADOR: FÁBIO GELAPE FALEIRO
CO-ORIENTADORA: TÂNIA DA SILVEIRA AGOSTINI-COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO: 09/2009

BRASÍLIA/DF
SETEMBRO/2009

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE
MARACUJÁS DO CERRADO COM BASE NO PERFIL DE CAROTENÓIDES**

DANIELE CRISTINA WONDRACEK

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

**TÂNIA DA SILVEIRA AGOSTINI-COSTA, Dr^a. (Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia)
(CO-ORIENTADORA) CPF: 770.426.116-91
E-mail: tania@cenargen.embrapa.br**

APROVADA POR:

**FÁBIO GELAPE FALEIRO, Dr. (Embrapa Cerrados)
(ORIENTADOR) CPF: 739.634.706-82
E-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br**

**JOSÉ RICARDO PEIXOTO, Dr. (UnB-FAV)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 354.356.236-34
E-mail: peixoto@unb.br**

**ANA MARIA COSTA, Dr^a. (Embrapa Cerrados)
(EXAMINADORA EXTERNA) CPF: 308.371.701-68
E-mail: abarros@cpac.embrapa.br**

BRASÍLIA/DF, 28 DE SETEMBRO DE 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA

Wondracek, Daniele Cristina

Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujás do cerrado com base no perfil de carotenóides. / Daniele Cristina Wondracek; orientação de Fábio Gelape Faleiro. – Brasília, 2009.

101 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

1. *Passiflora* L. 2. Métodos 3. Carotenóides 4. Diversidade Genética. 5. Recursos Genéticos. I. Faleiro, F. G. II. Dr.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

WONDRACEK, D. C. **Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujás do cerrado com base no perfil de carotenóides**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009. 101 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Daniele Cristina Wondracek

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujás do cerrado com base no perfil de carotenóides.

GRAU: Mestre

ANO: 2009

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

Daniele Cristina Wondracek

CPF: 006.598.330-00

SQN 406, Bloco J, Apto 107 - Asa Norte

CEP: 70847-100 - Brasília-DF

Telefone: 61 92590346

E-mail: daniele_wondracek@yahoo.com.br

Aos meus queridos pais Araldo e Vilma por todo amor, carinho, apoio, incentivo e fé.

À minha irmã Anz por ser uma irmã tão especial.

À Loia, João, Júlia, Léo e Ricardo pela grande família que eu ganhei.

Ào meu noivo Italo pelo amor, carinho, companheirismo, apoio, paciência e encorajamento.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que Ele fez e tem feito por mim.

À minha família por ser a minha base.

Ao orientador Fábio Gelape Faleiro pela amizade, ensinamentos, confiança, incentivo, ânimo e disposição em me orientar.

À co-orientadora Tânia da Silveira Agostini-Costa pela amizade, ensinamentos, carinho, atenção, incentivo e disposição em me co-orientar.

À analista Joseane Padilha da Silva pelo auxílio na análise estatística.

À Renata, Kelly e Wesley pela amizade, companhia e pelos ótimos conselhos.

Ao Renato e à Karol pela amizade, pelas longas horas de estudos, de conversas e pelas muitas gargalhadas.

Às grandes amigas Bê, Aline, Dani Morena, Cati e Ju pelo apoio, incentivo e carinho mesmo à distância.

Ao pesquisadores Roberto Fontes Vieira e Dijalma Barbosa da Silva e à analista Rosa de Belém das Neves Alves pela amizade.

Ao professor José Ricardo Peixoto pela amizade e incentivo.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelos conhecimentos compartilhados.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Cerrados e a todos os funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À equipe da secretaria de Pós-Graduação da FAV.

Ao Programa Biodiversidade Brasil-Itália, Programa Agrofuturo e a Embrapa pelo suporte financeiro e pelas bolsas concedidas.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 CERRADO	4
3.2 BIODIVERSIDADE.....	6
3.3 RECURSOS GENÉTICOS.....	8
3.4 GERMOPLASMA E DIVERSIDADE GENÉTICA	9
3.5 O GÊNERO <i>PASSIFLORA</i>	11
3.5.1 <i>Passiflora edulis Sims</i>	14
3.5.2 <i>Passiflora cincinnata Mast</i>	15
3.5.3 <i>Passiflora nitida Kunth</i>	16
3.5.4 <i>P. setacea DC</i>	18
3.6 CAROTENÓIDES.....	19
3.6.1 <i>Análise de carotenóides</i>	22
3.6.1.1 Extração de carotenóides	23
3.6.1.2 Saponificação.....	23
3.6.1.3 Cromatografia.....	23
3.6.1.4 Identificação	25
3.6.1.5 Quantificação.....	25
3.6.1.6 Obtenção de padrões.....	26
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO I	34
INFLUÊNCIA DA SAPONIFICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES EM MARACUJÁS DO CERRADO.....	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 MATERIAL GENÉTICO.....	39
2.2 EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES	40
2.3 SEPARAÇÃO DE CAROTENÓIDES	40
2.5 QUANTIFICAÇÃO DOS CAROTENÓIDES E OBTENÇÃO DE PADRÕES.....	41
2.6 ANÁLISE DE DADOS.....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4 CONCLUSÕES.....	49
5 AGRADECIMENTOS	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO II.....	52
ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CAROTENÓIDES EM MARACUJÁS DO CERRADO.....	53

RESUMO.....	53
ABSTRACT	55
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 MATERIAL GENÉTICO.....	59
2.2 EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES	61
2.3 SEPARAÇÃO DE CAROTENÓIDES	61
2.4. IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES.....	62
2.5 QUANTIFICAÇÃO DOS CAROTENÓIDES E OBTENÇÃO DE PADRÕES.....	62
2.6 CÁLCULO DO VALOR DE VITAMINA A	63
2.7 ANÁLISE DOS DADOS	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4 CONCLUSÕES.....	73
5 AGRADECIMENTOS	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO III	77
DIVERSIDADE GENÉTICA DE MARACUJÁS DO CERRADO COM BASE NO PERFIL DE CAROTENÓIDES	78
RESUMO.....	78
ABSTRACT	79
1 INTRODUÇÃO	80
2 MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1 MATERIAL GENÉTICO.....	82
2.2 EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES	84
2.3 SEPARAÇÃO DE CAROTENÓIDES	84
2.4. IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES.....	85
2.5 QUANTIFICAÇÃO DOS CAROTENÓIDES E OBTENÇÃO DE PADRÕES.....	85
2.6 DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA	86
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4 CONCLUSÕES.....	96
5 AGRADECIMENTOS	97
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
5 CONCLUSÕES.....	100
6 ANEXO.....	101

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1- PROCEDÊNCIA DOS MARACUJAZEIROS UTILIZADOS NESTE ESTUDO. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	39
TABELA 1.2- CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES ($\mu\text{G G}^{-1}$) EM AMOSTRAS SAPONIFICADAS E NÃO SAPONIFICADAS DE MARACUJAZEIROS. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	48
TABELA 2.1- PROCEDÊNCIA DOS MARACUJAZEIROS UTILIZADOS NESTE ESTUDO. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	60
TABELA 2.2- PROPRIEDADES DOS CAROTENÓIDES EXTRAÍDOS DA POLPA DE MARACUJAZEIROS E REAÇÕES QUÍMICAS ESPECÍFICAS. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	68
TABELA 2.3- CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES ($\mu\text{G G}^{-1}$) EM POLPAS DE DIFERENTES ESPÉCIES / ACESSOS DE MARACUJAZEIRO. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	69
TABELA 3.1- PROCEDÊNCIA DOS MARACUJAZEIROS UTILIZADOS NESTE ESTUDO. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	83
TABELA 3.2- ÁREAS DOS PICOS DOS CAROTENÓIDES (MAU.SEC) NOS MARACUJAZEIROS ANALISADOS. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	90
TABELA 3.3- ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS RELACIONADAS ÀS ÁREAS DOS PICOS DOS CAROTENÓIDES (MAU.SEC) E CONTRIBUIÇÃO RELATIVA PARA A DIVERSIDADE GENÉTICA DE QUATORZE CAROTENÓIDES AVALIADOS EM OITO ACESSOS DE QUATRO ESPÉCIES DE MARACUJAZEIRO. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	91
TABELA 3.4- MATRIZ DE DISTÂNCIAS EUCLIDIANAS MÉDIAS PADRONIZADAS ENTRE OITO ACESSOS DE QUATRO ESPÉCIES DE MARACUJAZEIRO, BASEADA NAS ÁREAS DOS PICOS (MAU.SEC) DE QUATORZE CAROTENÓIDES. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	91
TABELA 3.5- MATRIZ DE DISTÂNCIAS DE EUCLIDIANAS MÉDIAS PADRONIZADAS ENTRE OITO ACESSOS DE QUATRO ESPÉCIES DE MARACUJAZEIRO, BASEADA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE QUATORZE CAROTENÓIDES, UTILIZANDO O COMPLEMENTO DO COEFICIENTE DE SIMILARIDADE DE NEI E LI (1979). BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA DO B-CAROTENO (ADAPTADO DE BRITTON, 1995).	20
FIGURA 2- GRUPOS TERMINAIS MAIS COMUNS ENCONTRADOS EM CAROTENÓIDES (ADAPTADO DE BRITTON, 1995).....	20
FIGURA 1.1- CARTA DE CONTROLE DE AMPLITUDE MÓVEL (VARIABILIDADE) PARA AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DE INJEÇÕES DE TRANS-B-CAROTENO. EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008...47	47
FIGURA 2.1- CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC: A) <i>P. EDULIS</i> COMERCIAL A SAPONIFICADO. B) <i>P. EDULIS</i> COMERCIAL B SAPONIFICADO. OS NÚMEROS NA FIGURA CORRESPONDEM AOS PICOS DOS CAROTENÓIDES DESCRITOS NA TABELA 2.2. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	70
FIGURA 2.2- CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC: A) <i>P. EDULIS</i> AMARELO NATIVO SAPONIFICADO. B) <i>P. EDULIS</i> AMARELO NATIVO NÃO SAPONIFICADO. OS NÚMEROS NA FIGURA CORRESPONDEM AOS PICOS DOS CAROTENÓIDES DESCRITOS NA TABELA 2.2. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	71
FIGURA 2.3- CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC: A) <i>P. EDULIS</i> ROXO NATIVO SAPONIFICADO. B) <i>P. SETACEA</i> NÃO SAPONIFICADO. OS NÚMEROS NA FIGURA CORRESPONDEM AOS PICOS DOS CAROTENÓIDES DESCRITOS NA TABELA 2.2. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	72
FIGURA 2.4- CROMATOGRAMA OBTIDO POR HPLC: <i>P. CINCINNATA</i> ACESSO 'REDONDO' NÃO SAPONIFICADO. OS NÚMEROS NA FIGURA CORRESPONDEM AOS PICOS DOS CAROTENÓIDES DESCRITOS NA TABELA 2.2. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	73
FIGURA 3.1- ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DE OITO ACESSOS DE MARACUJAZEIRO COM BASE NA MATRIZ DE DISTÂNCIAS EUCLIDIANAS MÉDIAS PADRONIZADAS CALCULADAS UTILIZANDO-SE AS ÁREAS DOS PICOS DE QUATORZE CAROTENÓIDES. O MÉTODO DO UPGMA FOI UTILIZADO COMO CRITÉRIO DE AGRUPAMENTO. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	93
FIGURA 3.2- DISPERSÃO GRÁFICA DE OITO ACESSOS DE MARACUJAZEIRO COM BASE NA MATRIZ DE DISTÂNCIAS EUCLIDIANAS MÉDIAS PADRONIZADAS CALCULADAS UTILIZANDO-SE AS ÁREAS DOS PICOS DE QUATORZE CAROTENÓIDES. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008...94	94
FIGURA 3.3- ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DE OITO ACESSOS DE MARACUJAZEIRO COM BASE NA MATRIZ DE DISTÂNCIAS EUCLIDIANAS MÉDIAS PADRONIZADAS UTILIZANDO-SE A PRESENÇA E AUSÊNCIA DE QUATORZE CAROTENÓIDES. O MÉTODO DO UPGMA FOI UTILIZADO COMO CRITÉRIO DE AGRUPAMENTO. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008...95	95
FIGURA 3.4- DISPERSÃO GRÁFICA DE OITO ACESSOS DE MARACUJAZEIRO COM BASE NA MATRIZ DE DISTÂNCIAS EUCLIDIANAS MÉDIAS PADRONIZADAS CALCULADAS UTILIZANDO-SE A PRESENÇA E AUSÊNCIA DE QUATORZE CAROTENÓIDES. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	96
FIGURA 3- FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	101
FIGURA 4- FLUXOGRAMA DE SEPARAÇÃO DE CAROTENÓIDES. BRASÍLIA, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/EMBRAPA CERRADOS, 2008.....	101

CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE MARACUJÁS DO CERRADO COM BASE NO PERFIL DE CAROTENÓIDES

RESUMO GERAL

A composição de carotenóides em frutas é complexa e variável. Por isso, métodos de extração e processos analíticos diferenciados precisam ser aplicados para uma determinação correta dos carotenóides. As frutas e os vegetais são suas fontes principais na dieta humana. Os carotenóides são responsáveis pela coloração da polpa do maracujá e de muitos frutos, flores e folhas. No Cerrado são encontradas mais de 40 espécies de *Passiflora*. Porém, o potencial de muitas dessas espécies é desconhecido do ponto de vista científico. Os objetivos deste estudo foram avaliar a influência da saponificação na determinação de carotenóides de cinco acessos de três espécies de maracujás do Cerrado (um acesso de *P. cincinnata*, um acesso de *P. setacea* e três acessos de *P. edulis*); a composição qualitativa e quantitativa de carotenóides da polpa de oito acessos de quatro espécies de maracujás do Cerrado (dois acessos de *P. cincinnata*, um acesso de *P. nitida*, um acesso de *P. setacea* e quatro acessos de *P. edulis*) e a diversidade genética entre esses maracujás do Cerrado com base no perfil de carotenóides presentes na polpa de seus frutos utilizando, como referência, o maracujá-azedo comercial (*P. edulis*). Os carotenóides foram extraídos em acetona, metade deles foram saponificados e separados por HPLC e identificados segundo Rodriguez-Amaya (2001). Com base nas áreas dos picos dos carotenóides e na presença e ausência de carotenóides foram calculadas matrizes de distâncias euclidianas médias padronizadas entre os maracujazeiros e realizadas análises de agrupamento e de dispersão gráfica. Foram encontradas diferenças significativas entre as médias das concentrações de carotenóides em amostras saponificadas e não saponificadas. As polpas dos frutos dos maracujazeiros analisados apresentaram neoxantina, violaxantina, *cis*-violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, poli-*cis*- ϵ -caroteno, prolicopeno, *cis*- ζ -caroteno, ζ -caroteno, β -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno e fitoflueno. A caracterização dos maracujazeiros revelou diferenças qualitativas e quantitativas no perfil de carotenóides. Foram verificadas e quantificadas distâncias genéticas significativas entre os maracujazeiros com base nas áreas dos picos dos carotenóides e na presença e ausência de carotenóides. As diferenças encontradas nos maracujazeiros analisados tanto com relação à metodologia, à análise qualitativa e quantitativa de carotenóides e a

diversidade genética reforçam a necessidade de caracterização, conservação e a utilização dessa valiosa fonte de recursos genéticos de maracujá existente no Cerrado.

Palavras-chave: *Passiflora*, compostos bioativos, métodos, composição bioquímica, variabilidade genética, recursos genéticos, germoplasma, alimento funcional

CHARACTERIZATION AND GENETIC DIVERSITY OF CERRADO PASSION FRUIT ACCESSIONS BASED ON CAROTENOIDS PROFILE

GENERAL ABSTRACT

The composition of carotenoids in fruits is complex and variable. Therefore, extraction methods and different analytical procedures must be applied to a correct determination of carotenoids. Fruits and vegetables are their main sources in human diet. Carotenoids are responsible by pulp color of passion fruit and many fruits, flowers and leaves. In Cerrado are found more of 40 *Passiflora* species. However, the potential of some of these species is unknown of scientific point of view. The objectives of the study was to evaluate the saponification influence in carotenoids determination of five accessions of three species of Cerrado passion fruit (one *P. cincinnata* accession, one *P. setacea* accession and three *P. edulis* accessions); qualitative and quantitative carotenoids pulp composition of eight accessions of four species of Cerrado passion fruit (two *P. cincinnata* accessions, one *P. nitida* accession, one *P. setacea* accession and four *P. edulis* accessions) and genetic diversity among these Cerrado passion fruit based on carotenoids profile in pulp fruit using commercial passion fruit (*P. edulis*) as reference. Carotenoids were extracted in acetone, half of them were saponified and separated by HPLC and identified according Rodriguez-Amaya (2001). Based on carotenoids peaks area and carotenoids presence and absence data were calculated standardized means euclidian distances matrices among passion fruit and to perform cluster and graphical dispersion analysis. Significant differences were found between the means carotenoids concentrations in saponified and not saponified samples. Pulp fruits of analyzed passion fruit showed neoxanthin, violaxanthin, *cis*-violaxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, prolycopene, *poli-cis*- ϵ -carotene, *cis*- ζ -carotene, *trans*- ζ -carotene, *trans*- β -carotene, 13-*cis*- β -carotene and phytofluene. The characterization of passion fruit revealed qualitative and quantitative differences in carotenoids profile. Were quantified and verified significant genetic distances among passion fruit based on carotenoids peaks area and carotenoids presence and absence. The differences found in analyzed passion fruit both with respect to methodology, qualitative and quantitative analysis of carotenoids and genetic diversity reinforce use, conservation and characterization necessity this valuable source of genetic resources of Cerrado passion fruit.

Keywords: *Passiflora*, bioactive compounds, methods, biochemistry composition, genetic variability, genetic resources, germplasm, functional food

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

BHT - butil hidroxitolueno

CCA - cromatografia em coluna aberta

CCD - cromatografia em camada delgada

CDB - Convenção sobre Diversidade Biológica

cm - centímetro

COP 8 - Oitava Conferência das Partes da Convenção sobre Diversidade Biológica

DAD - detector de arranjo de diodos

DF - Distrito Federal

EM - espectrômetro de massas

fAFLP - *fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*

g - grama

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

Km² - quilômetros quadrados

KOH - hidróxido de potássio

KW - Kruskal Wallis

μg g⁻¹ - micrograma por grama

μg mL⁻¹ - micrograma por mililitro

μL - microlitro

μm - micrômetro

mg - miligrama

mL - mililitro

mL min⁻¹ - mililitro por minuto

mm - milímetro

MOP 3 - Terceira Reunião das Partes do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança

nm - nanômetro

OCC - *Open Column Chromatography*

PROBIO - Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica

PTFE - Politetrafluoretileno

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

Rf - fator de retenção

THF - tetrahydrofurano

tr - tempo de retenção

tr - traços

UPGMA - *Unweighted pair-group arithmetic average*

UV - ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa

β - beta

δ - delta

ε - epsilon

γ - gama

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius

λ - lambda

\pm - mais ou menos

μ - micro

$\%$ - porcentagem

ψ - psi

ζ - zeta

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado concentra 5% das espécies da flora e da fauna mundiais. Essa rica biodiversidade está em risco de desaparecer devido à falta de planejamento adequado relacionado a investimentos em pesquisa, conservação e cumprimento das políticas públicas já existentes (HOPKIN, 2004). O Cerrado é o centro de origem de três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul: São Francisco, Tocantins-Araguaia e Prata (EMBRAPA, 2009), sendo uma região muito importante para o desenvolvimento econômico do país. Para que a contribuição econômica ocorra é necessário que as áreas nativas sejam substituídas por sistemas produtivos, como lavouras mecanizadas para produção de soja, milho e algodão; pastagens cultivadas com gramíneas exóticas para criação de gado; reflorestamentos; dentre outros (RATTER et al., 1997; MACHADO et al., 2008). As taxas de desmatamento no Cerrado têm sido historicamente superiores às da floresta Amazônica e o esforço de conservação do bioma é muito inferior ao do amazônico (KLINK & MACHADO, 2005). Estratégias para a conservação do Cerrado incluem a criação de mais parques e reservas, a manutenção dos já existentes e a utilização mais eficiente das terras agrícolas em uso (HOPKIN, 2004).

O maracujazeiro é uma fruteira que é encontrada em diversos biomas, incluindo o Cerrado que possui uma grande diversidade genética. As modificações causadas pelo ser humano nos locais onde são encontradas as Passifloráceas têm causado erosão genética desse gênero. Assim, grande parte do potencial encontrado dentro de *Passiflora* está sendo perdido (FERREIRA, 2005). As espécies nativas e silvestres de maracujá têm grande potencial para o consumo *in natura*, para a produção de suco concentrado, como planta ornamental, medicinal, alimento funcional e utilização pelas indústrias de cosméticos pela variedade de compostos encontrados. Além de serem fontes de genes para o melhoramento genético do maracujazeiro-azedo, como porta-enxerto, no desenvolvimento de híbridos de maracujazeiro-doce e na obtenção de híbridos de maracujazeiro-ornamental (FALEIRO et al., 2006; FALEIRO et al., 2008). Considerando este grande potencial, existem grandes demandas para as pesquisas nas áreas de recursos genéticos, melhoramento genético, além da exploração diversificada de espécies do gênero *Passiflora* (FALEIRO et al., 2006).

Estudos sobre a composição de carotenóides só foram realizados até o momento na principal espécie explorada comercialmente, o maracujazeiro-amarelo comercial (CECCHI & RODRIGUEZ-AMAYA, 1982; MERCADANTE et al, 1998; SILVA &

MERCADANTE, 2002), porém em espécies nativas e silvestres esses estudos são inexistentes. A caracterização de espécies nativas e comerciais de maracujazeiro quanto aos tipos de carotenóides presentes e sua concentração são importantes para valorar e identificar usos inovadores para essas espécies na diversificação de sistemas produtivos ou para suas utilizações em programas de melhoramento genético.

Os carotenóides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza responsáveis pela cores amarela, laranja e vermelha de frutas, raízes, flores, peixes, invertebrados e pássaros. Também são encontrados em algas, bactérias, mofo e leveduras e nos cloroplastos de plantas superiores, embora no tecido fotossintético essas cores possam ser mascaradas pela clorofila (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Este grupo de compostos tem diversas funções como a captação da energia luminosa, transporte de oxigênio, atividade antioxidante e atividade pró-vitâmica A (BRITTON, 1995). A composição de carotenóides em frutas é complexa e variável e são compostos que podem ser facilmente degradados (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Por isso, a busca de métodos de extração e processos analíticos diferenciados para uma determinação correta dos diferentes carotenóides é imprescindível.

No presente trabalho, objetivou-se verificar a influência da saponificação na determinação de carotenóides em cinco acessos de três espécies de maracujazeiro (um acesso de *P. cincinnata*, um acesso de *P. setacea* e três acessos de *P. edulis*); avaliar a composição qualitativa e quantitativa de carotenóides da polpa de oito acessos de quatro espécies de maracujás do Cerrado com potencial agrônomico (dois acessos de *P. cincinnata*, um acesso de *P. nitida*, um acesso de *P. setacea* e quatro acessos de *P. edulis*) e analisar a diversidade genética desses maracujás do Cerrado, com base no perfil de carotenóides presentes na polpa de seus frutos utilizando, como referência, o maracujá-amarelo comercial (*P. edulis*).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, p. 1551-1558, 1995.

CECCHI, H. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenóides e valor de vitamina-A em suco de maracujá processado. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 33, p. 72-76, 1981.

EMBRAPA, 2009. Bioma Cerrado. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/Abertura.html>. Acesso em: 27 ago 2009.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Desafios da Pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 186-209.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 54p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FÁVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. (Eds). **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 43-62.

FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 41-51.

HOPKIN, M. Brazilian savannah 'will disappear by 2030'. **Nature**, 2004. doi:10.1038/news040719-6. Disponível em: <http://www.nature.com/news/2004/040720/full/news040719-6.html>. Acesso em: 30 ago 2009.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, 2005.

MACHADO, R. B.; AGUIAR, L. M. S.; CASTRO, A. A. J. F.; NOGUEIRA, C. C.; RAMOS NETO; M. B. Caracterização da fauna e flora do Cerrado. In: FALEIRO, F. G.; NETO, A. L. F. (Eds). **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 285-302.

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

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 222-230, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods**. Arlington: OMNI, 1997. 88 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 2001. 64 p.

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

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CERRADO

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma brasileiro. Distribui-se predominantemente pelos Estados de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Maranhão e Piauí. Existem regiões de vegetação de Cerrado em outros domínios de vegetação, como no Pará (Serra do Cachimbo), Amapá, Amazonas (Campos de Humaitá), Roraima, Rondônia (Serra dos Pacaás Novos), Ceará, São Paulo e Paraná (MACHADO et al., 2004; IBAMA, 2009). Esse bioma apresenta uma área de aproximadamente 2.036.448 km² cobrindo 23% do território brasileiro (IBGE, 2004).

É reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade. A riqueza das espécies no Cerrado pode representar 33% da diversidade biológica brasileira (AGUIAR et al., 2004). São encontradas 837 espécies de aves (29 endêmicas), 161 de mamíferos (19 endêmicas), 120 de répteis (24 endêmicas), 150 de anfíbios (45 endêmicas), o equivalente a 1268 espécies de animais, sendo 117 endêmicas do bioma Cerrado. Também possui uma flora riquíssima com mais de 10.000 espécies de plantas (IBAMA, 2009) sendo 4.400, aproximadamente 1,5% do total de plantas encontradas no mundo, endêmicas (MYERS et al., 2000). Em levantamentos florísticos realizados com base em pesquisas do Projeto Biogeografia do Bioma Cerrado foram encontradas cerca de 267 espécies de pteridófitas, duas de gimnospermas e 6060 de angiospermas, demonstrando a grande riqueza florística do Cerrado que ainda não está completamente caracterizada (MENDONÇA et al., 1998).

Contudo, ainda existem muitas lacunas no conhecimento científico sobre a fauna e a flora existentes no Cerrado sendo, portanto, imprescindível um aumento e uma intensificação nos estudos para a caracterização, conservação e manejo sustentável desse bioma, além de uma maior capacitação técnica e destinação adequada de recursos financeiros (AGUIAR et al., 2004).

A grande diversidade de espécies de animais e plantas do Cerrado está associada com a grande heterogeneidade de ambientes. Esses ambientes são o resultado das interações entre clima, altitude, latitude, química e física do solo, disponibilidade de água e nutrientes, geomorfologia, profundidade do lençol freático, frequência de queimadas e pastejo. Os tipos de vegetação encontrados no Cerrado são classificados

em onze tipos distribuídos em formações florestais: Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão; savânicas: Cerrado Sentido Restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda e campestres: Campo Sujo, Campo Limpo e Campo Rupestre (RIBEIRO & WALTER, 2008).

Algumas estimativas indicam que 67% da vegetação nativa do Cerrado já foi de alguma forma modificada. Trabalhos recentes e mapeamento mostram que esse percentual, em média, é bem menor, de 39%, embora em algumas regiões a antropização chegue a 100% (SANO et al, 2007). Essa modificação começou a ocorrer a partir da década de 50 devido à adoção de uma política de interiorização pela transferência e construção da nova capital e de integração nacional com a construção e pavimentação de estradas (IBAMA, 2009) através da criação de programas para o desenvolvimento econômico da região. Um dos exemplos dessa política foi o Programa Polocentro (GOEDERT et al., 2008), contribuindo para o deslocamento do eixo de produção agrícola e agropecuária da região Sul-Sudeste para a região Centro-Oeste. Esses eventos fizeram que o Cerrado fosse inserido no contexto de produção de alimentos e energia do país. Houve uma explosão demográfica causando um crescimento desordenado e um avanço sobre áreas de preservação ambiental, nascentes e encostas; êxodo rural; desmatamento; conversão de áreas nativas para agricultura e pastagem; assoreamento de rios e lagos; formação de voçorocas; construção de grandes barragens; eutrofização das águas pela descarga de efluentes residenciais e industriais; aumento da emissão de gases para a atmosfera pelo crescimento da frota de veículos e das queimadas; formação de depósitos de lixo a céu aberto; contaminação do lençol freático; aumento da incidência de doenças causadas pela falta de saneamento básico; introdução de plantas e animais exóticos, dentre outros (DIAS, 2008).

Um estudo realizado por Machado et al. (2004) apontou que até 2002 havia sido desmatada 54,9% da área original do Cerrado. Segundo esse estudo, o Cerrado corre o risco de desaparecer até 2030 se não forem realizados esforços para sua conservação. Por outro lado, Sano et al. (2007) mostraram dados menos alarmantes, com o Cerrado ainda possuindo 61% de vegetação natural. Ações como o Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira - PROBIO coordenado pelo Ministério do Meio Ambiente entre 1998 e 2000 (MMA/SBF, 2002) que envolveu várias instituições governamentais e não governamentais são ferramentas importantes para o estabelecimento de regras e políticas públicas que norteiem a busca de um desenvolvimento considerado sustentável. Os resultados dos estudos inseridos nesse

projeto foram responsáveis pela identificação de áreas prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade e pela assinatura do Decreto nº 5.092/2004 (BRASIL, 2004) e Portaria nº 09/2007 (BRASIL/MMA, 2007) que definem regras para a identificação de áreas prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade (MMA/SBF, 2002).

Estudos realizados pelos pesquisadores do Programa Cerrado da Conservation International - Brasil indicam que o desmatamento desse bioma chega a 1,5% ou três milhões de hectares ano⁻¹. Somente 6,2%, o equivalente a 22.000 km² de área do Cerrado está protegido em áreas de preservação. No entanto, as unidades de conservação são mal distribuídas quanto às categorias de manejo, à representação geográfica das regiões e dos estados, ao tamanho das unidades e à representatividade da enorme heterogeneidade regional do Cerrado (CONSERVATION INTERNATIONAL BRASIL, 2009). Essa situação faz com que esse bioma seja considerado um dos 25 *hotspots* (áreas críticas para conservação) de biodiversidade e desperte especial atenção para a conservação dos seus recursos naturais (MYERS et al., 2000).

A valorização e a descoberta de meios de uso sustentável da biodiversidade desse bioma são alternativas interessantes para a sua conservação. A utilização dos recursos naturais é um desses meios, através da apresentação do potencial de uso e da importância socioeconômica. Os frutos nativos do Cerrado, que são base de sustentação da vida silvestre e fonte de alimento para as populações locais podem ser inseridos nesse contexto (SILVA et al., 2001). Diversos estudos sobre a caracterização físico-química de frutas nativas do Cerrado têm encontrado várias fontes de proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais, fibras, vitaminas e substâncias bioativas, tais como, carotenóides e compostos fenólicos (ALMEIDA et al., 2008), aumentando o interesse nas pesquisas tanto de caracterização físico-química quanto agrônômica. Assim, muitas dessas frutas podem complementar as fontes alimentares já existentes na dieta da população.

3.2 BIODIVERSIDADE

O termo biodiversidade ganhou popularidade com o Fórum Norte-americano de Biodiversidade organizado pelo Conselho da Comissão Nacional de Investigação sobre Ciências da Vida e pela direção do Instituto Smithsonian de Atividades Internacionais

em 1986 e pela edição do livro Biodiversity pelo entomologista E. O. Wilson em 1988 como resultado desse fórum (WILSON, 1988).

A biodiversidade representa um contínuo da organização ecológica (de genes a populações, a espécies, a toda a biosfera) que não pode ser quantificada somente por uma única variável. Menos de 1, 5 milhões das espécies encontradas no planeta Terra são conhecidas e descritas e esse número pode ser três vezes maior (LANGHAMMER et al., 2007). Estima-se que o Brasil possua algo em torno de 20% de toda a biodiversidade existente no planeta (VALOIS, 1999), aproximadamente dois milhões de espécies entre plantas, animais e microrganismos (SEROA DA MOTTA, 1996).

A definição encontrada no Glossário de Recursos Genéticos Vegetais sobre biodiversidade é: no sentido mais geral, o somatório de formas de vida que habitam o planeta. Há dois pontos de vista sobre esta definição: 1) o conceito amplo afirma que é o total de organismos vivos existentes, sua variação genética e os complexos ecológicos por eles habitados; a diversidade considerada abrange aquela dentro da espécie, entre espécies e entre ecossistemas (VALOIS et al, 2009). Seroa da Motta (1996) e Goedert (2007) também consideram a biodiversidade no sentido mais amplo; 2) o conceito restrito afirma que é a multitude de bioformas, em todas as suas categorias taxonômicas e ecológicas, que habitam a biosfera; a inclusão de fatores abióticos não é essencial para a formulação do conceito, uma vez que o que importa é descrever um fenômeno natural, o qual não é dependente para sua visualização da inclusão de fatores físicos e químicos do ambiente (VALOIS et al, 2009).

Segundo a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) realizada em 1992 e a Oitava Conferência das Partes da Convenção sobre Diversidade Biológica (COP 8) e Terceira Reunião das Partes do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança (MOP 3) em 2006, diversidade biológica, também chamada de biodiversidade, pela contração das duas palavras, significa a variabilidade existente entre todos os organismos vivos encontrados em todos os ecossistemas: terrestres, marinhos e aquáticos e os complexos ecológicos dos quais eles fazem parte, abrangendo, também, a diversidade das espécies, entre as espécies e entre os ecossistemas. Inclui os serviços ambientais responsáveis pela manutenção da vida na Terra, interação entre os seres vivos e oferta dos bens e serviços que sustentam as sociedades humanas e suas economias. Esses bens e serviços incluem alimentos, medicamentos, fibras, água e ar limpos e outros recursos naturais que suportam as atividades humanas (CDB, 1993; MRE/MMA, 2009).

Embora a biodiversidade ofereça grande valor econômico, ambiental e espiritual para a humanidade, tem sido ameaçada pelo consumo insustentável de recursos naturais e pelo rápido crescimento populacional e aumento da pobreza. A expansão da agricultura, das indústrias e da urbanização de forma desordenada tem fragmentado, degradado e eliminado o habitat de inúmeras espécies. Também, a introdução de espécies exóticas em locais antes habitados por espécies nativas e a poluição tem alterado os ciclos climáticos e biogeoquímicos ocasionando mudanças drásticas no planeta. E, a caça, a pesca e o comércio predatórios estão dizimando as últimas populações de espécies de alto valor (LANGHAMMER et al., 2007).

3.3 RECURSOS GENÉTICOS

Os recursos genéticos são a base essencial da biodiversidade. Segundo a Convenção sobre Biodiversidade Biológica (1993) o termo recursos genéticos significa material genético com valor atual ou potencial. Para Valois (1999) é a variabilidade de espécies de plantas, animais e microrganismos integrantes da biodiversidade, de interesse sócio-econômico atual e potencial para utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins.

Entende-se por recursos genéticos vegetais o material genético vegetal com valor atual ou potencial (GOEDERT, 2007). Os recursos genéticos vegetais abrangem as seguintes categorias: espécies silvestres, parentes silvestres das plantas cultivadas, raças locais de plantas, variedades de plantas, linhagens melhoradas e populações experimentais e linhagens com características genéticas e citogenéticas especiais, dentre outras (VALOIS, 1999).

A conservação de recursos genéticos pode ser feita *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* é definida como a ação de conservar plantas e animais em suas comunidades naturais. As unidades operacionais são várias, destacando-se parques nacionais, reservas biológicas, reservas genéticas, estações ecológicas, santuários de vida silvestre, etc. Acredita-se que o material vivendo sob estas condições está sob influência direta das forças seletivas da natureza e, portanto, em contínua evolução e adaptação ao ambiente, desfrutando de uma vantagem seletiva em relação ao material que cresce ou é conservado sob condições *ex situ* (VALOIS et al, 2009). A conservação *ex situ* é a ação de conservar a variação genética das espécies fora de suas comunidades naturais. Desdobra-se em várias modalidades, entre as quais conservação *in vitro*, em

coleções a campo, em câmaras frias, em nitrogênio líquido, etc. Acredita-se que o material genético mantido sob estas condições, longe de seu meio natural, esteja menos sujeito à ação de forças seletivas e, portanto, leva desvantagem sob o ponto de vista de adaptação, se reintroduzido em seu habitat natural. Esta teoria, muito aceita na literatura recente, ainda carece de confirmação experimental convincente (VALOIS et al., 2009).

A conservação, prospecção, coleta, caracterização, avaliação e documentação dos recursos genéticos vegetais, também chamados de recursos fitogenéticos, para a alimentação e a agricultura são essenciais para o desenvolvimento agrícola sustentável para as gerações presente e futura. São a matéria-prima indispensável para o melhoramento genético das culturas pela incorporação de espécies ou genótipos novos à matriz agrícola ou, em programas mais específicos, à incorporação de caracteres úteis, não disponíveis nas cultivares em uso. Além disso, são essenciais para a adaptação às alterações ambientais e as necessidades humanas futuras (FAO, 2009; VALLS, 2009).

3.4 GERMOPLASMA E DIVERSIDADE GENÉTICA

O germoplasma é a base física do cabedal genético que reúne o conjunto de materiais hereditários de uma espécie (VALOIS et al., 2009). Para Goedert (2007) a diversidade ou variabilidade genética que existe entre as espécies é chamada de interespecífica e a existente dentro da mesma espécie é conhecida como intraespecífica, também chamada de germoplasma. Segundo Vieira (2000) a diversidade contida em um germoplasma deve ser protegida de eventuais perdas para garantir a sua utilização.

A coleção de germoplasma é definida como a coleção de genótipos de uma espécie com origens geográfica e ambiental variadas e que se constitui em matéria-prima para programas de pesquisa e melhoramento (VALOIS et al., 2009). As coleções de germoplasma são mantidas em várias instituições que têm por responsabilidade garantir a diversidade genética (pela coleta periódica de recursos genéticos ou pelo intercâmbio com outros bancos de germoplasma), multiplicá-las, distribuí-las aos usuários e promover a caracterização por diversas metodologias (VIEIRA, 2000).

O germoplasma pode ser coletado, caracterizado e conservado na forma de sementes, mudas, *in vivo*, *in vitro*, bulbos, tubérculos, rizomas, estacas, grãos de pólen, cultura de tecidos e DNA isolado e estocado (GOEDERT, 2007; WALTER et al., 2007).

A coleta é definida no Glossário de Recursos Genéticos Vegetais como: 1) em recursos genéticos vegetais, o ato de coletar o germoplasma de cultivos agrícolas, de aparentados silvestres de culturas ou de espécies com interesse científico e econômico, seja sob a forma de sementes, peças vegetativas ou o indivíduo transplantado; 2) em botânica, o ato de coletar ramos, partes de plantas ou indivíduos de seu habitat natural, prensá-los dentro de jornais, secá-los em estufas específicas e incorporá-los a herbários (VALOIS et al., 2009).

A amostragem é a sistemática de efetuar-se a amostra. Técnicas de amostragem variam conforme as necessidades da demanda. Pode-se ter amostragens seletivas ou casualizadas, mas freqüentemente ocorrem as duas seguintes situações para plantas com sementes: 1) sementes de vários indivíduos da população são colocadas no mesmo envelope ou saco e recebem um só número do coletor; 2) sementes de cada indivíduo são colocadas em sacos distintos e cada um deles recebe um número de coletor, assim formando vários acessos. O número ideal de indivíduos a ser amostrado varia de cultura para cultura e a abordagem geralmente leva em consideração o sistema de cruzamento da espécie, se autógama, alógama ou intermediária (VALOIS et al., 2009). A amostra é o subconjunto de uma população através do qual se estimam as propriedades e características dessa população (VALOIS et al., 2009).

A espécie é definida como a unidade básica de classificação dos seres vivos. Antigamente tida como a unidade de evolução dos organismos, a espécie cedeu este lugar para a população local (deme). O acesso é a amostra de germoplasma representativa de um indivíduo ou de vários indivíduos da população. Em caráter mais geral, qualquer registro individual constante de uma coleção de germoplasma (ex.: uma plântula, uma maniva etc.) (VALOIS et al., 2009).

Segundo o Glossário de Recursos Genéticos Vegetais a caracterização é a descrição e registro de características morfológicas, citogenéticas, bioquímicas e moleculares do indivíduo, as quais são pouco influenciadas pelo ambiente, em sua expressão. Aplica-se a descritores de acessos componentes de uma coleção de germoplasma ou àqueles de um banco de genes. A caracterização e dados de passaporte são componentes vitais do germoplasma com perspectivas de utilização em programas nacionais de pesquisa e requisição internacional (VALOIS et al., 2009). Além de proporcionar melhor conhecimento do germoplasma disponível, essencial para seu uso mais intenso em etapas subseqüentes, a caracterização e avaliação morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma permitem a identificação dos acessos

duplicados, permitem o estabelecimento de coleções nucleares, facilitando o uso da diversidade nas avaliações subseqüentes, mais voltadas a aspectos agrônômicos e permitem a identificação dos modos de reprodução predominantes nos acessos (VALLS, 2007).

A conservação também é definida em sentido amplo e restrito. Em sentido amplo, é o conjunto de atividades e políticas que asseguram a contínua disponibilidade e existência de um recurso. Em sentido mais restrito, é o armazenamento e a guarda do germoplasma em condições ideais, permitindo a manutenção de sua integridade. A conservação engloba a preservação, que é usada para germoplasma armazenado em temperaturas criogênicas (baixa temperatura, -196 °C) (VALOIS et al., 2009).

A diversidade genética poder ser definida, de forma mais ampla, como a soma total da informação genética contida nos genes de indivíduos de plantas, animais, fungos e microrganismos (GOEDERT, 2007). De forma mais restrita, é o conjunto das diferenças genéticas entre os indivíduos de uma mesma espécie ou de um conjunto de espécies. Em geral, quanto maior for a distribuição geográfica, maior será a diversidade genética da espécie (CLEMENT, 1999). A diversidade ou variabilidade genética é a base dos trabalhos de seleção e melhoramento genético, de modo que a sua conservação e caracterização é um grande desafio da pesquisa.

3.5 O GÊNERO *PASSIFLORA*

O gênero *Passiflora* L. pertence à família Passifloraceae que é composta por 20 gêneros, dos quais *Passiflora* se destaca com cerca de 400 espécies (CERVI, 1997). São José et al. (1997) relatam que existem entre 347 a 683 espécies conhecidas segundo diversos autores. É um gênero originário da América Tropical e Subtropical. No Brasil são encontradas de 150 a 200 espécies tendo seu centro de distribuição na região Centro-Norte (OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005; FALEIRO et al., 2005).

O maracujazeiro é uma planta trepadeira, herbácea ou lenhosa, perene, expandindo-se geralmente, mediante gavinhas axilares. Algumas raras espécies silvestres de maracujazeiro são árvores pequenas ou arbustos. A coloração e a forma das flores variam conforme a espécie e até com a variedade. Os frutos são bagas muito variáveis em formas (globosa, ovóide, elipsóide e suas variantes), tamanho e cores. Em regra geral, o fruto possui uma polpa ácida ou doce, mucilaginosa ou aquosa, em forma de arilo que recobre as sementes (CERVI, 1997).

A palavra maracujá é uma denominação indígena, de origem tupi, que significa alimento em forma de cuia. O maracujá é conhecido por diversas denominações como maracuyá, granadilla, passionfruit, passionsfrucht, passionária, flor de la pasión, flor-da-paixão. É chamado de flor-da-paixão porque a flor e as folhas da primeira espécie descoberta, *Passiflora incarnata* L., descrita em 1753, lembravam vários elementos da paixão de Cristo. Os três estiletos/estigmas representam a Santíssima Trindade ou os três cravos utilizados na crucificação de Cristo; as cinco anteras as cinco chagas; a coroa/verticilos de coloração vermelha e azul a coroa de espinhos de Jesus Cristo, as gavinhas o açoite e as folhas a lança que transpassou Cristo (CERVI, 1997; FALEIRO et al., 2005).

Existe uma grande variabilidade genética intra e interespecífica dentro de *Passiflora* (FERREIRA, 2005) que pode ser explorada e utilizada em programas de melhoramento genético. Já foram realizados estudos da diversidade genética de maracujazeiros nativos e cultivados com base em marcadores moleculares, tais como, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (VIEIRA et al., 1997; ANGEL et al., 1998; CASSIANO et al., 1998; FAJARDO et al., 1998; AUKAR et al., 2002; CROCHEMORE, et al. 2003a; VIANA et al., 2003; FALEIRO et al., 2004; BELLON et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2007; BELLON et al., 2009); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (SEGURA et al., 2002) e fAFLP (*fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*) (GANGA et al., 2004). Também existem trabalhos sobre a diversidade genética avaliada pelas características físico-químicas dos frutos entre acessos de maracujazeiro amarelo (GODOY et al., 2007) e em maracujazeiros-do-sono nativos (CARDOSO-SILVA, et al., 2007). Além de estudos da diversidade genética com base em descritores morfoagronômicos em espécies de *Passiflora* (CROCHEMORE et al, 2003b; NEGREIROS et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008).

O maracujá é umas das frutas nativas do Cerrado que apresenta diversas potencialidades, tais como: agronômicas, no enriquecimento dos programas de melhoramento como porta-enxerto, fonte de resistência a doenças e pragas (FALEIRO et al., 2005), para aumento da produtividade, melhora de características físicas, químicas ou sensoriais da polpa de maracujá para novas opções de mercado, como fruta exótica ou para incrementar propriedades funcionais (FALEIRO et al., 2008); uso como planta ornamental pela beleza de suas flores (FALEIRO et al., 2005); medicinal (suco,

casca e sementes) (DHAWAN et al., 2004) e como alimento funcional (COSTA & TUPINAMBÁ, 2005).

Estudos sobre a distribuição geográfica; caracterização botânica, morfológica, física, química, físico-química, agrônômica, citogenética e molecular; e interações ecológicas são de grande importância para a utilização e conseqüentemente para a conservação da grande diversidade e variabilidade genética existente dentro do gênero *Passiflora*. Esse gênero, apesar de sua importância atual e potencial e de seu elevado número de espécies encontradas em vários tipos de vegetação no Brasil, ainda é pouco estudado e explorado comercialmente. A realização de estudos de caracterização de espécies de *Passiflora* é imprescindível para subsidiar o uso econômico dessas espécies, contribuindo para a sua conservação (FALEIRO et al., 2005).

No Brasil, a conservação de germoplasma de maracujá é realizada, em sua maioria, por meio de coleções de plantas no campo (conservação *ex situ*). Também é feita a conservação intermediária em câmaras com cerca de 30% de umidade relativa e aproximadamente 10 °C. Nessas condições, as sementes se conservam a curto ou a médio prazo, pois são classificadas como ortodoxas (FERREIRA, 1999). Ferreira (2005) fez um levantamento das principais coleções de germoplasma do gênero *Passiflora* no Brasil e no mundo. Considerando a grande diversidade genética do gênero e suas potencialidades, podemos dizer que o número de acessos conservados em bancos de germoplasma, aproximadamente 1200 acessos, é modesto.

No Cerrado são encontradas mais de 40 espécies do gênero *Passiflora*. Além da espécie de maracujazeiro-azedo comercial, *Passiflora edulis* Sims., as mais conhecidas são *P. alata* Curtis (maracujá-doce), *P. cincinnata* Mast. (maracujá-de-casca-verde), *P. nitida* Kunth (maracujá-suspiro), *P. quadrangularis* L. (maracujá-açú), *P. serrato-digitata* L. (maracujá-pedra) e *P. setacea* D.C. (maracujá-do-sono). São utilizadas para consumo na forma de sucos, doces e geléias; medicamentos ou como ornamentais. De todas as espécies do gênero *Passiflora*, apenas as espécies *P. edulis* e *P. alata* sofreram processo de domesticação a partir de 1970 e estão sendo cultivadas em escala comercial (BRAGA et al., 2006).

Abaixo, são apresentadas pequenas descrições de algumas espécies comerciais e silvestres do gênero *Passiflora*, encontradas no Cerrado e que tiveram algum destaque na literatura científica nos últimos anos, considerando seu potencial agrônômico (OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005; BRAGA et al., 2006).

3.5.1 *Passiflora edulis* Sims.

A espécie *Passiflora edulis* foi descrita em 1818 por Simmonds. O epíteto específico *edulis* vem do latim que significa comestível. É a espécie de maracujá mais cultivada por todo o mundo (CERVI, 1997).

É conhecida no Brasil como maracujá (Santa Catarina e Paraná), maracujá-amarelo, maracujá-roxo, maracujá-azedo, maracujá-preto (São Paulo e Rio Grande do Sul), maracujá-de-comer, maracujá-peroba (Pará e Paraíba), maracujá-mirim, maracujá-redondo e maracujazinho (Rio de Janeiro). Na Colômbia é chamado de gulupa e curuba e na Venezuela de parcha (CERVI, 1997). Duas formas podem ser encontradas, o maracujá de casca amarela e o de casca roxa que segundo Cervi (1997) e Bernacci et al. (2008) são a mesma espécie.

É encontrada no Paraguai, Argentina, Brasil, Colômbia, Venezuela, Peru, Equador, Guatemala, Jamaica, Costa Rica, Cuba, Porto Rico, Martinica, Trindade, Havai e Bermudas. No Brasil é encontrada em praticamente todo o território: Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. É uma espécie que vive em ambientes com incidência solar alta e solos úmidos e bem drenados. Pode ser encontrada em margens de florestas, nas capoeiras e capoeirões. Floresce e frutifica praticamente todo ano (CERVI, 1997).

Os frutos são globosos ou ovóides com grandes variações no comprimento e largura, principalmente quando comparamos variedades melhoradas e acessos silvestres. A cor da casca é muito variável, do amarelo, amarelo-esverdeado ao púrpura escuro. A coloração da polpa é amarelo escuro. As sementes são ovais com 0,5-0,6 cm de comprimento por 0,3-0,4 cm de comprimento, muito duras. A cor da flor é lilás com tonalidades roxo-escura (CERVI, 1997; SILVA et al., 2001). O número de cromossomos nessa espécie é $n = 9$, $2n = 18$, (CERVI, 1997; PEÑALOZA & POZZOBON, 2007; SOUZA et al., 2008).

Alguns acessos silvestres e nativos no Cerrado são tolerantes e outros resistentes a *Fusarium oxysporum*, causador da murcha, também conhecida como fusariose; outros são tolerantes a *F. solani*, causador da podridão-fusariana ou podridão do colo e a *Phytophthora* sp (podridão do colo ou do pé). Alguns acessos são resistentes à antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* e à bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (JUNQUEIRA, et al., 2005). A resistência aos nematóides

Meloydogine incognita e *M. javanica* também tem sido verificada em alguns acessos silvestres (PAULA, 2006). A busca de resistência dentro de *P. edulis* (frutos de cor roxa ou amarela, cultivados ou silvestres) é muito importante porque pode viabilizar a obtenção de materiais genéticos resistentes, com potencial comercial em um espaço de tempo curto (RONCATTO et al. 2004). Alguns acessos silvestres têm apresentado potencial para deixar mais avermelhada a polpa do maracujá-amarelo comercial, melhorando suas características tecnológicas e propriedades funcionais (FALEIRO et al., 2008).

A polpa dos frutos é consumida *in natura* ou na forma de geléias, doces, sucos e sorvetes (SILVA et al., 2001). As folhas são utilizadas como sedativo, diurético, anti-helmíntico, antidiarréia, digestivo, estimulante, tônico, no tratamento para hipertensão, sintomas da menopausa e cólicas. Os frutos são utilizados para aliviar a constipação (DHAWAN et al., 2004). Recentemente, usos da fibra da casca do fruto na composição de fibras dietéticas e das sementes na extração de óleos têm sido objetivos de ações de pesquisa e desenvolvimento.

3.5.2 *Passiflora cincinnata* Mast.

A espécie *Passiflora cincinnata* foi descrita em 1868 por Masters. O epíteto específico *cincinnata* vem do latim e significa que tem por natureza cabelo anelado, encrespado devido à corona de filamentos da flor, cujos filamentos se enrolam quando a flor está completamente aberta (CERVI, 1997).

É conhecida como maracujá (Santa Catarina, Mato Grosso, Minas Gerais e Pernambuco), maracujá do Cerrado, maracujá-mochila (Alagoas e Paraíba), maracujá-mi (Mato Grosso), maracujá-do-mato (São Paulo, Paraíba, Alagoas e Pernambuco), maracujá-de-vaqueiro, maracujá-de-casca-verde, maracujá-tubarão e maracujá-brabo distribuindo-se em diversos tipos fisionômicos. Na Bolívia é chamada de pachis (CERVI, 1997; OLIVEIRA & RUGIERO, 2005; BRAGA et al., 2006).

É encontrada no Paraguai, Argentina, Brasil, Bolívia e Venezuela. No Brasil está distribuída em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Alagoas e Bahia. É uma espécie encontrada em ambientes com incidência solar alta. É muito comum na borda da mata e capoeiras, inclusive na borda de cultivos. Floresce e frutifica de outubro a maio (CERVI, 1997).

É uma espécie polimorfa muito variável. Tem frutos grandes e pequenos, variação no colorido da flor, cor e gosto do suco. Seus frutos apresentam a casca verde quando maduros. Os frutos são ovóides ou oblongos com 5-6 cm de comprimento por 3-4 cm de comprimento. A cor da polpa é creme. As sementes são ovais com 0,5-0,6 cm de comprimento por 0,4 cm de largura, foveoladas. A cor da flor é roxo-escuro com tonalidades lilás (CERVI, 1997; SILVA et al., 2001; OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005; BRAGA et al., 2006). O número de cromossomos nessa espécie é $n = 9$, $2n = 18$ (CERVI, 1997; OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005).

É uma espécie com acessos tolerantes a *Phytophthora* sp., causador da podridão-do-pé ou do colo (JUNQUEIRA, et al., 2005). São José et al. (1997) relataram a resistência de *P. cincinnata* ao nematóide *Meloidogyne incognita*. É considerada uma espécie vigorosa e apresenta ampla adaptação, características importantes para sua utilização em programas de melhoramento de maracujá (RUGGIERO, 1998, apud SANTOS, 2006).

A polpa dos frutos é consumida *in natura* ou na forma de suco, doces, sorvetes e musses (SILVA et al., 2001).

3.5.3 *Passiflora nitida* Kunth

A espécie *Passiflora nitida* foi descrita em 1817 por Kunth. O epíteto específico *nitida* vem do latim, pois as flores dessa espécie são grandes e vistosas (CERVI, 1997).

É conhecida no Brasil como maracujá-suspiro, maracujá-de-cheiro (Amazonas), maracujá-de-rato e maracujá-do-mato (JUNQUEIRA, 2006). Na Colômbia é chamada de burucugua e granadilla bolsosa e na Guiana de bell-able, marekuya, semitoo e mariconia (CERVI, 1997).

Essa espécie é encontrada no Brasil, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Bolívia, Colômbia, Venezuela, Peru e Panamá. No Brasil ocorre em toda a região Centro-Oeste, Norte, parte da região Nordeste e Sudeste nos estados de Goiás, Mato Grosso, Bahia, Pará, Rondônia, Amazonas, Acre e Distrito Federal. No Cerrado pode ser encontrada em Matas Ciliares, Veredas, Cerradão, Cerrado Senso Restrito e em Matas Secas. Floresce de dezembro a março e frutifica de abril a junho (CERVI, 1997; JUNQUEIRA, 2006).

Os frutos são em forma de baga globosa ou ovóide, medindo cerca de 8 cm de altura e 3 a 7 cm de diâmetro; casca amarelo-alaranjada, internamente branca, cerca de

1,5 cm de espessura e essencialmente esponjoso e polpa branca quase transparente. As sementes são achatadas, cordiformes, com 0,6 cm de comprimento por 0,4 cm de largura, são tridentadas no ápice e reticuladas no centro; arilo sucoso, transparente e adocicado (CERVI, 1997; OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005). O número de cromossomos nessa espécie é $n = 9$, $2n = 18$ (PEÑALOZA & POZZOBON, 2007; SOUZA et al., 2008).

É considerada uma espécie rústica e tolerante a várias doenças e possui potencial para a utilização como porta-enxerto para o maracujá-amarelo comercial (CHAVES et al., 2004), em programas de hibridização específica. Devido à similaridade botânica com *P. alata* poderá ser utilizada em programas de melhoramento para o desenvolvimento de resistência a doenças no maracujá-doce (JUNQUEIRA, 2006). É resistente à *Fusarium oxysporum* e tolerante à *F. solani* e *Phytophthora* sp. Alguns acessos são resistentes à antracnose nos frutos e nos ramos e à bacteriose nas folhas (JUNQUEIRA et al., 2005). Alguns acessos de *P. nitida* são resistentes à morte prematura de plantas (RONCATTO et al., 2004). Dentre as 17 espécies do gênero *Passiflora* avaliadas para resistência a podridão do colo causada por *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*), *P. nitida* foi uma das espécies que se destacou pela menor incidência da doença (FISCHER et al., 2005). A espécie *P. nitida* parece afetar o desenvolvimento da lagarta preta do maracujá (*Dione juno juno*), dado obtido em um estudo da alimentação das larvas dessa lagarta com folhas de nove genótipos de maracujazeiro realizado em laboratório (BOIÇA JR, et al., 1999). Em trabalhos sobre a preferência alimentar de adultos de *Epicauta atomaria* (vaquinha) em maracujazeiros sob condições de laboratório *P. nitida* foi pouco consumida apresentando não-preferência para alimentação como mecanismo de resistência (BOIÇA JR et al., 1996; BALDIN & LARA, 2002). Também é considerada uma espécie vigorosa e apresenta ampla adaptação (RUGGIERO, 1998, apud SANTOS, 2006).

Pertence ao grupo dos maracujás-doces, sendo seus frutos muito apreciados pelas comunidades rurais para consumo *in natura* e na forma de doces e sucos. Os frutos são comumente encontrados para comercialização em mercados, feiras livres e quitandas na região Norte (BRAGA et al., 2006; JUNQUEIRA, 2006).

3.4.4 *P. setacea* DC.

A espécie *Passiflora setacea* foi descrita em 1828 por DC. O epíteto específico *setacea* vem do latim porque as plantas dessa espécie apresentam estípulas setáceas (em forma de seta) (CERVI, 1997).

É conhecida no Brasil como maracujá-do-sono, maracujá do Cerrado, maracujá-de-boi, maracujá-nativo, maracujá-da-caatinga, maracujá-de-cobra (sul da Bahia e semi-árido mineiro) e maracujá-sururuca (Bahia e Rio de Janeiro) (CERVI, 1997; SILVA et al., 2001; BRAGA et al., 2006).

No Brasil, é encontrada no Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso. Também é uma espécie encontrada em ambientes com incidência solar alta. É bastante comum nas florestas primárias bem como em capoeiras, capoeirões e restinga litorânea. Floresce e frutifica de setembro a maio (CERVI, 1997). No Distrito Federal floresce e frutifica no período de dias curtos do ano e a colheita é de agosto a outubro, época de entressafra do maracujazeiro comercial (OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005; BRAGA et al., 2006).

Os frutos são ovóides e globosos com cerca de 5 cm de comprimento por 4 cm de diâmetro, suco doce-acidulado, quando maduros, os frutos caem da planta, semelhante ao maracujá-amarelo. A casca dos frutos é de coloração verde-clara com listras verde-escuro em sentido longitudinal e a polpa, cor amarelo-claro ou creme. As sementes são obovadas levemente reticuladas com cerca de 0,5 cm de diâmetro por 0,3 cm de comprimento. A cor da flor é branca (CERVI, 1997; SILVA et al., 2001; JUNQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005; BRAGA et al., 2006). O número de cromossomos nessa espécie é $n = 9$, $2n = 18$ (PEÑALOZA & POZZOBON, 2007; SOUZA et al., 2008).

É resistente à morte prematura das plantas e à fusariose. Um acesso da Embrapa Cerrados mostrou-se resistente à virose nas folhas e antracnose nos frutos e folhas (JUNQUEIRA et al., 2005). Apresenta resistência à bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (SÃO JOSÉ et al., 1997). Em um trabalho desenvolvido por Boiça Jr et al. (1999) sobre a densidade larval e preferência alimentar da lagarta preta *Dione juno juno* com folhas de nove genótipos de maracujazeiro em laboratório, a espécie *P. setacea* apresentou resistência do tipo não-preferência para alimentação e/ou antibiose. Também apresenta resistência aos nematóides que atacam as raízes de maracujazeiro (*Meloydogine incognita* e *M. javanica*). O híbrido *P.*

coccinea x *P. setacea* também apresentou resistência a *M. javanica* (PAULA, 2006). Estudos sobre sua utilização como porta-enxerto para o maracujá-amarelo comercial obtiveram dados promissores (CHAVES et al., 2004). Em um estudo feito por Yamashiro (1987, apud SANTOS, 2006) sobre a incidência de verrugose dos frutos em campo observou-se que *P. setacea* foi pouco atacada por essa doença. É uma espécie vigorosa e tem ampla adaptação facilitando seu uso em programas de melhoramento (RUGGIERO, 1998, apud SANTOS, 2006).

A polpa de *P. setacea* é consumida *in natura* ou na forma de doces e suco (SILVA et al., 2001). Apresenta potencial agrônômico, econômico e medicinal. Estudos sobre as propriedades ansiolíticas e calmantes de substâncias encontradas na polpa dessa espécie têm sido realizados por equipe técnica da Embrapa Cerrados e parceiros.

3.6 CAROTENÓIDES

Existem mais de 600 carotenóides na natureza. Os carotenóides são pigmentos responsáveis pela coloração de muitas frutas, folhas e flores, variando entre o amarelo-claro, o alaranjado e o vermelho. Podem também ser encontrados em microrganismos e algumas bactérias. Nos animais os carotenóides são provenientes da dieta. A cantaxantina, equinenona, tunaxantina (carotenóide majoritário em diversos peixes) e astaxantina (principal carotenóide de vários peixes como truta e salmão e da maior parte dos crustáceos como camarão, lagosta e caranguejo) são exemplos de carotenóides encontrados em animais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Nas plantas, fazem parte da rota fotossintética através da captação do excesso de energia luminosa, juntamente com as clorofilas. Quando consumidos através da alimentação, vários carotenóides estão associados à redução de doenças crônico-degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e formação de catarata, devido ao potencial antioxidante de alguns carotenóides, como o licopeno; pelo seqüestro do oxigênio singlete, um radical livre formado a partir de diversas reações endógenas no organismo e pelo bloqueio de reações mediadas por radicais livres. Outros carotenóides, que possuem em sua estrutura pelo menos um anel β -ionona não substituído, como o β -caroteno, o α -caroteno e a β -criptoxantina, dentre outros, podem apresentar atividade como vitamina A, após sua conversão no intestino (BRITTON, 1995; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; VIEIRA & AGOSTINI-COSTA, 2007).

As primeiras publicações sobre carotenóides datam do século XIX. Em 1907 foi descoberta a estrutura dos carotenos e em 1927 foi confirmada a estrutura básica dos carotenóides (EUGSTER, 1995). Os carotenóides são compostos isoprenóides que apresentam uma estrutura básica composta por 40 carbonos (Figura 1). Essa estrutura pode sofrer modificações através da ciclização de uma ou das duas extremidades da molécula formando sete grupos terminais, sendo mais comuns os grupos β , ψ e ϵ (Figura 2). Pode ocorrer ainda mudança no nível de hidrogenação, como hidrogenação parcial ou desidrogenação, introdução de grupos funcionais contendo oxigênio e isomerizações. Os carotenóides que contêm somente carbono e hidrogênio em sua estrutura são chamados de carotenos, como o β -caroteno e o licopeno e aqueles que apresentam grupos substituintes com oxigênio são conhecidos como xantofilas. As xantofilas podem conter grupos hidroxila, como a β -criptoxantina e a luteína; grupos ceto- como a capsantina e capsorrubina; grupos epóxi- como a violaxantina e o β -caroteno-5,6-epóxido; e grupo aldeído como a β -citraurina (BRITTON, 1995; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

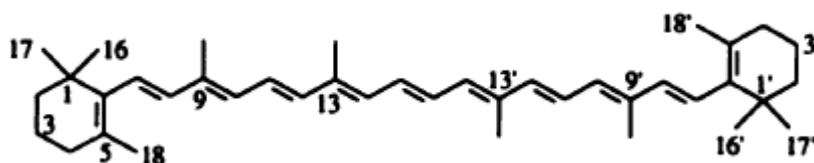


Figura 1- Estrutura do β -caroteno (Adaptado de Britton, 1995).

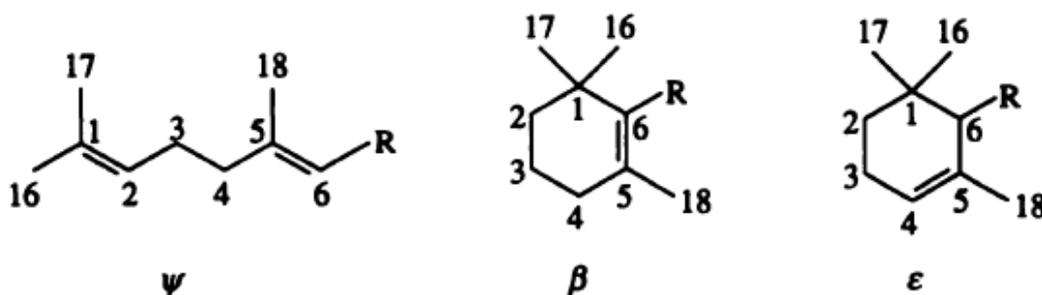


Figura 2- Grupos terminais mais comuns encontrados em carotenóides (Adaptado de Britton, 1995).

Os carotenóides são sintetizados a partir da condensação de duas moléculas de geranilgeranil pirofosfato formando o fitoflueno, o precursor de todos os outros

carotenóides (VIEIRA & AGOSTINI-COSTA, 2007). As funções e ações dos carotenóides são determinadas pelas propriedades físicas e químicas das moléculas, sendo definidas pela estrutura molecular. O número e a posição das insaturações na molécula determinam as propriedades fotoquímicas e a reatividade química de cada carotenóide. O formato e o tamanho tanto da molécula como dos grupos terminais também são importantes. Os carotenóides são encontrados principalmente na forma *trans*, que é a forma mais estável, mas podem ser encontrados também na forma *cis* (BRITTON, 1995).

O licopeno é o principal pigmento de muitas frutas e vegetais com coloração vermelha, como o tomate, a melancia, o mamão e a goiaba. O ζ -caroteno é o principal carotenóide encontrado em maracujá e carambola. O fitoeno e o fitoflueno, devido ao fato de não apresentarem coloração, provavelmente têm sua detecção subestimada (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). O β -caroteno é o carotenóide mais comum nos alimentos, é o principal pigmento em cenoura, damasco, manga, ameixa, acerola e frutos de palmeiras (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). O α -caroteno é encontrado em grande quantidade em cenoura e em algumas variedades de abóbora e moranga e o γ -caroteno é encontrado em frutos de pitanga. O δ -caroteno é o principal constituinte em uma linhagem de tomate e em pupunha. A rubixantina é o principal pigmento de frutos das rosáceas e também é encontrada em pitanga. A β -criptoxantina é o principal pigmento de várias frutas de coloração laranja como laranja, pêssego, nectarina, caqui e cajá. A luteína é o carotenóide predominante em folhas, vegetais verdes e flores amarelas. A zeaxantina é o principal carotenóide encontrado no milho amarelo e no pequi. A violaxantina é facilmente degradada, por isso sua detecção pode ser subestimada em alimentos. Os principais carotenóides encontrados em folhas são luteína, β -caroteno, violaxantina e neoxantina. A capsantina e a capsorrubina são encontradas somente em pimenta, a bixina em urucum e a crocetina em açafrão (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Podem ser encontradas variações quantitativas de carotenóides dentro de uma mesma espécie, que podem ser ocasionadas pelo cultivar ou variedade e por fatores ambientais como solo, clima, temperatura, estação do ano, luminosidade, utilização ou não de agroquímicos, época de colheita e maturação dos frutos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A primeira investigação de carotenóides em maracujá foi realizada por Pruthi & Lal em 1958, utilizando-se o maracujá-roxo. Foram encontrados fitoflueno, ζ -caroteno,

β -caroteno, α -caroteno e outros três carotenóides não identificados (CECCHI & RODRIGUEZ-AMAYA, 1981; MERCADANTE et. al., 1998). No Brasil, Cecchi & Rodriguez-Amaya (1981) analisaram a composição de carotenóides do suco processado de maracujá-amarelo comercial, encontrando, como carotenóide principal, o ζ -caroteno, além de α -caroteno, β -caroteno, *cis*-neurosporeno, neurosporeno, γ -caroteno, licopeno, aurocromo, criptocromo e auroxantina nas duas marcas. A cantaxantina, um carotenóide característico de animais foi detectado em uma das marcas, aparentemente adicionado como corante. Mercadante et al. (1998) identificaram também em frutos de maracujá-amarelo comercial fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno, β -caroteno, licopeno, prolicopeno, mutacromo, β -criptoxantina, β -citraurina, anteraxantina, violaxantina e neoxantina. Silva & Mercadante (2002) identificaram na polpa de maracujá-amarelo comercial β -criptoxantina, prolicopeno, *cis*- ζ -caroteno, ζ -caroteno, β -caroteno e 13-*cis*- β -caroteno, além de neurosporeno e γ -caroteno em alguns lotes. Porém, estudos sobre a composição de carotenóides nas espécies nativas e silvestres de maracujá são inexistentes.

3.6.1 Análise de carotenóides

Todas as etapas envolvidas em análises de carotenóides devem ser realizadas com proteção da luz e controle de temperatura para evitar exposição ao calor e utilização de reagentes com alto grau de pureza para evitar a degradação dos carotenóides. A análise de carotenóides consiste em uma série de procedimentos que devem ser cuidadosamente controlados: a) preparo da amostra, que deve ser representativa e homogênea; b) extração dos pigmentos com acetona gelada, na presença de antioxidante; c) partição dos carotenóides para hexano ou benzina de petróleo; d) saponificação para liberar os ésteres de xantofilas (análise de carotenos ou xantofilas livres não necessita de saponificação), seguida de lavagem com água para eliminar o álcali; e) concentração a vácuo e em atmosfera de nitrogênio para a evaporação do solvente; f) separação cromatográfica dos diferentes carotenóides em coluna aberta ou por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*); g) identificação e quantificação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

3.6.1.1 Extração de carotenóides

Os carotenóides são extraídos geralmente de amostras biológicas, as quais contêm uma grande quantidade de água. A extração é feita com solventes orgânicos miscíveis em água como acetona, metanol, etanol ou empregando misturas para permitir uma melhor penetração do solvente. A acetona é freqüentemente usada para a extração de carotenóides, pois tem bom poder para penetrar e romper a membrana celular das células liberando os carotenóides, além de ter um custo baixo. O tetrahidrofurano (THF) também é utilizado como solvente para extração. É adicionado hyflosupercel na amostra para facilitar a desintegração dos tecidos e a filtração do extrato. A extração é repetida até a obtenção de um resíduo incolor (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

3.6.1.2 Saponificação

Os carotenóides que contém o grupo hidroxila são conhecidos como xantofilas. Podem apresentar-se na forma livre ou esterificados com proteínas e lipídeos. Por isso, a saponificação é um método utilizado para romper as ligações dos carotenóides com lipídeos e proteínas e remover a clorofila. Porém, aumenta o tempo de análise, pode provocar a formação de outros compostos e a degradação dos carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Por isso, a avaliação das etapas utilizadas na determinação de carotenóides é importante, pois os carotenóides são compostos que podem ser facilmente degradados e, assim, a quantificação pode ser comprometida.

3.6.1.3 Cromatografia

A palavra cromo vem do grego e significa cor e grafia significa escrita, por isso, cromatografia significa escrevendo em cores, embora o processo não dependa da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes da amostra. É um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes entre duas fases que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária (parada) enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, relacionado com a polaridade de cada substância, resultando em migrações diferenciais.

É uma técnica combinada com análises qualitativa e quantitativa das substâncias separadas. Combinada com química convencional ou instrumental serve para identificar espécies químicas (COLLINS, 1990; CECCHI, 2003).

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (COLLINS, 1990). É utilizada para a identificação dos grupos funcionais de carotenóides em placas de sílica gel pelo fator de retenção (Rf) e por testes químicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A amostra é aplicada em uma extremidade da placa, na forma de uma pequena mancha ou como uma tira. A placa é colocada em um recipiente de vidro com solvente, e este começa a subir, separando a amostra em manchas ou zonas (CECCHI, 2003).

A cromatografia em coluna aberta (CCA) ou *Open Column Chromatography* (OCC) é um dos tipos de cromatografia utilizado para a separação, identificação e quantificação dos carotenóides. A cor permite o monitoramento visual da separação dos carotenóides e principalmente por essa razão essa técnica clássica ainda é uma opção viável para a análise quantitativa de carotenóides. É útil também na separação e purificação de carotenóides usados como padrões para cromatografia líquida de alta eficiência (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Nessa técnica a fase estacionária é empacotada em uma coluna de vidro e o solvente (fase móvel) passa pela coluna sob baixa pressão (CECCHI, 2003). Para a análise de carotenóides geralmente são empregadas fases estacionárias como óxido de magnésio, hidróxido de cálcio e alumina. A eluição e separação dos carotenóides é feita empregando gradiente de polaridade de solventes.

A cromatografia líquida de alta eficiência ou *high pressure liquid chromatography* (HPLC) também é usada para a separação, identificação e quantificação de carotenóides. A detecção dos carotenóides é realizada por um detector ultravioleta-visível de arranjo de diodos (DAD). A determinação de carotenóides também poder ser realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas (EM) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). É um tipo de cromatografia que utiliza pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel (o solvente) passa pela coluna sob altas pressões otimizando o processo de separação pela maior rapidez e eficiência da separação da amostra, alta resolução e sensibilidade (GUIMARÃES & COLLINS, 1990; CECCHI, 2003). A separação de carotenóides por HPLC geralmente emprega colunas de fase

reversa (sílica ligada principalmente com octadecil ou C₁₈). A eluição é feita com gradiente de polaridade de solventes, como acetonitrila, metanol e acetato de etila, podendo ou não usar modificadores de fase móvel, como a trietilamina.

3.6.1.4 Identificação

Os carotenóides podem ser identificados pelo uso combinado do comportamento cromatográfico, da co-cromatografia com padrões, do espectro de absorção no visível e no ultravioleta (UV) e por reações químicas específicas para os diferentes grupos funcionais. O espectro de massa e a ressonância magnética nuclear também podem ser empregados como técnicas de identificação (AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004). O perfil do espectro na região do visível é conferido, principalmente, pela presença de um longo cromóforo de duplas ligações conjugadas (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007). O tempo de retenção e a co-cromatografia com padrões não podem ser utilizados como critérios únicos para a identificação. Para os carotenos, a combinação dos dados cromatográficos com o espectro de absorção no visível (comprimento de onda máximo λ_{max} e estrutura espectral fina) podem ser suficientes para a identificação. Para as xantofilas os testes químicos ou o espectro de massa também são necessários para a identificação conclusiva (AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004).

3.6.1.5 Quantificação

Na cromatografia em coluna aberta as frações são quantificadas por espectrofotometria a partir das respectivas absorbâncias máximas, utilizando-se os valores de absorvidade tabelados por Davies (1976). Na cromatografia líquida de alta eficiência os carotenóides são quantificados através de curva de calibração externa (construída a partir de padrões de carotenóides) e fator de correção. Deve ser injetado um ponto da curva de calibração ou o carotenóide de referência, conforme o caso, para verificar a resposta do detector de arranjo de diodos (DAD) (KIMURA & RODRIGUEZ-AMAYA, 2002).

3.6.1.6 Obtenção de padrões

As etapas realizadas na obtenção de padrões de carotenóides são: extração dos carotenóides com acetona gelada; partição para éter de petróleo (caso a amostra contenha teores significativos de xantofilas é adicionado éter etílico ao éter de petróleo para facilitar a transferência das xantofilas); saponificação; concentração em evaporador rotativo (temperatura inferior a 35 °C); isolamento e purificação dos carotenóides por cromatografia em coluna aberta (somente a porção principal de cada banda do carotenóide é coletada para evitar a contaminação com outras bandas). Quando ocorre a sobreposição de duas bandas a fração correspondente a essas duas bandas é coletada e recromatografada. É realizada a verificação da pureza dos isolados por HPLC e a determinação da concentração por espectrofotometria utilizando os valores de absorvidade tabelados por Davies (1976). A correção da concentração por porcentagem de pureza é feita pela injeção dos padrões no cromatógrafo líquido de alta eficiência e a etapa final é a preparação da mistura de padrões (construção de curvas de calibração) (KIMURA & RODRIGUEZ-AMAYA, 2002).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. M. S.; MACHADO, R. B.; MARINHO-FILHO, J. A. Diversidade Biológica do cerrado. In: AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. (Eds). **Cerrado: ecologia e caracterização**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 17-38.

ALMEIDA, S. P.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, J. A. Frutas Nativas do Cerrado Caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, v. 1. p. 353-381.

ANGEL, F. O.; FAJARDO, D.; GRUM, M.; TOHME, J.; LOBO, M.; Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 101, p. 341-347, 1998.

ARAÚJO, F. P.; SILVA, N.; QUEIROZ, M. A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 723-730, 2008.

AVALIAÇÃO e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 2002. 404 p.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, Rome, v. 17, p. 385-396. 2004.

BALDIN, E. L. L.; LARA, F. M. Atratividade e preferência alimentar de adultos de *Epicauta atomaria* (Germ., 1821)(Col.:Meloidae) em maracujazeiros (*Passiflora* spp.), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 68-71, 2002.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FONSCCECA, K. G.; BRAGA, M. F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 197-202, 2009.

BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PASSOS, I. R. P.; MELETTI, L. M. M. *Passiflora edulis* Sims: The correct taxonomic way to cite the yellow passionfruit. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 566-576, 2008.

BOIÇA JR, A. L.; LARA, F. M.; OLIVEIRA, J. C.; PESSOA, Y; R. Resistência de genótipos de maracujá a *Epicauta atomaria* (Germar, 1821) (Coleoptera, Meloidae) Não-preferência alimentar. **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, v. 22, n. 1, p. 189-192, 1996.

BOIÇA JR, A. L.; LARA, F. M.; OLIVEIRA, J. C. Efeito de Genótipos de Maracujazeiro (*Passiflora* spp.) e da Densidade Larval na Biologia de *Dione juno juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 41-47, 1999.

BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; BERNACCI, L. C. Maracujá-do-Cerrado. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Eds). **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 216-235.

BRASIL. Decreto n. 5.092, de 21 de julho de 2004. Define regras para identificação de área prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 jun. 2004. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_dap/_arquivos/149_legislacao0912200805030.pdf. Acesso em: 02 jun. 2009.

BRASIL/MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Portaria n. 9, de 23 de janeiro de 2007. Disponível em:

http://www.mp.rs.gov.br/areas/ambiente/arquivos/boletins/bola_leg01_07/ig9.pdf.
Acesso em: 15 fev. 2009.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, p. 1551-1558, 1995.

CASSIANO, A. P. A. A.; LEMOS, E. G. M.; OLIVEIRA, J. C. Avaliação de espécies de *Passiflora* através de marcadores moleculares RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, supl., n. 3, p. 214, 1998.

CECCHI, H. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenóides e valor de vitamina A em suco de maracujá processado. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 33, p. 72-76, 1981.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003. 207 p.

CERVI, A. C. **Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora***. Madrid: FONTQUERIA, XLV, 1997. 92 p.

CHAVES, R. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; MANICA, I.; PEIXOTO, J. R.; PEREIRA, A. V.; FIALHO, J. F. Enxertia de Maracujazeiro-Azedo em Estacas Herbáceas Enraizadas de Espécies de Passifloras Nativas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 120-123, 2004.

CLEMENT, C. R. Fruteiras Indígenas e um Centro de Diversidade Genética na Amazônia. In: FERREIRA, F. R. (Org.). **Recursos Genéticos de Espécies Frutíferas no Brasil. Anais do Workshop para Curadores de Bancos de Germoplasma de Espécies Frutíferas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p. 44-49.

COLLINS, C. H. Princípios Básicos de Cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Coords). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 4. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. p. 9-28.

CONSERVATION INTERNATIONAL. Disponível em: <http://www.conservation.org.br/onde/cerrado/>. Acesso em: 02 fev. 2009.

CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA, v. 1760-I, n. 30619, 1993. Disponível em: <http://www.cdb.int>. Acesso em: 23 jun. 2009.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais - estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 474-501.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B. C.; VIEIRA, L. G. E. Genetic Diversity in Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Evaluated by RAPD Markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 4, p. 521-527, 2003a.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B.; STENZEL, N. M. C. Caracterização Agromorfológica do Maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 5-10, 2003b.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T. W. (Ed). **Chemistry and Biochemistry of plant pigments**. 2. ed. London: Academic Press, v. 2, p. 38-165, 1976.

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

DIAS, B. F. S. Conservação da Biodiversidade no Bioma cerrado: histórico dos impactos antrópicos no Bioma cerrado. In: FALEIRO, F. G.; NETO, A. L. F. (Eds). **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 303-333.

EUGSTER, C. H. History: 175 Years of Carotenoid Chemistry. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds). **Carotenoids**. Berlim: Birkhäuser, v. 1 A Isolation and analysis, 1995. p. 1-12.

FAJARDO, D.; ANGEL, F.; GRUM, M.; TOHME, J.; LOBO, M.; ROCA, W. M.; SANCHEZ, I. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, n. 101, p. 341-347, 1998.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; BORGES, T. A.; ANJOS, J. R. N.; PEIXOTO, J. R.; BRAGA, M. F.; SANTOS, D. G. Diversidade genética de espécies silvestres de maracujazeiro com resistência a múltiplas doenças com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, supl, p. S325, 2004.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Desafios da Pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 186-209.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FÁVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de Plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. (Eds). **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 45-62.

FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos de Fruteiras Tropicais e Subtropicais no Brasil. In: FERREIRA, F. R. (Org.). **Recursos Genéticos de Espécies Frutíferas no Brasil. Anais do Workshop para Curadores de Bancos de Germoplasma de Espécies Frutíferas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p. 9-27.

FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 41-51.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; MARTINS, M. C.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causada por *Nectria haematococca*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 250-258, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture**. Rome: FAO, 2009. 56 p.

GANGA, R. M. D.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E. G. M.; GRILI, G. V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHAGAS, E. A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 494-498, 2004.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Coords). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 4. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. p. 183-239.

GODOY, R. C. B.; LEDO, C. A. S.; SANTOS, A. P.; MATOS, E. L. S.; LIMA, A. A.; WASZCZYNSKYJ, N. Diversidade genética entre acessos de maracujazeiro amarelo avaliada pelas características físico-químicas dos frutos. **Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 316, p. 541-547, 2007.

GOEDERT, C. O. Histórico e Avanços em Recursos Genéticos no Brasil. In: NASS, L. L. (Ed). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 23-59.

GOEDERT, W. J.; WAGNER, E.; BARCELLOS, A. O. Savanas Tropicais: dimensão, histórico e perspectivas. In: FALEIRO, F. G.; NETO, A. L. F. (Eds). **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 49-80.

HUGHES, A. R.; INOUE, B. D.; JOHNSON, M. T. J.; UNDERWOOD, N.; VELLEND, M. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**, Paris, v. 11, p. 609-623, 2008.

IBAMA, 2009. Ecossistemas Brasileiros. Cerrado. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm>. Acesso em: 02 fev. 2009.

IBGE, 2004. Mapa de Biomas do Brasil: primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Escala 1: 5.000.000. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm>. Acesso em: 02 fev. 2009.

JUNQUEIRA, K. P. **Características físico-químicas de frutos e variabilidade genética de *Passiflora nitida* Kunth, por meio de RAPD**. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; RAMOS, J. D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base

em marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 571-575, 2007.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-106.

LANGHAMMER, P. F.; BAKARR, M. I.; BENNUN, L. A.; BROOKS, T. M.; CLAY, R. P.; DARWALL, W.; DE SILVA, N.; EDGAR, G. J.; EKEN, G.; FISHPOOL, L. D. C.; FONSECA, G. A. B. DA; FOSTER, M. N.; KNOX, D. H.; MATIKU, P.; RADFORD, E. A.; RODRIGUES, A. S. L.; SALAMAN, P.; SECHREST, W.; TORDOFF, A. W. **Identification and Gap Analysis of Key Biodiversity Areas: Targets for Comprehensive Protected Area Systems**. Gland: IUCN, 2007. 116 p.

MACHADO, R. B.; NETO, R. M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Relatório técnico não publicado. Brasília: Conservação Internacional, 2004. 23 p.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1145–1150, 2006.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S., NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S. M. e ALMEIDA, S. P. (Eds). **CERRADO: ambiente e flora**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1998. p. 286-556.

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

MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES/MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Glossário de Termos para a MOP3/COP8. Disponível em: <http://www.cdb.gov.br/glossario>. Acesso em 22 abr. 2009.

MYERS, M.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NEGREIROS, J. R. S.; BRUCKNER, C. H.; CRUZ, C. D.; ÁLVARES, V. S.; MORGADO, M. A. D.; SIQUEIRA, D. L. Diversidade genética entre progênes de maracujazeiro amarelo baseado em características morfo agronômicas. **Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 312, p. 153-160, 2007.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agronômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá:**

germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 143-158.

PAULA, M. S. **Diversidade Genética e reação de *Passiflora* spp. a *Meloidogyne incognita* e a *Meloidogyne javanica*.** 2006, 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

PEÑALOZA, A. P. S.; POZZOBON, M. T. Caracterização Citogenética de Germoplasma Vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 307-330.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds). **Cerrado: ecologia e flora.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 1, p. 151-199.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food.** Washington, DC: ILSI Press, 2001. 64 p.

RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J. C., RUGGIERO, C.; NOGUEIRA FILHO, G. C.; CENTURION, M. A. P. C.; FERREIRA, F. R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 552-554, 2004.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. **Mapeamento de Cobertura Vegetal do Bioma Cerrado: estratégias e resultados.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 33 p. (Documentos, Nº 190).

SANTOS, F. C. **Caracterização físico-química do fruto e micropropagação do Maracujá-do-sono (*Passiflora setacea* DC.).** 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

SÃO JOSÉ, A. R.; BRUCKNER, C. H.; HOFFMANN, M. In: MANICA, I. (Ed.). **MARACUJÁ: Temas Selecionados (1) Melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. 72 p.

SEGURA, S.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; BOHORQUEZ, A.; OLLITRAULT, P.; TOHME, J. An AFLP diversity study of the genus *Passiflora* focusing on subgenus *Tacsonia*. **Genetic Resources and Crop Evolution,** v. 49, n. 2, p. 111-123, 2002.

SEROA DA MOTTA, R. **The economics of biodiversity in Brazil: the case of forest conversion.** Rio de Janeiro: IPEA, 1996. 21 p.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do cerrado.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 179 p.

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

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic Studies in Some Species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): A Review Emphasizing Brazilian Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 2, p. 247-258, 2008.

VALLS, J. F. M. Caracterização de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 281-305.

VALLS, J. F. M. Recursos Genéticos no Brasil: a visão de melhoristas e de especialistas em recursos genéticos. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/UniPesquisa/Fruta/RecursosGeneticos/RecursosGeneticosTEXTTO.asp>. Acesso em: 01 jun. 2009.

VALOIS, A. C. C. A biodiversidade e os recursos genéticos. In: QUEIRÓZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Eds). **Recursos Genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido/Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. (on line). Disponível em: <http://www.cpatna.embrapa.br>. Acesso em: 24 maio 09.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. (Orgs); GASPAROTTO, C. R.; TOGAWA, R. C.; WERNECK, A. A. (Cols.) Glossário de Recursos Genéticos Vegetais. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/glossario>. Acesso em: 23 jun. 2009.

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 489-493, 2003.

VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, C. A.; MAYEDA, L. Y.; DORNELAS, M. C.; FUNGARO, M. H. P. Estudo do cariótipo e da variabilidade genética detectada por RAPD em espécies de maracujazeiro (*Passiflora* L.). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, supl., n. 3, p. 88, 1997.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma in vitro. **Biotecnologia Ciência & Tecnologia**, Brasília, n. 14, p. 18-20, 2000.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização Química de Metabólitos Secundários em Germoplasma Vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 343-372.

WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B.; BIANCHETTI, L. B. Princípios sobre Coleta de Germoplasma Vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 193-224.

WILSON, E. O. **Biodiversity**. Washington, DC: National Academy Press, 1988. 521 p.

CAPÍTULO I

INFLUÊNCIA DA SAPONIFICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES EM MARACUJÁS DO CERRADO

INFLUÊNCIA DA SAPONIFICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES EM MARACUJÁS DO CERRADO

RESUMO

A composição de carotenóides em frutas é complexa e variável. Por isso, métodos de extração e processos analíticos diferenciados precisam ser aplicados para uma determinação correta dos diferentes carotenóides. A saponificação é um dos métodos utilizados na extração de carotenóides. Em amostras, tais como frutas, a saponificação hidrolisa os ésteres de xantofilas. O objetivo deste estudo foi verificar a influência da saponificação na determinação de carotenóides de cinco acessos de três espécies de *Passiflora* (um acesso de *P. cincinnata*, um acesso de *P. setacea* e três acessos de *P. edulis*). Os carotenóides foram extraídos em acetona, metade deles foram saponificados e separados por HPLC e identificados segundo Rodriguez-Amaya (2001). Foram encontradas diferenças significativas entre as médias das concentrações de carotenóides em amostras saponificadas e não saponificadas. A saponificação hidrolisou os ésteres de *cis*-violaxantina, *trans*-violaxantina e β -criptoxantina, mas provocou perdas de carotenos livres. Porém, a *cis*-violaxantina em *P. edulis* amarelo nativo e a *trans*-violaxantina em *P. cincinnata* ‘redondo’ só foram encontradas nas amostras não saponificadas demonstrando, que nos acessos dessas duas espécies, a saponificação não é necessária. As diferenças significativas entre as médias das concentrações de carotenóides em amostras saponificadas e não saponificadas e a detecção de carotenóides exclusivamente em amostras saponificadas ou em não saponificadas evidenciam a complementaridade dessas metodologias de análise.

Palavras-chave: métodos, *Passiflora*, compostos bioativos

SAPONIFICATION INFLUENCE IN CAROTENOIDS DETERMINATION IN CERRADO PASSIONFRUIT

ABSTRACT

The composition of carotenoids in fruits is complex and variable. Therefore, extraction methods and different analytical procedures must be applied to correct determination of different carotenoids. Saponification is one of methods used in carotenoids extraction. In samples such as fruits, saponification hydrolyses the carotenol esters. The objective of the study was to verify the saponification influence in carotenoids determination of five accessions of three species of *Passiflora* (one *P. cincinnata* accession, one *P. setacea* accession and three *P. edulis* accessions). Carotenoids were extracted in acetone, half of them were saponified and separated by HPLC and identified according Rodriguez-Amaya (2001). Significant differences were found between the means carotenoids concentrations in saponified and not saponified samples. Saponification hydrolyzed *cis*-violaxanthin, *trans*-violaxanthin and β -cryptoxanthin esters but it was harmful for free carotenes. However, *cis*-violaxanthin in *P. edulis* native yellow and *trans*-violaxanthin in *P. cincinnata* 'redondo' only found in not saponified samples showing that in these accessions of two species saponification is not necessary. The differences between the means carotenoids concentrations in saponified and not saponified samples and exclusively detection of carotenoids in saponified or in not saponified samples show the complementarity of these methods of analysis.

Keywords: methods, *Passiflora*, bioactive compounds

1 INTRODUÇÃO

São encontrados mais de 600 carotenóides diferentes na natureza (BRITTON, 1995). Eles são responsáveis pela cor de uma variedade de alimentos vegetais e animais. Diversos estudos têm demonstrado que esses compostos apresentam efeitos benéficos na saúde humana. Assim, é importante conhecer a composição e a concentração dos carotenóides nos alimentos e os fatores relacionados com sua degradação, pois a perda de carotenóides não produz somente mudanças na cor dos alimentos, que varia entre o amarelo e o vermelho, mas também diminui seu valor nutricional (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2004). Embora seja conhecida uma grande diversidade de carotenóides, estes compostos são derivados de uma estrutura básica e são considerados como um grupo que apresenta propriedades físicas e químicas em comum (BRITTON, 1995). A instabilidade dos carotenóides decorre da estrutura da molécula que é altamente insaturada, assim a degradação ocorre principalmente por oxidação, que é estimulada pela presença de oxigênio, metais, enzimas, lipídeos insaturados, pró-oxidantes e condições drásticas de processamento e estocagem, como destruição da ultraestrutura que protege o carotenóide, exposição à luz e uso de temperaturas elevadas. O aquecimento produz principalmente isomerização *cis-trans* (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2004).

A composição de carotenóides em frutas é complexa e variável. Tipicamente existem poucos carotenóides principais e uma série de carotenóides secundários em níveis muito baixos ou até em traços (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004). A análise de carotenóides é dificultada pelo grande número de carotenóides encontrados, baixa concentração nas diferentes partes das plantas, tipo de órgão ou componente da planta analisado, necessitando de métodos de extração adaptados e processos analíticos diferenciados para a identificação e a quantificação de diferentes carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A maioria das xantofilas presentes em frutas maduras está esterificada com ácidos graxos. Entretanto, algumas frutas, particularmente aquelas que permanecem verdes quando maduras, tal como o kiwi, tem pouca ou nenhuma esterificação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A esterificação dos carotenóides parece ser importante para a formação dos cromoplastos, acúmulo e longevidade dos carotenóides e para a

coloração dos tecidos. A forma esterificada é considerada mais estável e mais lipossolúvel (MINGUEZ-MOSQUERA & HORNERO-MENDEZ, 1994).

A saponificação é um método utilizado para romper as ligações dos carotenóides com lipídeos e proteínas e remover a clorofila, os quais podem interferir na separação cromatográfica e diminuir o tempo de uso de uma coluna de cromatografia líquida de alta eficiência. A análise de carotenos ou xantofilas livres não necessita de saponificação. Em frutas, a saponificação hidrolisa os ésteres de xantofilas. Isso simplifica a separação cromatográfica, a identificação e a quantificação, pois são analisadas as xantofilas livres em vez de seus diferentes ésteres. Porém, aumenta o tempo de análise, pode provocar a formação de outros compostos e a degradação dos carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Alguns trabalhos têm o objetivo de determinar tanto os carotenóides livres quanto seus ésteres. Para esse fim são utilizadas amostras saponificadas e não saponificadas. Os trabalhos de Wingerath et al. (1996), Pott et al. (2003), Pintea et al. (2005) e Inbaraj et al. (2008) são exemplos de estudos com esse objetivo. Outros trabalhos utilizam amostras não saponificadas. Para a análise do perfil de carotenóides de folhas verdes não necessita ser realizada a etapa de saponificação, pois as xantofilas não se encontram esterificadas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A busca por novas fontes de substâncias bioativas, tais como flavonóides e carotenóides, tem impulsionado as pesquisas nessa área. O maracujazeiro é uma fruteira nativa do Brasil que tem diversas potencialidades. Mas, sua exploração é baseada principalmente no maracujá-azedo (FALEIRO et al., 2008). Por isso, o interesse pelo estudo das potencialidades de outras espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* tem crescido no país para a expansão e diversificação desse mercado.

Silva & Mercadante (2002) identificaram na polpa de maracujá-amarelo comercial β -criptoxantina, prolicopeno, *cis*- ζ -caroteno, ζ -caroteno, β -caroteno e 13-*cis*- β -caroteno, além de neurosporeno e γ -caroteno em alguns lotes. Porém, estudos sobre a composição de carotenóides nas espécies nativas e silvestres de maracujá são inexistentes. Nesse sentido, ajustes metodológicos e avaliação das etapas utilizadas na determinação de carotenóides são importantes, considerando que são compostos que podem ser facilmente degradados, comprometendo, assim, a sua quantificação.

Neste sentido, objetivou-se, neste trabalho, verificar a influência da saponificação na determinação de carotenóides em cinco acessos de três espécies de

Passiflora (um acesso de *P. cincinnata*, um acesso de *P. setacea* e três acessos de *P. edulis*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Os frutos dos maracujazeiros nativos do Cerrado analisados nesse trabalho foram obtidos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF em março e dezembro de 2008. Os frutos de maracujá-amarelo comercial foram adquiridos em um mercado de Brasília-DF em março de 2008 (Tabela 1.1).

Tabela 1.1- Procedência dos maracujazeiros utilizados neste estudo. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

Nº	Espécie	Nome popular	Procedência	Estado	Código
1	<i>P. cincinnata</i> Mast.	maracujá do Cerrado	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-26-01 (redondo)
2	<i>P. setacea</i> D.C.	maracujá-do-sono	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-12-01 (BRS Pérola do Cerrado)
3	<i>P. edulis</i> Sims. amarelo nativo	maracujá-amarelo	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-36-01
4	<i>P. edulis</i> Sims. roxo nativo	maracujá-roxo	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-21-01
5	<i>P. edulis</i> Sims. amarelo comercial	maracujá-amarelo	Mercado	DF	—

Foram analisados cinco acessos de três espécies de maracujazeiro (um acesso de *P. cincinnata*, um acesso de *P. setacea* e três acessos de *P. edulis*). Todos os frutos utilizados na determinação de carotenóides estavam maduros. Foram coletados somente os frutos dos maracujazeiros nativos que haviam se desprendido da planta-mãe. O estágio de amadurecimento dos frutos de maracujá-amarelo comercial foi determinado pela aparência visual da casca completamente amarela e por observação da polpa solta do pericarpo ao se agitar os frutos. A massa utilizada para a extração de carotenóides variou de acordo com a coloração da polpa, creme até laranja (17,0-60,0 g). Para *P. cincinnata* ‘redondo’ foram usados 25 frutos, entre 21,0-22,0 g de polpa por repetição (4 repetições saponificadas e 4 não saponificadas). Para *P. setacea* foram utilizados 15

frutos, entre 17,0-18,0 g de polpa por repetição (4 repetições saponificadas e 4 não saponificadas). Para *P. edulis* amarelo nativo foram utilizados 23 frutos, entre 43,0-44,0 g de polpa por repetição (4 repetições saponificadas e 4 não saponificadas) e para *P. edulis* roxo nativo foram usados 27 frutos, 60,0 g de polpa por repetição (3 repetições saponificadas e 3 não saponificadas). Para *P. edulis* comercial foram usados 5 frutos, aproximadamente 18,0 g de polpa por repetição (4 repetições saponificadas e 4 não saponificadas). Para a extração da polpa os frutos foram cortados com faca de aço inoxidável e o despulpamento foi realizado com auxílio de uma espátula e peneira plástica.

2.2 Extração de Carotenóides

A extração de carotenóides foi realizada segundo Rodriguez-Amaya (2001). Os carotenóides foram extraídos com acetona gelada em funil de Buchner a vácuo, em ambiente fresco e com luminosidade reduzida. Foi adicionado hyflosupercel (Diacel) para auxiliar a extração e filtragem do extrato e antioxidante BHT (butil hidroxitolueno) em todas as amostras para evitar a degradação dos carotenóides. A extração com acetona foi repetida até a descoloração total do resíduo da polpa. Os carotenóides foram transferidos para o éter etílico, usando um funil de separação. Metade das amostras foram saponificadas com KOH 10% em metanol por uma noite (16 horas) à temperatura ambiente. No dia seguinte foi feita a lavagem do extrato com água destilada até pH neutro (na presença de fenoltaleína) para eliminar o álcali. O éter etílico foi evaporado em evaporador rotativo Tecnal modelo TE-210 (temperatura inferior a 35 °C) até quase *secura*.

O resíduo do extrato foi seco em nitrogênio, diluído com hexano (4 mL), adicionado de BHT e acondicionado em *vial* na ausência de ar, que foi retirado com uma seringa de agulha fina (seringa de insulina). A tampa e o selo do *vial* foram envolvidos com parafilme e o extrato foi mantido sob refrigeração (-20 °C) até o momento da injeção, que foi feito dentro de 7 dias.

2.3 Separação de carotenóides

A separação dos carotenóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) segundo Kimura & Rodriguez-Amaya (2002) e Azevedo-Meleiro &

Rodriguez-Amaya (2004), utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian) equipado com detector de conjunto de diodos (PDA PS-335), bomba (PS-240), injetor (PS-410) e software Galaxie 1.9 para processamento, aquisição e armazenamento dos dados, em ambiente com temperatura controlada (22 ± 01 °C). O preparo das amostras para a injeção no cromatógrafo consistiu na secagem completa do extrato com nitrogênio, adição de acetona grau HPLC (o volume de acetona adicionado variou conforme a coloração do extrato) e filtragem em Millex LCR com membrana PTFE modificada $0,45\ \mu\text{m}$ $13\ \text{mm}$ (Millipore) diretamente em vials. Os carotenóides foram separados em coluna C_{18} ODS-2 $150 \times 4,6\ \text{mm}$, $3\ \mu\text{m}$ de tamanho de partícula (Waters). A fase móvel utilizada foi acetonitrila (contendo 0,05% de trietilamina):metanol:acetato de etila em gradiente de 95:5:0, durante os 20 minutos iniciais da corrida, e 60:20:20 entre 20 e 60 minutos de corrida; o tempo de equilíbrio da coluna foi de 20 minutos. O fluxo utilizado foi $0,5\ \text{mL min}^{-1}$ e o volume de amostra injetado foi $10\ \mu\text{L}$. A solução de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina foi filtrada em membrana PTFE modificado $0,45\ \mu\text{m}$ para eliminação de resíduos.

2.4. Identificação de carotenóides

A identificação dos carotenóides foi realizada através das informações obtidas dos espectros de absorção no UV-visível fornecidos pelo detector de conjunto de diodos, pelo tempo de retenção (t_r), valores de R_f em camada delgada (utilizando éter de petróleo:acetato de etila na proporção 9:3 como fase móvel), co-cromatografia com padrões e por reações químicas específicas (isomerização *cis-trans* catalisada por iodo; rearranjo epóxido-furanóide e redução da carbonila conjugada). Os espectros foram adquiridos entre 500 e 360 nm e os cromatogramas foram processados no comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) de cada carotenóide.

2.5 Quantificação dos carotenóides e obtenção de padrões

Os carotenóides foram quantificados através de curva de calibração externa e fator de correção, conforme Kimura & Rodriguez-Amaya (2002). O padrão de *trans*- β -caroteno foi fornecido pela DSM Nutritional Products (Suíça). Como os carotenóides são altamente instáveis, a concentração do padrão de *trans*- β -caroteno foi confirmada após diluição em hexano e verificação da pureza em HPLC (acima de 95%) e medida da

absorbância (λ_{\max}) em espectrofotômetro de varredura UV-visível Lambda 25, Perkin-Elmer. Os demais padrões foram purificados conforme Rodriguez-Amaya (2001) por cromatografia em coluna aberta de óxido de magnésio (VETEC): hyflosupercel (Diacel) (1:2), a partir da polpa de maracujá-amarelo comercial. Os padrões purificados foram quantificados em espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo lambda 25 a partir das respectivas absorbâncias máximas, utilizando-se os valores de absorvidade tabelados por Davies (1976) e considerando-se a pureza de cada padrão avaliada por HPLC.

Para estocagem, os padrões purificados foram secos em nitrogênio, diluídos em hexano (4 mL), adicionados de BHT e acondicionados em *vial* na ausência de ar, que foi retirado com uma seringa de agulha fina (seringa de insulina). A tampa e o selo do *vial* foram envolvidos com parafilme e os padrões foram mantidos sob refrigeração (-20 °C) até o momento da injeção. Para monitorar a estabilidade do processo de estocagem, padrões de *trans*- β -caroteno foram injetados ao longo de 30 dias. As curvas de calibração foram injetadas dentro de 7 dias.

Foram construídas curvas de calibração dos padrões obtidos a partir da polpa de maracujá-amarelo comercial: *trans*-violaxantina (pureza = 97%; $r = 0,9992$), *cis*-violaxantina (pureza = 99%; $r = 0,9931$), β -criptoxantina (pureza = 86%; $r = 0,9988$), prolicopeno (pureza = 92%), luteína (pureza = 94%; $r = 0,9999$) poli-*cis*- ϵ -caroteno (pureza = 91%; $r = 0,9995$), *trans*- ζ -caroteno (pureza = 97%; $r = 0,9995$) e *trans*- β -caroteno (pureza = 96%; $r = 0,9972$) com 4 a 6 níveis de concentração. O limite inferior de linearidade da curva de calibração foi de $8,2\mu\text{g mL}^{-1}$ e $8,5\mu\text{g mL}^{-1}$ para o *trans*- β -caroteno e para o *trans*- ζ -caroteno, respectivamente. O 13-*cis*- β -caroteno e o *cis*- ζ -caroteno foram quantificados utilizando-se as curvas dos respectivos carotenóides *trans*. Pontos de concentração conhecida de *trans*- β -caroteno foram injetados 2 a 3 vezes por semana durante a determinação de carotenóides das amostras para verificar a reprodutibilidade da resposta obtida e para avaliar o fator de resposta dos diferentes carotenóides.

2.6 Análise de dados

Para avaliação da reprodutibilidade das injeções de *trans*- β -caroteno e a estabilidade do padrão congelado, foi traçada a carta de controle de amplitude móvel (variabilidade).

A comparação dos métodos de extração, com e sem saponificação, foi feita a partir da concentração de cada carotenóide (3-4 repetições). Para a análise dos dados utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5% com auxílio do software SAS versão 9.0 (2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Figura 1.1, o processo de estocagem do *trans*- β -caroteno em hexano (-20 °C) garantiu estabilidade do padrão durante 28 dias; as injeções foram reprodutíveis para concentrações de injeção entre 10 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As injeções não apresentaram reprodutibilidade para concentrações de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (que está abaixo do limite inferior de linearidade da curva: 8,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e para armazenamento de 59 dias.

Foram observadas diferenças significativas entre as médias das concentrações de carotenóides em amostras saponificadas e não saponificadas de frutos de *P. edulis* comercial. Em *P. edulis* roxo nativo, entre os 6 carotenóides encontrados, foram verificadas diferenças significativas em 5 deles. Já em *P. edulis* amarelo nativo, entre os 8 carotenóides encontrados, foram observadas diferenças significativas em 3 deles. Em *P. setacea* a saponificação exerceu efeito significativo nos 3 carotenóides analisados e em *P. cincinnata* a saponificação não apresentou influência (Tabela 1.2).

O β -caroteno foi encontrado em todos os acessos avaliados. Para o β -caroteno, tanto na forma *cis* quanto na forma *trans*, os tratamentos só apresentaram diferença significativa em *P. setacea* (KW = 3,8571; f = 0,0495 para o *trans*- β -caroteno e KW = 5,0000; f = 0,0253 para o 13-*cis*- β -caroteno). A concentração deste caroteno foi maior nas amostras não saponificadas, demonstrando que, para a espécie *P. setacea*, a saponificação pode comprometer o teor de β -caroteno, provocando perdas. Para as outras espécies/acessos, não houve diferença significativa no teor de β -caroteno, em função da saponificação do extrato. O efeito observado pode ser resultado da interação com algum componente pró-oxidante presente na matriz de *P. setacea* (ou mesmo *P. edulis* comercial). Em *P. edulis* comercial não houve diferença significativa (KW = 3,0000; f = 0,0833), provavelmente devido a baixa precisão dos resultados nas amostras saponificadas. No trabalho de Kimura et al. (1990), a saponificação a frio do extrato de carotenóides do mamão, o mesmo método empregado no presente estudo, não influenciou o teor de β -caroteno.

O *cis* e o *trans*- ζ -caroteno foram encontrados nas amostras saponificadas e não saponificadas dos três acessos de *P. edulis*; traços de *cis*- ζ -caroteno também foram encontrados nas amostras não saponificadas de *P. setacea*. Os tratamentos foram significativos em *P. edulis* roxo nativo (KW = 3,8571; f = 0,0495 para a forma *trans*; KW = 3,8571; f = 0,0495 para a forma *cis*) e em *P. edulis* comercial (KW = 5,3976; f = 0,0202 para a forma *trans*; KW = 5,333; f = 0,0209 para a forma *cis*), com perda de ζ -caroteno em função da saponificação dos extratos destes dois acessos. No acesso de *P. edulis* amarelo nativo, entretanto, a saponificação não influenciou o teor de ζ -caroteno.

O poli-*cis*- ϵ -caroteno foi encontrado nas amostras saponificadas e não saponificadas dos acessos de *P. edulis*. Para o poli-*cis*- ϵ -caroteno os tratamentos diferiram nos três acessos de *P. edulis* (KW = 4,5818; f = 0,0323 em *P. edulis* amarelo nativo; KW = 3,8571; f = 0,0495 em *P. edulis* roxo nativo e KW = 5,4634; f = 0,0194 em *P. edulis* comercial). A concentração de poli-*cis*- ϵ -caroteno nos três acessos foi maior nas amostras não saponificadas, indicando perdas durante a saponificação.

O prolicopeno foi encontrado nos três acessos de *P. edulis*, sendo seu teor influenciado pelo processo de saponificação no extrato de *P. edulis* roxo nativo (KW = 3,8571; f = 0,0495) e de *P. edulis* comercial (KW = 5,333; f = 0,0209); nestes extratos a saponificação provocou perdas de prolicopeno. Em *P. edulis* amarelo nativo não houve diferença significativa em função do tratamento.

A β -criptoxantina também foi detectada apenas nos acessos de *P. edulis*. Para a β -criptoxantina os tratamentos também diferiram nos três acessos de *P. edulis* (KW = 4,9412; f = 0,0262 em *P. edulis* amarelo nativo; KW = 4,3548; f = 0,0369 em *P. edulis* roxo nativo e KW = 5,333; f = 0,0209 em *P. edulis* comercial). Ao contrário dos resultados encontrados para os carotenos livres acima, a concentração de β -criptoxantina foi significativamente maior nas amostras saponificadas de *P. edulis* comercial, indicando que este carotenóide encontrava-se predominantemente na forma esterificada. Nos acessos de *P. edulis* amarelo e roxo nativos esse carotenóide só foi encontrado nas amostras saponificadas. No estudo de Konnings & Roomans (1997) a concentração de β -criptoxantina em tangerina foi maior nas amostras saponificadas comparadas com as amostras não saponificadas indicando que parte desse carotenóide encontrava-se esterificado nessa fruta.

A violaxantina foi encontrada apenas nas amostras saponificadas de *P. edulis* comercial, *P. edulis* amarelo nativo e *P. setacea*; a forma *cis* foi encontrada somente nas amostras saponificadas de *P. edulis* comercial e *P. setacea*. Para a *trans*-violaxantina, os

tratamentos diferiram em extratos de *P. edulis* amarelo nativo (KW = 4,8462; f = 0,0277) e de *P. edulis* comercial (KW = 6,0541; f = 0,0139). Para a *cis*-violaxantina, os tratamentos diferiram em extratos de *P. setacea* (KW = 6,1370; f = 0,0132) e de *P. edulis* comercial (KW = 6,0541; f = 0,0139). Entretanto, em *P. cincinnata*, a *trans*-violaxantina foi detectada apenas nas amostras não saponificadas, indicando que esse carotenóide não se encontra esterificado no acesso de *P. cincinnata* estudado e que a saponificação não é necessária nesta espécie.

Em um trabalho sobre a composição de carotenóides em mamão, Cano et al. (1996) verificaram que a saponificação liberou a β -criptoxantina-5,6-epóxido, a violaxantina e a luteína de seus ésteres correspondentes. Depois da saponificação o β -caroteno foi separado e identificado. Segundo o autor, a presença de isômeros *cis* da neoxantina e da violaxantina e pequenas quantidades de licopeno-5,6-epóxido no extrato saponificado de mamão podem ser artefatos do procedimento de saponificação, resultando do rearranjo da violaxantina e do licopeno, respectivamente. Entretanto, no caso das espécies/ acessos de *Passiflora* analisados neste estudo, mesmo os extratos não saponificados já apresentam teores significativos de isômeros *cis*. O ζ -caroteno em extratos não saponificados de acessos nativos de *P. edulis*, por exemplo, ocorreu predominantemente na forma *cis*, indicando a presença destes isômeros na natureza, independente do processo analítico.

A degradação e a perda do conteúdo de carotenóides totais ou de carotenóides individuais durante a saponificação têm sido descritas por diversos autores. Entretanto, essa perda depende das condições da saponificação e da composição da amostra (OLIVER & PALOU, 2000). Khachick et al. (1986) verificaram formação de artefatos e perdas muito elevadas de epoxicarotenóides em brócolis após a saponificação (84% de perda de *trans*-neoxantina, 79% de 9'-*cis*-neoxantina, 56% de violaxantina, 70% de luteína epóxido e 80% de neoluteína epóxido A). Kimura et al (1990) observaram que a saponificação a frio conservou os teores de γ -caroteno, β -apo-8'-carotenal e licopeno, mas promoveu degradação de luteína, zeaxantina e violaxantina em extrato de mamão, sendo este efeito minimizado pelo uso de atmosfera de nitrogênio ou de antioxidante.

Nachtigall (2007) verificou que os extratos saponificados de tagetes apresentaram, em média, maior concentração de luteína, quando comparados aos não saponificados, com redução do teor dos demais carotenóides nas amostras saponificadas.

Conforme demonstrado nos estudos acima, torna-se necessária a avaliação da necessidade de saponificação ou não do extrato para determinação de carotenóides. A saponificação dos extratos de *Passiflora* analisados neste trabalho foi importante para promover a hidrólise de carotenóides hidroxilados, que se encontravam parcialmente ou totalmente esterificados, como a violaxantina e a β -criptoxantina. Entretanto, provocou a degradação parcial de carotenos que encontravam-se na forma livre, como ζ -caroteno, poli-*cis*- ϵ -caroteno, prolicopeno e β -caroteno. Portanto, o uso ou não da saponificação na determinação de carotenóides em espécies de *Passiflora* vai depender do objetivo principal do estudo, se uma avaliação geral de todos os carotenóides, com o uso da saponificação, ou se a determinação de carotenóides com atividade específica, sem uso da saponificação.

Considerando uma avaliação nutricional e funcional associada aos carotenóides, os extratos das espécies *P. cincinnata* e *P. setacea* podem ser obtidos sem saponificação, já que apresentam baixos teores de carotenóides, com predomínio das formas livres. Interessante observar que na polpa de *P. cincinnata*, a violaxantina presente (traços) encontra-se na forma livre e é detectada sem necessidade de saponificação; na polpa de *P. setacea* a violaxantina encontra-se esterificada e não será detectada sem saponificação. Para a espécie *P. edulis*, que apresenta teores mais significativos de carotenóides hidroxilados, incluindo β -criptoxantina, que possui atividade pró-vitamina A, o uso da saponificação torna-se importante. O acesso roxo apresenta quantidades muito baixas de β -criptoxantina; neste caso a saponificação poderia ser omitida. Os carotenóides do acesso amarelo mostraram-se mais resistentes à saponificação, com menores perdas de carotenos. Na análise de carotenóides de *P. edulis* comercial a saponificação acarretou perdas significativas de carotenos livres. Neste último caso, recomendamos a obtenção de extrato não saponificado para análise de carotenos livres e uso de saponificação para a análise de carotenóides esterificados.

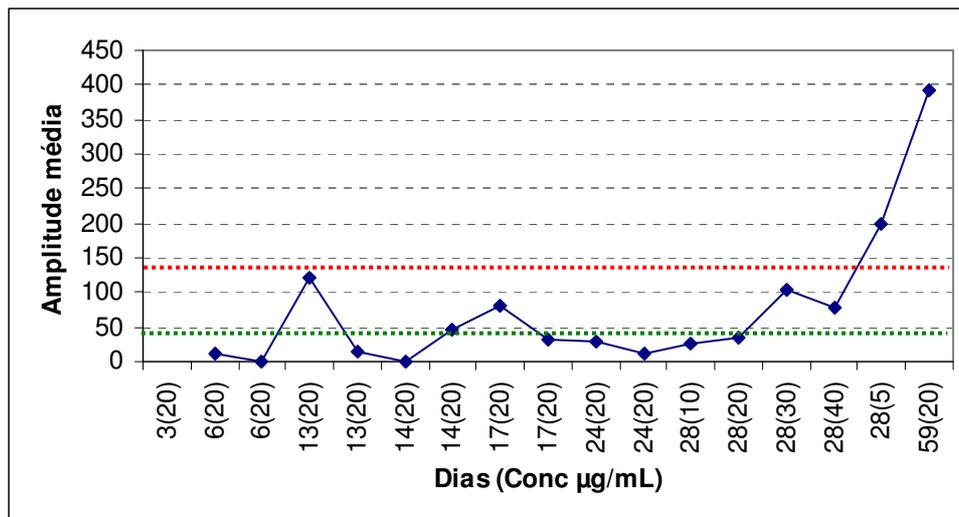


Figura 1.1- Carta de controle de amplitude móvel (variabilidade) para avaliação da reprodutibilidade de injeções de *trans*- β -caroteno. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

Tabela 1.2- Concentração de carotenóides ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras saponificadas e não saponificadas de maracujazeiros. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

Espécies	<i>P. cincinnata</i> 'redondo'		<i>P. setacea</i>		<i>P. edulis</i> amarelo nativo		<i>P. edulis</i> roxo nativo		<i>P. edulis</i> comercial	
	c/ sap ¹	s/ sap ²	c/ sap	s/ sap	c/ sap	s/ sap	c/ sap	s/ sap	c/ sap	s/ sap
Carotenóide	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) Média±DP									
<i>trans</i> -violaxantina	ND	tr	tr	ND	0,50±0,05a	0,0±0,0b	ND	ND	0,5±0,1a	0,0±0,0b
<i>cis</i> -violaxantina	ND	ND	0,20±0,06a	0,0±0,0b	ND	ND	ND	ND	1,2±0,2a	0,0±0,0b
β -criptoxantina	ND	ND	ND	ND	0,24±0,02a	0,0±0,0b	0,20±0,03a	0,0±0,0b	1,8±0,2a	0,4±0,2b
prolicopeno	ND	ND	ND	ND	3,0±0,2a	3,03±0,08a	5,3±0,2a	5,9±0,5b	0,31±0,18a	0,87±0,09b
poli- <i>cis</i> - ϵ -caroteno	ND	ND	ND	ND	1,20±0,03a	1,3±0,1b	3,07±0,15a	3,4±0,2b	0,8±0,1a	1,27±0,06b
<i>cis</i> - ζ -caroteno	ND	ND	ND	Tr	6,3±0,2a	6,20±0,25a	10,72±0,42a	12,1±0,7b	1,0±0,3a	2,0±0,1b
<i>trans</i> - ζ -caroteno	ND	ND	ND	ND	5,4±0,2a	5,40±0,28a	9,94±0,36a	10,9±0,3b	1,1±0,2a	2,3±0,1b
<i>trans</i> - β -caroteno	0,06±0,00a	0,06±0,00a	0,40±0,07a	0,70±0,09b	2,80±0,06a	2,79±0,18a	2,39±0,09a	2,6±0,1a	5,9±1,7a	7,8±0,8a
13- <i>cis</i> - β -caroteno	ND	ND	0,0±0,0a	0,08±0,00b	0,40±0,03a	0,38±0,08a	tr	tr	0,29±0,07a	0,37±0,02a

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

¹c/ sap: com saponificação. ²s/ sap: sem saponificação.

ND: não detectado. tr: traços.

4 CONCLUSÕES

A saponificação interferiu na determinação da maioria dos carotenóides presentes em *Passiflora*, permitindo a liberação de carotenóides esterificados, como a violaxantina nos acessos comercial e amarelo nativo de *P. edulis*. Porém, em *P. cincinnata* esse carotenóide encontrava-se na forma livre, dispensando o uso da saponificação. A *cis*-violaxantina também foi detectada na forma livre em *P. edulis* amarelo nativo. Entretanto, a saponificação favoreceu a degradação de carotenos como o β -caroteno (*P. setacea*), o ζ -caroteno e o prolicopeno (*P. edulis* roxo e comercial) e o poli-*cis*- ϵ -caroteno (nos três acessos de *P. edulis*).

As diferenças significativas entre as médias das concentrações de carotenóides em amostras saponificadas e não saponificadas e a detecção de carotenóides exclusivamente em amostras saponificadas ou em não saponificadas evidenciam a complementaridade dessas metodologias de análise.

5 AGRADECIMENTOS

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

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Journal of Food Composition and Analysis**, Rome, v. 17, p. 385-396, 2004.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, p. 1551-1558, 1995.

CANO, M. P.; ANCOS, B.; LOBO, M. G.; MONREAL, M. Carotenoid Pigments and Colour of Hermaphrodite and Female Papaya Fruits (*Carica papaya* L.) cv Sunrise During Post-Harvest Ripening. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 71, p. 351-358, 1996.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T. W. (Ed). **Chemistry and Biochemistry of plant pigments**. 2. ed. London: Academic Press, v. 2, p. 38-165, 1976.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Pesquisa e desenvolvimento do maracujá no Brasil. In: SILVA, A. G.; ALBUQUERQUE, A. C. S.; MANZANO, N. T.; SILVA, R. C.; RUSSELL, N. C. (Eds). **Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas**. Brasília: Embrapa, 2008.

INBARAJ, B. S.; LU, H.; HUNG, C. F.; WU, W. B.; LIN, C. L.; CHEN, B. H. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–APCI–MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 812-818, 2008.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; WHITAKER, N. F. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v. 34, p. 603-616, 1986.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; GODOY, H. T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. **Food Chemistry**, Norwich, v. 35, n. 3, p. 187-195, 1990.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chemistry**, Norwich, v. 78, p. 389-398, 2002.

KONNINGS, E. J. M.; ROOMANS, H. H. S. Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruit. **Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 599-603, 1997.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 2, p. 209-215, 2004.

MINGUEZ-MOSQUERA, M. I.; HORNERO-MENDEZ, D. Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annum* cv. Bola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v. 42, p. 640–644. 1994.

NACHTIGALL, A. M. **Extração, saponificação e atividade antioxidante de luteína obtida de flores de *Tagetes patula* L. e *Calendula officinalis* L.** 2007. 100 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 543–555, 2000.

PINTEA, A.; VARGA, A.; STEPNOWSKI, P.; SOCACIU, C.; CULEA, M.; DIEHL, H. A. Chromatographic Analysis of Carotenol Fatty Acid Esters in *Physalis alkekengi* and *Hippophae rhamnoides*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 188–195, 2005.

POTT, I.; BREITHAUPT, D. E.; CARLE, R. Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Kent'). **Phytochemistry**, v. 64, p. 825–829, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. Washington DC: International Life Sciences Institute Press, 2001. 64 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; M. KIMURA. **HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis**. HarvestPlus Technical Monographs, v. 2. IFPRI and CIAT: Washington DC and Cali, 2004. 58 p.

SAS INSTITUTE INC. 2002. **SAS/STAT user's guide. Version 9.0**. SAS Institute, North Caroline, Cary. 2002.

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

WINGERATH, T.; STAHL, W.; KIRSCH, D.; KAUFMANN, R.; SIES, H. Fruit Juice Carotenol Fatty Acid Esters and Carotenoids As Identified by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v. 44, p. 2006-2013, 1996.

CAPÍTULO II

ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CAROTENÓIDES EM MARACUJÁS DO CERRADO

ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CAROTENÓIDES EM MARACUJÁS DO CERRADO

RESUMO

O Cerrado tem uma biodiversidade riquíssima. O maracujazeiro é uma fruteira nativa do Cerrado que é muito consumida *in natura* e utilizada no preparo de doces, sucos e sorvetes e como planta medicinal. As frutas e os vegetais são as fontes principais de carotenóides na dieta humana. A ação de vários carotenóides no organismo deve-se a atividade pró-vitamina A que alguns possuem e ao potencial antioxidante de outros. O objetivo do presente estudo foi avaliar a composição qualitativa e quantitativa de carotenóides da polpa de oito acessos de quatro espécies de maracujás do Cerrado (dois acessos de *P. cincinnata*, um acesso de *P. nitida*, um acesso de *P. setacea* e quatro acessos de *P. edulis*) com potencial agrônômico utilizando, como referência, o maracujá-amarelo comercial (*P. edulis*). Os carotenóides foram extraídos em acetona, metade deles foram saponificados e separados por HPLC e identificados segundo Rodriguez-Amaya (2001). As polpa dos frutos dos maracujazeiros analisados apresentaram neoxantina, violaxantina, *cis*-violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, poli-*cis*- ϵ -caroteno, prolicopeno, *cis*- ζ -caroteno, *trans*- ζ -caroteno, *trans*- β -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno e fitoflueno. A espécie que apresentou o maior número de carotenóides foi *P. edulis*. Os acessos de *P. edulis* que apresentaram o maior número de carotenóides foram os dois acessos comerciais, seguidos pelo acesso amarelo nativo e roxo nativo e pela espécie *P. setacea*. Os dois acessos de *P. cincinnata*, que possuem polpa creme, apresentaram teor bastante reduzido de carotenóides. A espécie *P. nitida*, de polpa branca, apresentou apenas traços de *trans*- β -caroteno e de anteraxantina. Em geral, os teores de carotenóides entre as espécies e entre os acessos da mesma espécie foram significativamente diferentes. Entre os dois acessos de *P. edulis* comercial foi encontrada uma inversão no carotenóide principal, em um deles o *trans*- β -caroteno foi o carotenóide principal ($7,8 \pm 0,8 \mu\text{g g}^{-1}$) e em outro foi o *trans*- ζ -caroteno ($11,4 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$). Nos dois acessos nativos de *P. edulis*, o *cis*- ζ -caroteno foi o carotenóide majoritário ($6,28 \pm 0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ e $12,1 \pm 0,7 \mu\text{g g}^{-1}$, *P. edulis* amarelo e *P. edulis* roxo, respectivamente). Os maiores valores de pró-vitamina A foram encontrados nos dois acessos comerciais de *P. edulis* ($30,25 \pm 1,06$ e $65,4 \pm 4,9 \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ RAE). Houve variação na composição qualitativa e quantitativa de carotenóides

entre as espécies e acessos de *Passiflora* analisados. Devem-se aprofundar as pesquisas sobre frutas nativas do Cerrado visto que a caracterização do perfil de carotenóides em frutos de espécies de maracujá com potencial agrônomo pode agregar valor ao produto e estimular o seu consumo.

Palavras-chave: *Passiflora*, composição bioquímica, compostos bioativos, recursos genéticos

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF CAROTENOIDS IN CERRADO PASSION FRUIT

ABSTRACT

Cerrado has a rich biodiversity. The passion fruit is a native fruit of Cerrado that is much consumed in nature and used in jams, juices and ice creams preparations and like medicinal plant. Fruits and vegetables are the main sources of carotenoids in human diet. The action of carotenoids in the body due to the pro-vitamin A activity that some have and antioxidant potential of others. The objective of this study was evaluate qualitative and quantitative carotenoids composition of eight accessions of four cerrado passion fruit species (two *P. cincinnata* accessions, one *P. nitida* accession, one *P. setacea* accession and four *P. edulis* accessions) with agronomic potential, using commercial passion fruit as reference. Carotenoids were extracted in acetone, half of them were saponified, separated by HPLC and identified according Rodriguez-Amaya (2001). Were identified in analyzed passion fruit neoxanthin, violaxanthin, *cis*-violaxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, prolycopene, poli-*cis*- ϵ -carotene, *cis*- ζ -carotene, *trans*- ζ -carotene, *trans*- β -carotene, 13-*cis*- β -carotene and phytofluene. The specie that showed greater number of carotenoids was commercial passion fruit (*P. edulis*). The *P. edulis* accessions that showed greater number of carotenoids were two commercial accessions followed by *P. edulis* native yellow, *P. edulis* native purple and the specie *P. setacea*. *P. cincinnata* accessions showed very low levels of carotenoids. *P. nitida* showed only traces of *trans*- β -carotene and antheraxanthin. In general, carotenoids content were significantly different among the species and among accessions of the same specie. Among the two accessions of commercial *P. edulis* was a reversal in the major carotenoid in one of them *trans*- β -carotene was the major carotenoid ($7.8 \pm 0.8 \mu\text{g g}^{-1}$) and another was *trans*- ζ -carotene ($11.4 \pm 0.4 \mu\text{g g}^{-1}$). In both *P. edulis* native accessions *cis*- ζ -carotene was the major carotenoid ($6.28 \pm 0.15 \mu\text{g g}^{-1}$ and $12.1 \pm 0.7 \mu\text{g g}^{-1}$, yellow *P. edulis* and purple *P. edulis*, respectively). The highest values of pro-vitamin A were found in commercial accessions of *P. edulis* (30.3 ± 1.0 and $65.4 \pm 4.9 \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ RAE). There was variation in qualitative and quantitative carotenoids composition among analyzed species and accessions of *Passiflora*. It should be further research about native fruits of Cerrado as

the characterization of the carotenoids profile in fruits of passion fruit species with agronomic potential can add value to products and encourage consumption.

Keywords: *Passiflora*, biochemistry composition, bioactive compounds, genetic resources

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado apresenta uma biodiversidade riquíssima, porém tem sido destruído em um ritmo muito acelerado causado, dentre outros fatores, pela sua ocupação desenfreada. Devido à diversidade pouco explorada e ainda pouco conhecida pela ciência, sua caracterização e uso sustentável é um campo promissor para a pesquisa. Muitas espécies do Cerrado têm usos múltiplos, característica favorável ao aproveitamento comercial (AQUINO et al., 2008; JUNQUEIRA et al., 2008), sendo exemplos os atrativos sensoriais como cor, sabor e aromas exóticos e intensos que podem ser aproveitados e utilizados pelas indústrias alimentícias e de cosméticos (AGOSTINI-COSTA & VIEIRA, 2004). Ainda hoje, a exploração de muitas das plantas do Cerrado é feita de forma extrativista (ALMEIDA, 1998). A partir dos conhecimentos adquiridos sobre o Cerrado torna-se importante a valoração e conseqüentemente sua conservação.

O maracujazeiro é uma fruteira nativa do Cerrado que é muito consumida *in natura* e utilizada no preparo de doces, sucos e sorvetes e como planta medicinal. Existem várias espécies de maracujá no Cerrado e pelo menos cinco delas são chamadas de maracujá do cerrado (BRAGA et al., 2006). Porém, a grande diversidade de espécies encontrada é muitas vezes subutilizada pela falta de conhecimento das diversas potencialidades que várias delas possuem, embora o país seja o seu principal centro de distribuição geográfica (FALEIRO et al., 2006). Apesar do grande número de espécies, os cultivos comerciais são baseados somente no maracujá-amarelo ou azedo (*P. edulis*), representando 95% dos pomares. Em menor escala, com importância bastante regionalizada e comercialização restrita, são cultivados o maracujá-doce (*P. alata*), o maracujá-roxo (*P. edulis*), o maracujá-melão (*P. quadrangularis*), o maracujá-suspiro (*P. nitida*) e o maracujá-tubarão (*P. cincinnata*) (MELETTI et al., 2005).

Devido ao clima tropical e subtropical, os países destas regiões tropicais têm uma ampla variedade de fontes carotenogênicas, ou seja, um grande número de espécies de plantas que podem ser consideradas boas fontes de carotenóides em estado selvagem, pouco domesticado, ou domesticado. O Brasil tem um grande número de espécies ricas em carotenóides. No Cerrado, é possível citar o buriti, o pequi (RODRIGUEZ-AMAYA, 2000; AGOSTINI-COSTA & VIEIRA, 2004) e o araticum também conhecido como marolo (AGOSTINI-COSTA et al., 1996). Entretanto, grande parte destes recursos não têm sido analisados ou ainda encontram-se em estágio pouco

desenvolvido. Por isso, a análise de carotenóides em espécies nativas desses países é urgente e desafiadora (RODRIGUEZ-AMAYA, 2000).

Estima-se que a natureza produza aproximadamente 100 milhões de toneladas de carotenóides anualmente (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Esses pigmentos acumulam-se em cromoplastos em folhas, flores, frutos, raízes e sementes, com coloração variando entre o amarelo-claro, o alaranjado e o vermelho (VIEIRA & AGOSTINI-COSTA, 2007). Os carotenóides têm um papel muito importante na fotossíntese, auxiliando a captação de energia luminosa e promovendo proteção contra a fotooxidação (BRITTON, 1995a).

As frutas e os vegetais são as fontes principais de carotenóides na dieta humana. Embora sejam conhecidos mais de 600, somente 40 deles estão presentes nessa dieta (RAO & RAO, 2007). Uma das ações dos carotenóides no organismo deve-se a atividade pró-vitamina A, que alguns possuem, após a conversão no intestino. Outros carotenóides estão associados à redução do desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas devido ao potencial antioxidante de alguns pela capacidade de seqüestrar o oxigênio singlete e reagir com radicais livres (BRITTON, 1995a). Alguns carotenóides também agem pela modulação do metabolismo carcinógeno, aumento da resposta imune, inibição da proliferação celular, incremento da diferenciação celular, estímulo da comunicação célula-célula e filtração de luz azul (SENTANIN & RODRIGUEZ-AMAYA, 2007). Sabe-se que a composição de carotenóides de alimentos varia tanto qualitativa quanto quantitativamente (AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004).

Estudos sobre a composição de carotenóides já foram realizados em maracujá-amarelo e roxo comerciais. Leuenberger & Thommen (1972) encontraram no suco pasteurizado de *P. edulis* Sims (maracujá-roxo) β -caroteno, ζ -caroteno, fitoflueno, β -apo-12'-carotenal, β -apo-8'-carotenal, criptoxantina, auroxantina e mutatoxantina. O β -caroteno, o ζ -caroteno e o fitoflueno foram encontrados em várias partes da fruta, assim como no suco congelado e pasteurizado. Cecchi & Rodriguez-Amaya (1981) fizeram a separação dos carotenóides do suco processado de maracujá-amarelo comercial por CCA e quantificaram o ζ -caroteno como carotenóide principal, além de α -caroteno, β -caroteno, *cis*-neurosporeno, neurosporeno, γ -caroteno, licopeno, aurocromo, criptocromo e auroxantina nas duas marcas de suco.

Mercadante et al. (1998) identificaram os carotenóides de maracujá-amarelo comercial *in natura* por EM complementada por espectrofotometria no UV-visível, co-

cromatografia e para o licopeno RMN, porém não realizaram a quantificação. Os carotenóides identificados foram fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno, β -caroteno, licopeno, prolicopeno, mutacromo, β -criptoxantina, β -citaurina, anteraxantina, violaxantina e neoxantina. Essa técnica não permitiu a identificação dos isômeros dos carotenóides. Silva & Mercadante (2002) realizaram a separação dos carotenóides da polpa de maracujá-amarelo comercial por HPLC encontrando β -criptoxantina, prolicopeno, *cis*- ζ -caroteno, ζ -caroteno, β -caroteno e 13-*cis*- β -caroteno, além de traços de neurosporeno e γ -caroteno em alguns lotes de frutos de maracujá. Contudo, ainda não existem tais estudos em espécies nativas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a composição qualitativa e quantitativa de carotenóides da polpa de oito acessos de quatro espécies de maracujás do Cerrado (dois acessos de *P. cincinnata*, um acesso de *P. nitida*, um acesso de *P. setacea* e quatro acessos de *P. edulis*) com potencial agrônômico, utilizando, como referência, o maracujá-amarelo comercial (*P. edulis*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Os frutos dos maracujazeiros nativos analisados nesse trabalho foram obtidos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF em março e dezembro de 2008. Os frutos de maracujá-amarelo comercial foram adquiridos em um mercado de Brasília-DF em novembro de 2007 e março de 2008 (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Procedência dos maracujazeiros utilizados neste estudo. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

Nº	Espécie	Nome popular	Procedência	Estado	Código
1	<i>P. cincinnata</i> Mast.	maracujá do Cerrado	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-26-01 (redondo)
2	<i>P. cincinnata</i> Mast.	maracujá do Cerrado	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-26-02 (cabaça)
3	<i>P. nitida</i> Kunth	maracujá-suspiro	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-01-03
4	<i>P. setacea</i> D.C.	maracujá-do-sono	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-12-01 (BRS Pérola do Cerrado)
5	<i>P. edulis</i> Sims. amarelo nativo	maracujá-amarelo	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-36-01
6	<i>P. edulis</i> Sims. roxo nativo	maracujá-roxo	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-21-01
7	<i>P. edulis</i> Sims. amarelo comercial	maracujá-amarelo	Mercado	DF	–
8	<i>P. edulis</i> Sims. amarelo comercial	maracujá-amarelo	Mercado	DF	–

Foram analisados oito acessos de quatro espécies de maracujazeiros (dois acessos de *P. cincinnata*, um acesso de *P. nitida*, um acesso de *P. setacea* e quatro acessos de *P. edulis*). Todos os frutos utilizados na determinação de carotenóides estavam maduros. Foram coletados somente os frutos dos maracujazeiros nativos que haviam se desprendido da planta-mãe. O estágio de amadurecimento dos frutos de maracujá-amarelo comercial foi determinado pela aparência visual da casca completamente amarela e por observação da polpa solta do pericarpo ao se agitar os frutos. A massa utilizada para a extração de carotenóides variou de acordo com a coloração da polpa, laranja até incolor (17,0-249,0 g). Para *P. cincinnata* acesso ‘redondo’ foram usados 25 frutos, entre 21,0-22,0 g de polpa por repetição (4 repetições saponificadas e 4 não saponificadas) e para *P. cincinnata* acesso ‘cabaça’ foram utilizados 9 frutos, entre 32,0-33,0 g de polpa por repetição (1 repetição saponificada e 1 não saponificada). Para um acesso de *P. edulis* comercial, chamando de a, foram usados 5 frutos, entre 19,0-20,0 g de polpa por repetição (3 repetições saponificadas e 3 não saponificadas). Para o outro acesso de *P. edulis* comercial, chamado de b, foram usados 5 frutos, aproximadamente 18,0 g de polpa por repetição (4 repetições saponificadas e 4 não saponificadas). Para *P. edulis* amarelo nativo foram utilizados 23 frutos, entre 43,0-44,0 g de polpa por repetição (4 repetições saponificadas e 4 não

saponificadas) e para *P. edulis* roxo nativo foram usados 27 frutos, 60,0 g de polpa por repetição (3 repetições saponificadas e 3 não saponificadas). Para *P. nitida* foram utilizados 42 frutos obtendo-se 249,0 g de polpa (1 repetição saponificada). Para *P. setacea* foram utilizados 15 frutos, entre 17,0-18,0 g de polpa por repetição (4 repetições saponificadas e 4 não saponificadas). Para a extração da polpa os frutos foram cortados com faca de aço inoxidável e o despulpamento foi realizado com auxílio de uma espátula e peneira plástica.

2.2 Extração de Carotenóides

A extração de carotenóides foi realizada segundo Rodriguez-Amaya (2001). Os carotenóides foram extraídos com acetona gelada em funil de Buchner a vácuo, em ambiente fresco e com luminosidade reduzida. Foi adicionado hyflosupercel (Diacel) para auxiliar a extração e filtragem do extrato e antioxidante BHT (butil hidroxitolueno) em todas as amostras para evitar a degradação dos carotenóides. A extração com acetona foi repetida até a descoloração total do resíduo da polpa. Os carotenóides foram transferidos para o éter etílico, usando um funil de separação. Metade das amostras foram saponificadas com KOH 10% em metanol por uma noite (16 horas) à temperatura ambiente. No dia seguinte foi feita a lavagem do extrato com água destilada até pH neutro (na presença de fenolftaleína) para eliminar o álcali. O éter etílico foi evaporado em evaporador rotativo Tecnal modelo TE-210 (temperatura inferior a 35 °C) até quase *secura*.

O resíduo do extrato foi seco em nitrogênio, diluído com hexano (4 mL), adicionado de BHT e acondicionado em *vial* na ausência de ar, que foi retirado com uma seringa de agulha fina (seringa de insulina). A tampa e o selo do *vial* foram envolvidos com parafilme e o extrato foi mantido sob refrigeração (-20 °C) até o momento da injeção, que foi feito dentro de 7 dias.

2.3 Separação de carotenóides

A separação dos carotenóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) segundo Kimura & Rodriguez-Amaya (2002) e Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2004), utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian) equipado com detector de conjunto de diodos (PDA PS-335), bomba (PS-240),

injetor (PS-410) e software Galaxie 1.9 para processamento, aquisição e armazenamento dos dados, em ambiente com temperatura controlada (22 ± 01 °C). O preparo das amostras para a injeção no cromatógrafo consistiu na secagem completa do extrato com nitrogênio, adição de acetona grau HPLC (o volume de acetona adicionado variou conforme a coloração do extrato) e filtração em Millex LCR com membrana PTFE modificada 0,45 μ m 13mm (Millipore) diretamente em vials. Os carotenóides foram separados em coluna C₁₈ ODS-2 150 x 4,6 mm, 3 μ m de tamanho de partícula (Waters). A fase móvel utilizada foi acetonitrila (contendo 0,05% de trietilamina):metanol:acetato de etila em gradiente de 95:5:0, durante os 20 minutos iniciais da corrida, e 60:20:20 entre 20 e 60 minutos de corrida; o tempo de equilíbrio da coluna foi de 20 minutos. O fluxo utilizado foi 0,5 mL min⁻¹ e o volume de amostra injetado foi 10 μ L. A solução de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina foi filtrada em membrana PTFE modificado 0,45 μ m para eliminação de resíduos.

2.4. Identificação de carotenóides

A identificação dos carotenóides foi realizada através das informações obtidas dos espectros de absorção no UV-visível fornecidos pelo detector de conjunto de diodos, pelo tempo de retenção (tr), valores de Rf em camada delgada (utilizando éter de petróleo:acetato de etila na proporção 9:3 como fase móvel), co-cromatografia com padrões e por reações químicas específicas (isomerização *cis-trans* catalisada por iodo; rearranjo epóxido-furanóide e redução da carbonila conjugada). Os espectros foram adquiridos entre 500 e 360 nm e os cromatogramas foram processados no comprimento de onda máximo de absorção (λ_{\max}) de cada carotenóide.

2.5 Quantificação dos carotenóides e obtenção de padrões

Os carotenóides foram quantificados através de curva de calibração externa e fator de correção, conforme Kimura & Rodriguez-Amaya (2002). O padrão de *trans*- β -caroteno foi fornecido pela DSM Nutritional Products (Suíça). Como os carotenóides são altamente instáveis, a concentração do padrão de β -caroteno foi confirmada após diluição em hexano e verificação da pureza em HPLC (acima de 95%) e medida da absorvância (λ_{\max}) em espectrofotômetro de varredura UV-visível Lambda 25, Perkin-Elmer. Os demais padrões foram purificados conforme Rodriguez-Amaya (2001) por

cromatografia em coluna aberta de óxido de magnésio (VETEC): hyflosupercel (Diacel) (1:2), a partir da polpa de maracujá-amarelo comercial. Os padrões purificados foram quantificados em espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo lambda 25 a partir das respectivas absorbâncias máximas, utilizando-se os valores de absorvidade tabelados por Davies (1976) e considerando-se a pureza de cada padrão avaliada por HPLC.

Para estocagem, os padrões purificados foram secos em nitrogênio, diluídos em hexano (4 mL), adicionados de BHT e acondicionados em *vial* na ausência de ar, que foi retirado com uma seringa de agulha fina (seringa de insulina). A tampa e o selo do *vial* foram envolvidos com parafilme e os padrões foram mantidos sob refrigeração (-20 °C) até o momento da injeção. Para monitorar a estabilidade do processo de estocagem, padrões de *trans*- β -caroteno foram injetados ao longo de 30 dias. As curvas de calibração foram injetadas dentro de 7 dias.

Foram construídas curvas de calibração dos padrões obtidos a partir da polpa de maracujá-amarelo comercial: *trans*-violaxantina (pureza = 97%; $r = 0,9992$), *cis*-violaxantina (pureza = 99%; $r = 0,9931$), β -criptoxantina (pureza = 86%; $r = 0,9988$), prolicopeno (pureza = 92%), luteína (pureza = 94%; $r = 0,9999$) poli-*cis*- ϵ -caroteno (pureza = 91%; $r = 0,9995$), *trans*- ζ -caroteno (pureza = 97%; $r = 0,9995$) e *trans*- β -caroteno (pureza = 96%; $r = 0,9972$) com 4 a 6 níveis de concentração. O limite inferior de linearidade da curva de calibração foi de $8,2\mu\text{g mL}^{-1}$ e $8,5\mu\text{g mL}^{-1}$ para o *trans* β -caroteno e para o *trans*- ζ -caroteno, respectivamente. O 13-*cis*- β -caroteno e o *cis*- ζ -caroteno foram quantificados utilizando-se as curvas dos respectivos carotenóides *trans*. Pontos de concentração conhecida de *trans*- β -caroteno foram injetados 2 a 3 vezes por semana durante a determinação de carotenóides das amostras para verificar a reprodutibilidade da resposta obtida e para avaliar o fator de resposta dos diferentes carotenóides.

2.6 Cálculo do valor de vitamina A

O valor de vitamina A foi calculado a partir dos novos fatores de conversão de carotenóides pró-vitamínicos A publicados pelo U. S. Institute of Medicine e disponibilizados por West et al. (2002) e Campos & Rosado (2005), utilizando o *trans*- β -caroteno como referência, onde cada equivalente de atividade de retinol (RAE) corresponde a $1\mu\text{g}$ de retinol ou $12\mu\text{g}$ de β -caroteno ou $24\mu\text{g}$ de outros carotenóides pró-vitamínicos.

2.7 Análise dos Dados

Foi realizada a comparação da concentração dos carotenóides e dos valores de vitamina A entre os acessos (3-4 repetições). Para a análise dos dados utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5% com auxílio do software SAS versão 9.0 (2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram identificados 14 carotenóides na polpa dos frutos dos maracujazeiros: neoxantina, *trans*-violaxantina, *cis*-violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, prolicopeno, *cis*- ζ -caroteno, *trans*- ζ -caroteno, *trans*- β -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno, fitoflueno e poli-*cis*- ϵ -caroteno (Tabela 2.2).

O fitoflueno foi identificado conforme estabelecido (BRITTON, 1995b; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001), de acordo com a ordem de eluição e tempo de retenção no HPLC e pela estrutura fina típica deste carotenóide em região de menor comprimento de onda (pico em 347nm), consistente com carotenóides acíclicos com cinco duplas ligações conjugadas.

O β -caroteno foi o carotenóide predominante de alguns acessos de maracujá. Sua estrutura foi confirmada pelo resultado da eluição em camada delgada e em HPLC, pela região de máxima absorção (454 nm) e pelo perfil da estrutura fina (III/II=25), conforme comportamento exibido pelo padrão de *trans*- β -caroteno e informações fornecidas pela literatura (BRITTON, 1995b; AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004). A presença de isômero *cis*- foi confirmada pela reação de isomerização com iodo.

O ζ -caroteno foi o carotenóide predominante em alguns acessos de maracujá; apresentou um perfil de eluição em camada delgada e em HPLC consistente com carotenóides não hidroxilados. O espectro apresentou picos de absorção muito bem definidos em 400 e em 242 nm, com estrutura fina III/II (103) conforme padrão de ζ -caroteno e literatura disponível (DAVIES, 1976; BRITTON, 1995b; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). O isômero *cis*- foi confirmado pela reação de isomerização com iodo.

O poli-*cis*- ϵ -caroteno apresentou reação negativa para ceto e apo-carotenóides. Apresentou absorção máxima em 432 nm, com desvio batocrômico de 5 nm após reação de isomerização com iodo e perfil de estrutura fina similar ao ϵ -caroteno (III/II=60)

após reação de isomerização com iodo, consistente com poli-*cis*- ϵ -caroteno, conforme Davies (1976). A estrutura do poli-*cis*- ϵ -caroteno purificado (1 mg) não foi conclusivamente identificada por ressonância magnética nuclear (RMN) em função da baixa sensibilidade dos equipamentos disponíveis em Brasília e em Fortaleza.

A β -criptoxantina foi identificada pelo comportamento cromatográfico característico de carotenóide monidroxilado em camada delgada e em HPLC e por co-cromatografia com padrão. Também foi identificada pela absorção máxima a 452 nm e pela estrutura fina do espectro ($III/II = 25$) fornecido pelo detector de arranjo de diodos.

A luteína e a zeaxantina foram identificadas pelo comportamento cromatográfico característico de carotenóide diidroxilado em camada delgada e em HPLC e por co-cromatografia com padrão; adicionalmente foram identificadas pela absorção máxima a 446 e a 452 nm, respectivamente, e pela estrutura fina do espectro ($III/II = 60$ e 25 , respectivamente) fornecida pelo detector de arranjo de diodos, conforme comportamento de padrões e dados da literatura (AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004).

A violaxantina e a anteraxantina foram identificadas pelo comportamento cromatográfico característico de carotenóide diidroxilado em camada delgada e em HPLC e por co-cromatografia com padrão. Absorção máxima a 439 e a 446 nm, respectivamente, e estrutura fina do espectro ($III/II = 98$ e 60 , respectivamente) fornecida pelo detector de arranjo de diodos, conforme comportamento de padrões e dados da literatura. A confirmação foi feita pela reação de epóxido em meio ácido, com formação de spot azul característico (violaxantina) e verde (anteraxantina) em camada delgada, e com deslocamento de cerca de 40 e 20 nm, respectivamente, após reação com ácido (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004).

A neoxantina apresentou comportamento cromatográfico característico de carotenóide triidroxilado em camada delgada e em HPLC. Absorção máxima a 443 nm e estrutura fina do espectro ($III/II = 87$) conforme dados da literatura. A confirmação de um grupo 5,6-epóxi foi feita pela observação de spot verde característico em camada delgada e com deslocamento de cerca de 20 nm após reação com ácido.

A espécie que apresentou o maior número de carotenóides foi *P. edulis*. Os acessos de *P. edulis* que apresentaram o maior número de carotenóides foram os dois acessos comerciais (13 carotenóides, Figuras 2.1A-B) seguidos pelos acessos amarelo nativo (8 a 10 carotenóides, Figura 2.2A-B) e roxo nativo (9 carotenóides, Figura 2.3A).

Na espécie *P. setacea* foram encontrados 7 carotenóides (Figura 2.3B). Os dois acessos de *P. cincinnata*, que possuem polpa creme, apresentaram teor bastante reduzido de carotenóides (Tabela 2.3). Em *P. cincinnata* ‘cabaça’ foram encontrados neoxantina, *trans*-violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina e *trans*- β -caroteno. Já no acesso ‘redondo’ foram encontrados os mesmos carotenóides, com exceção da neoxantina (Figura 2.4). A espécie *P. nitida*, de polpa branca, apresentou apenas traços de *trans*- β -caroteno e de anteraxantina.

O *trans*- β -caroteno e a anteraxantina foram detectados em todos os acessos. O 13-*cis*- β -caroteno foi encontrado nos dois acessos de *P. edulis* comercial, em *P. edulis* amarelo e roxo nativos e em *P. setacea*. O *cis*- ζ -caroteno foi detectado em todos os acessos de *P. edulis* e em *P. setacea*. O *trans*- ζ -caroteno foi encontrado em todos os acessos de *P. edulis*. O poli-*cis*- ϵ -caroteno, o prolicopeno, a β -criptoxantina e o fitoflueno foram encontrados nos acessos de *P. edulis* tanto nativos quanto comerciais.

A neoxantina foi encontrada nos acessos de *P. edulis* comercial e no acesso *P. cincinnata* ‘cabaça’. A luteína foi encontrada apenas nas espécies nativas *P. setacea* e nos dois acessos de *P. cincinnata*. Esse dado é interessante, pois os acessos de *P. edulis* não possuem esse carotenóide, e por isso a importância da utilização de outras espécies de maracujá para o enriquecimento de programas de melhoramento, visando o aumento tanto quantitativo quanto qualitativo de carotenóides na polpa do maracujá.

A *cis*- e a *trans*-violaxantina e a zeaxantina foram encontradas nos dois acessos de *P. edulis* comercial, em *P. edulis* amarelo nativo e em *P. setacea*. A *trans*-violaxantina também foi encontrada nos dois acessos de *P. cincinnata* (Tabela 2.3).

Foram quantificados nesse estudo nove carotenóides: *trans*-violaxantina, *cis*-violaxantina, β -criptoxantina, prolicopeno, poli-*cis*- ϵ -caroteno, *cis*- ζ -caroteno, *trans*- ζ -caroteno, *trans*- β -caroteno e 13-*cis*- β -caroteno (Tabela 2.3). Não foi realizada a comparação das concentrações dos carotenóides e dos valores de vitamina A em *P. cincinnata* ‘redondo’ e ‘cabaça’, *P. nitida* e *P. setacea*, pois as concentrações de carotenóides encontradas nessas espécies foram pequenas.

As concentrações de *trans*- β -caroteno, *cis*- ζ -caroteno e os valores de vitamina A foram significativamente diferentes entre todos os acessos de *P. edulis*. A concentração de 13-*cis*- β -caroteno em *P. edulis* comercial a foi significativamente diferente das concentrações encontradas em *P. edulis* comercial b e *P. edulis* amarelo nativo.

As concentrações de *trans*- ζ -caroteno e de prolicopeno em *P. edulis* amarelo nativo e *P. edulis* comercial b foram significativamente diferentes. Já entre *P. edulis*

roxo nativo e *P. edulis* comercial a não houve diferença significativa entre as concentrações destes dois carotenóides; entretanto, as concentrações de ambos nestas duas espécies apresentaram diferença significativa de *P. edulis* amarelo e de *P. edulis* comercial b.

Foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de poli-*cis-ε*-caroteno de *P. edulis* roxo nativo e *P. edulis* comercial a, assim como entre estas espécies e as demais espécies de *P. edulis*. Entre *P. edulis* comercial b e *P. edulis* amarelo nativo não houve diferença significativa.

As concentrações de β-criptoxantina não diferiram significativamente entre os dois acessos de *P. edulis* nativos amarelo e roxo, e também não foi verificada diferença significativa entre os dois acessos de *P. edulis* comercial. Entretanto, as concentrações deste carotenóide diferiram significativamente entre os dois acessos de *P. edulis* comerciais e os dois acessos nativos.

As concentrações de *trans*-violaxantina diferiram significativamente entre *P. edulis* comercial a e *P. edulis* amarelo nativo; este carotenóide não foi encontrado no acesso roxo. Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de *cis*-violaxantina nos dois acessos de *P. edulis* comercial; este carotenóide não foi encontrado nos acessos nativos.

Entre os dois acessos de *P. edulis* comercial foi encontrada uma inversão nos teores dos carotenóides majoritários; o *trans*-ζ-caroteno foi encontrado em maior quantidade em *P. edulis* comercial a ($11,4 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$) e o *trans*-β-caroteno foi o carotenóide mais abundante em *P. edulis* comercial b ($7,8 \pm 0,8 \mu\text{g g}^{-1}$). Nos dois acessos nativos de *P. edulis* o *cis*-ζ-caroteno foi o carotenóide majoritário ($6,28 \pm 0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ e $12,1 \pm 0,7 \mu\text{g g}^{-1}$, *P. edulis* amarelo e *P. edulis* roxo, respectivamente) (Tabela 2.3). Essa variação na proporção de carotenóides de maracujá também foi observada em outros trabalhos (CECCHI & RODRIGUEZ-AMAYA, 1981; SILVA & MERCADANTE, 2002). Zanatta & Mercadante (2001), Gama & Sylos (2005), Sentanin & Rodriguez-Amaya (2007) e Kurz et al. (2008) encontraram diferenças quantitativas de carotenóides em frutas. Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2007) e Kurz et al. (2008) encontraram variação no conteúdo de carotenóides em abóboras e Cardoso et al. (2009) em milho. Variações quantitativas de carotenóides dentro de uma mesma espécie podem ocorrer pelo cultivar ou variedade e por fatores ambientais como solo, clima, luminosidade, temperatura, estação do ano, utilização ou não de agroquímicos, época de colheita e maturação dos frutos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Diferenças

qualitativas podem ocorrer em decorrência da espécie (VIEIRA & AGOSTINI-COSTA, 2007).

Os valores de vitamina A dos acessos de maracujá variaram entre $0,04 \pm 0,00 \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ em *P. nitida* a $65,4 \pm 4,9 \mu\text{g}$ de equivalente de atividade de retinol (RAE) 100g^{-1} em um dos acessos de *P. edulis* comercial, refletindo a variação existente nas diferentes espécies de maracujá. Entre os acessos de *P. edulis* nativos e comerciais essa variação foi de $21,4 \pm 0,9$ a $65,4 \pm 4,9 \mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$. Os resultados apresentados nesta publicação estão atualizados de acordo com os novos fatores de conversão de vitamina A publicados pelo U. S. Institute of Medicine (IOM, 2001). A partir desses novos fatores, o valor pró-vitamínico A de vegetais passou a ser a metade dos valores que vinham sendo utilizados até então (WEST et al., 2002; CAMPOS & ROSADO, 2005).

Tabela 2.2- Propriedades dos carotenóides extraídos da polpa de maracujazeiros e reações químicas específicas. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

Pico ^a	Carotenóide	t _R (min) ^b	λ _{máx} (nm) ^c	Rf	%III/II	Reação cis/trans	Epóxido
1	neoxantina	7,8-8,1	443	0,3	87	-	+
2	trans-violaxantina	8,9-9,7	439	0,24	98	-	+
3	cis-violaxantina	9,3-9,8	436	0,24	-	+	+
4	anteraxantina	11,1-12,9	446	0,8	60	-	+
5	luteína	12,8-13,7	446	0,17	60	-	-
6	zeaxantina	13,6-14,5	452	0,20	25	-	-
7	β-criptoxantina	21,5-22,3	452	0,50	25	-	-
8	prolicopeno	26,8-27,6	439	1,0	0	-	-
9	poli-cis-ε-caroteno	28,9-29,8	432	0,98	60	+	-
10	cis-ζ-caroteno	30,3-31,4	399	-	89	+	-
11	trans-ζ-caroteno	31,4-32,4	400	1,0	103	-	-
12	trans-β-caroteno	32,7-34,6	453	1,0	25	-	-
13	fitoflueno	34,2-35,2	366	-	90	-	-
14	13-cis-β-caroteno	34,9-36,7	445	1,0	-	+	-

^aNumerado de acordo com os cromatogramas apresentados nas Figuras 2.1-2.4.

^bFaixa de 2-16 corridas por HPLC.

^cλ_{máx} na fase móvel (acetonitrila, contendo trietilamina 0,05%:metanol:acetato de etila nas proporções de 95:5:0 ou 60:20:20), fornecido pelo detector DAD.

Tabela 2.3- Concentração de carotenóides ($\mu\text{g g}^{-1}$) em polpas de diferentes espécies / acessos de maracujazeiro. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

Espécies / Acessos	<i>P. cincinnata</i> re	<i>P. cincinnata</i> ca	<i>P. nitida</i>	<i>P. setacea</i>	<i>P. edulis</i> amarelo n	<i>P. edulis</i> roxo n	<i>P. edulis</i> comerc a	<i>P. edulis</i> comerc b
Carotenóide	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) Média±DP							
neoxantina	ND	D	ND	ND	ND	ND	D	D
anteraxantina	D	D	D	D	D	D	D	D
luteína	D	D	ND	D	ND	ND	ND	ND
zeaxantina	ND	ND	ND	D	D	ND	D	D
fitoflueno	ND	ND	ND	ND	D	D	D	D
<i>trans</i> -violaxantina	Tr	0,02±0,00	0,00±0,00	tr	0,50±0,05a	0,00±0,00	0,60±0,08b	0,5±0,1ab
<i>cis</i> -violaxantina	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,18±0,06	0,00±0,00	0,00±0,00	1,20±0,16a	1,21±0,2a
β -criptoxantina	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,24±0,02a	0,20±0,03a	1,75±0,08b	1,8±0,2b
prolicopeno	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,03±0,08a	5,9±0,5b	5,43±0,18b	0,87±0,09c
poli- <i>cis</i> - ϵ -caroteno	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,3±0,1a	3,4±0,2b	4,93±0,18c	1,27±0,06a
<i>cis</i> - ζ -caroteno	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	tr	6,28±0,15a	12,1±0,7b	6,83±0,25c	2,0±0,1d
<i>trans</i> - ζ -caroteno	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	5,40±0,28a	10,95±0,3b	11,4±0,4b	2,3±0,1c
<i>trans</i> - β -caroteno	0,06±0,00	0,03±0,01	0,005±0,000	0,66±0,09	2,84±0,06a	2,6±0,1b	3,6±0,1c	7,8±0,8d
13- <i>cis</i> - β -caroteno	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,08±0,00	0,38±0,08a	tr	0,4±0,0b	0,37±0,02a
Vitamina A ($\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ RAE)	0,49±0,03	0,23±0,01	0,04±0,00	5,5±0,7	23,7±0,5a	21,4±0,9b	30,3±1,0c	65,4±4,9d

Médias das concentrações dos carotenóides e dos valores de vitamina A seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *P. cincinnata* re: *P. cincinnata* redondo, *P. cincinnata* ca: *P. cincinnata* cabaça, *P. edulis* amarelo n: *P. edulis* amarelo nativo, *P. edulis* roxo n: *P. edulis* roxo nativo, *P. edulis* comerc a: *P. edulis* comercial a, *P. edulis* comerc b: *P. edulis* comercial b. tr: traços. ND: não detectado. D: detectado, mas não quantificado.

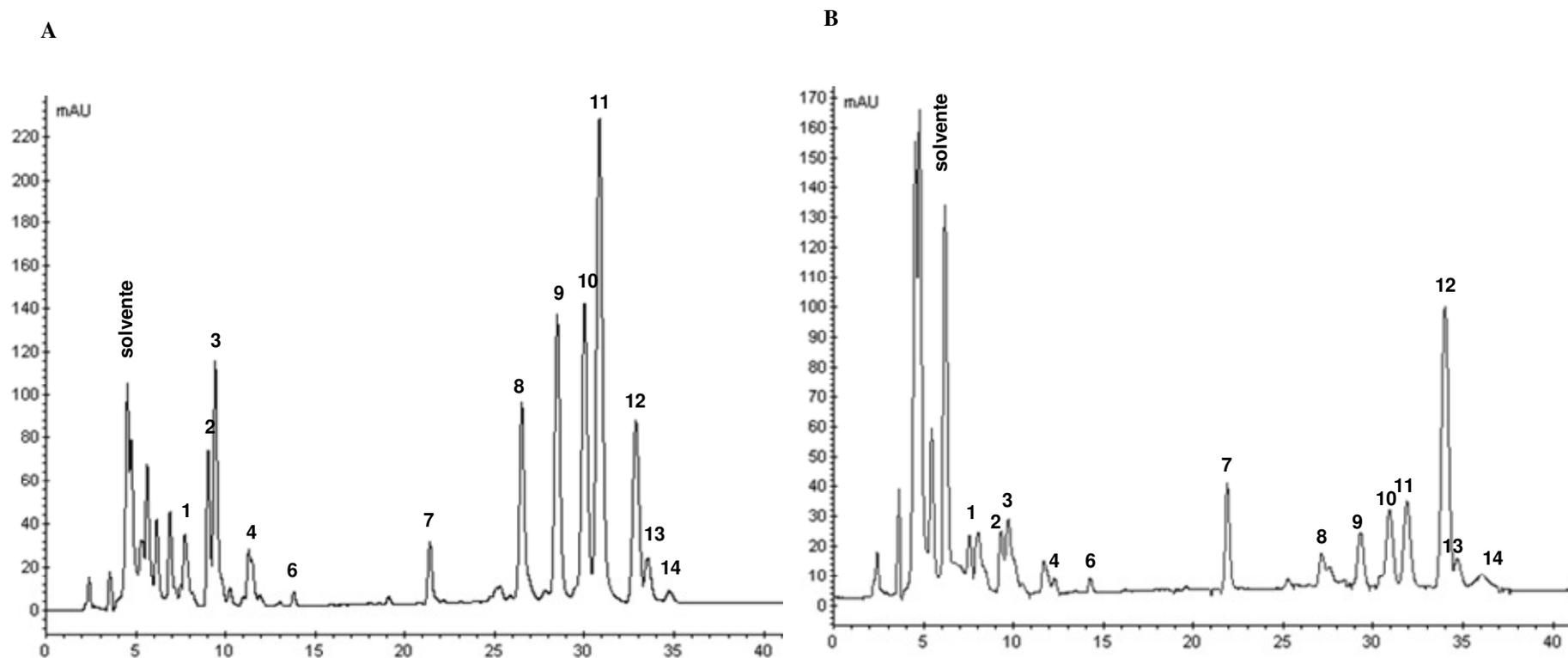


Figura 2.1- Cromatogramas obtidos por HPLC: **A)** *P. edulis* comercial a saponificado. **B)** *P. edulis* comercial b saponificado. Os números na figura correspondem aos picos dos carotenóides descritos na Tabela 2.2. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

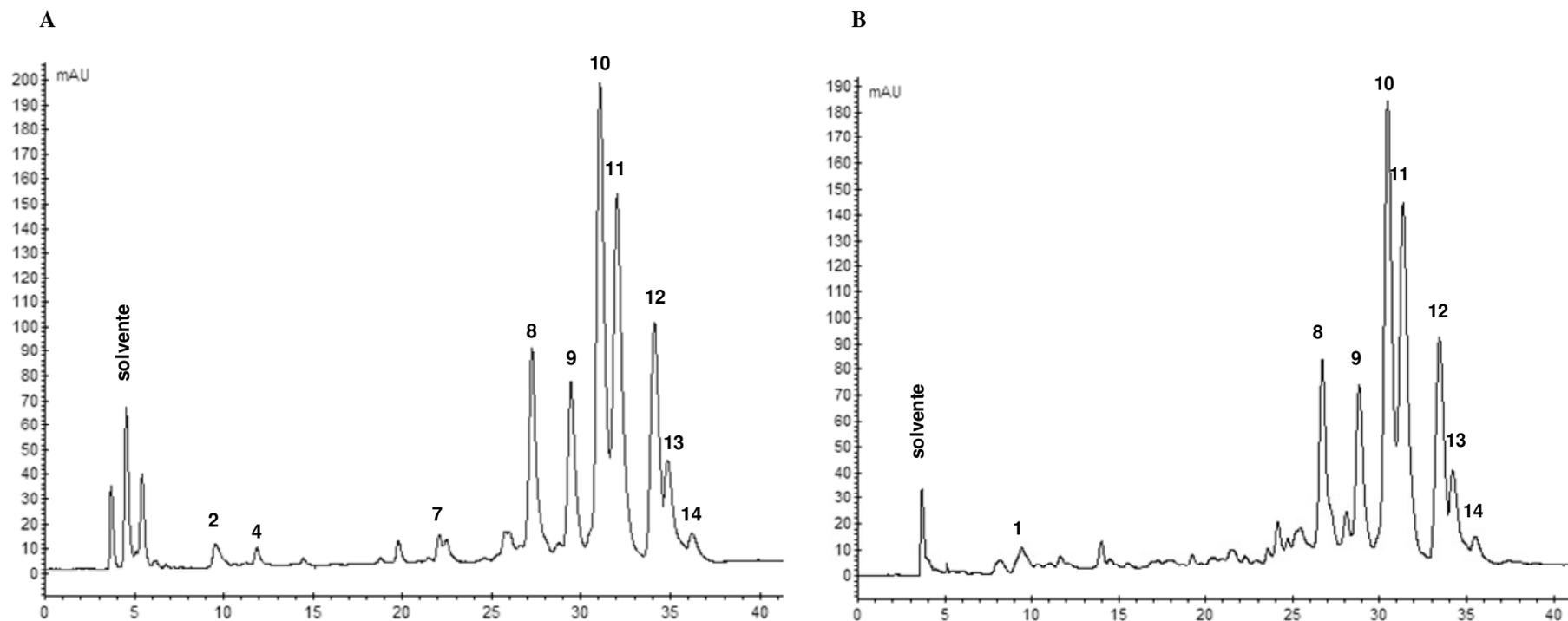


Figura 2.2- Cromatogramas obtidos por HPLC: **A)** *P. edulis* amarelo nativo saponificado. **B)** *P. edulis* amarelo nativo não saponificado. Os números na figura correspondem aos picos dos carotenóides descritos na Tabela 2.2. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

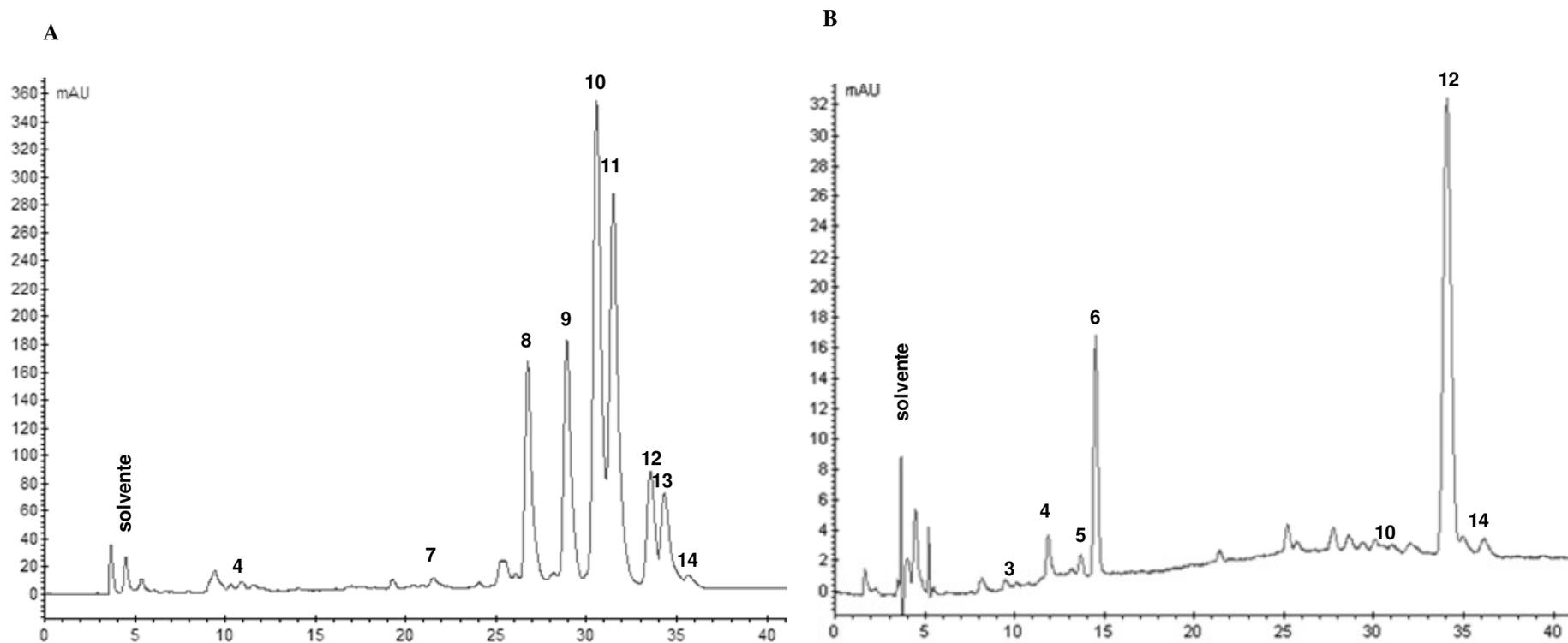


Figura 2.3- Cromatogramas obtidos por HPLC: A) *P. edulis* roxo nativo saponificado. B) *P. setacea* não saponificado. Os números na figura correspondem aos picos dos carotenóides descritos na Tabela 2.2. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

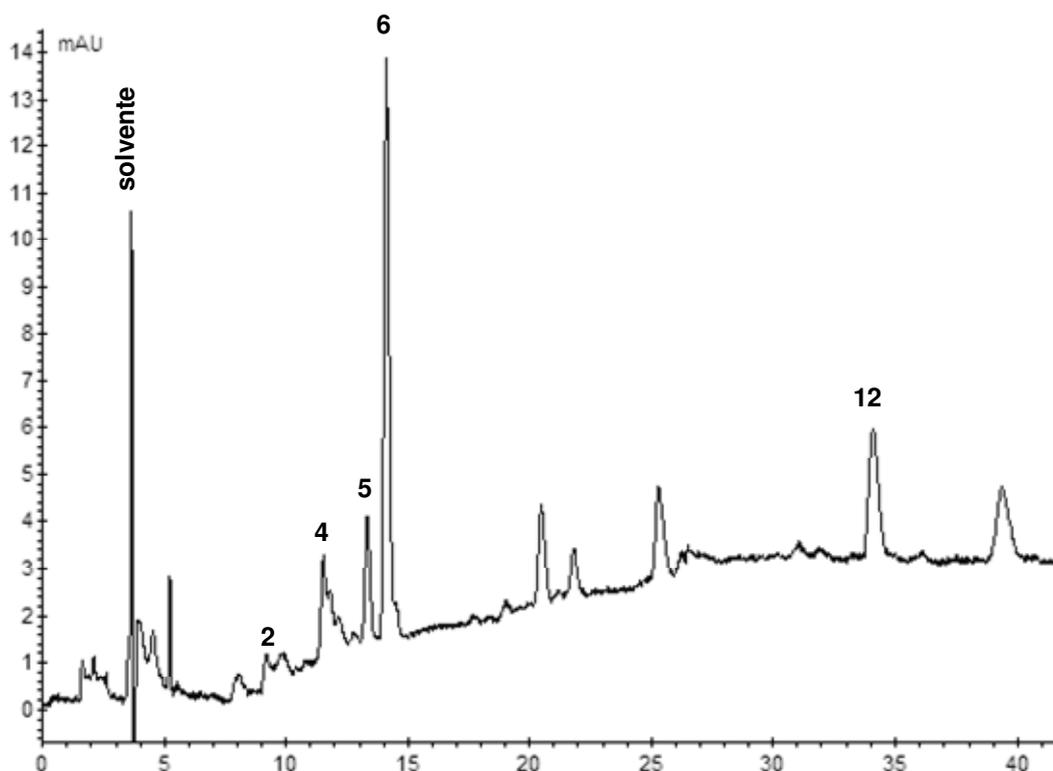


Figura 2.4- Cromatograma obtido por HPLC: *P. cincinnata* acesso ‘redondo’ não saponificado. Os números na figura correspondem aos picos dos carotenóides descritos na Tabela 2.2. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

4 CONCLUSÕES

Houve variação na composição qualitativa e quantitativa de carotenóides entre as espécies e os acessos de *Passiflora* avaliados.

Devem-se aprofundar as pesquisas sobre frutas nativas do Cerrado, visto que a caracterização do perfil de carotenóides em frutos de espécies de maracujá com potencial agrônômico pode agregar valor ao produto e estimular o seu consumo.

5 AGRADECIMENTOS

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

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, T. S.; CECCHI, H. M.; GODOY, H. T. Composição de carotenóides no marolo *in natura* e em produtos de preparo caseiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 16, p. 67-71, 1996.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; VIEIRA, R. F. **Frutas nativas do cerrado: qualidade nutricional e sabor peculiar**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 3p. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/am2004/arquivos/27100403.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2008.

ALMEIDA, S. P. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998. 188 p.

AQUINO, F. G.; RIBEIRO, J. F.; GULIAS, A. P. S. M.; OLIVEIRA, M. C.; BARROS, C. J. S. HAYES, K. M.; SILVA, M. R. Uso sustentável de plantas nativas do Cerrado: oportunidades e desafios. In: PARRON, L. M.; AGUIAR, L. M. S.; DUBOC, E.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; CAMARGO, A. J. A.; AQUINO, F. G. (Eds). **CERRADO desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 95-123.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, Rome, v. 17, p. 385-396, 2004.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Qualitative and Quantitative Differences in Carotenoid Composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, n. 10, p. 4027–4033, 2007.

BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; BERNACCI, L. C. Maracujá-do-Cerrado. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Eds). **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 216-235.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, p. 1551-1558, 1995.

CAMPOS, F. M.; ROSADO, G. P. Novos Fatores de Conversão de Carotenóides Provitamínicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 571-578, 2005.

CARDOSO, W. S.; PAES, M. C. D.; GALVÃO, J. C. C.; RIOS, S. A.; GUIMARÃES, P. E. O.; SCHAFFERT, R. E.; BORÉM, A. Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição de carotenóides nos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 164-173, 2009.

CECCHI, H. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenóides e valor de vitamina-A em suco de maracujá processado. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 33, p. 72-76, 1981.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T. W. (Ed). **Chemistry and Biochemistry of plant pigments**. 2. ed. London: Academic Press, v. 2, p. 38-165, 1976.

FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; PIO VIANA, A.; BRUCKNER, C.; LARANJEIRA, F. F.; DAMASCENO, F.; MELETTI, L. M. M.; CONSOLI, L.; SOUSA, M. A. F.; SILVA, M. S.; PEREIRA, M. G.; STENZEL, N.; SHARMA, R. D. Demandas para as pesquisas relacionadas ao melhoramento genético. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. p. 25-34.

GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: Identification and quantification by HPLC. **Food Research International**, v. 38, p. 899–903, 2005.

IOM (U. S. Institute of Medicine); Food and Nutrition Board; Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. **Dietary Reference Intakes: for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Cromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenium, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 773 p.

JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Domesticação de espécies da flora nativa do Cerrado. In: PARRON, L. M.; AGUIAR, L. M. S.; DUBOC, E.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; CAMARGO, A. J. A.; AQUINO, F. G. (Eds). **CERRADO desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 125- 163.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chemistry**, Norwich, v. 78, p. 389-398, 2002.

KURZ, C.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. HPLC-DAD-MS characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. **Food Chemistry**, v. 110, p. 522–530, 2008.

LEUENBERGER, F. J.; THOMMEN, H. Zum Vorkommen von carotinoiden in der Passionsfrucht. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung**, v. 19, p. 279-282, 1972.

MELETTI, L. M. M., SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C. Caracterização Fenotípica de Três Seleções de Maracujazeiro-Roxo (*Passiflora edulis* Sims). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 268-272, 2005.

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

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods**. Arlington: Agency for International Development, 1997. 88p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Some Considerations in Generating Carotenoid Data for Food Composition Tables. **Journal of Food Composition and Analysis**, Kent, v. 13, p. 641-647, 2000.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 2001. 64p.

SAS INSTITUTE INC. 2002. **SAS/STAT user's guide. Version 9.0**. SAS Institute, North Caroline, Cary. 2002.

SENTANIN, M. A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de carotenóides em mamão e pêssego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 13-19, 2007.

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

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização Química de Metabólitos Secundários em Germoplasma Vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 343-372.

WEST, C.E.; EILANDER, A.; VAN LIESHOUT, M. Consequences of Revised Estimates of Carotenoid Bioefficacy for Dietary Control of Vitamin A Deficiency in Developing countries. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, p. 2920-2926, 2002.

CAPÍTULO III

DIVERSIDADE GENÉTICA DE MARACUJÁS DO CERRADO COM BASE NO PERFIL DE CAROTENÓIDES

DIVERSIDADE GENÉTICA DE MARACUJÁS DO CERRADO COM BASE NO PERFIL DE CAROTENÓIDES

RESUMO

No Cerrado são encontradas mais de 40 espécies do gênero *Passiflora*. Porém, o potencial de muitas dessas espécies é desconhecido do ponto de vista científico. Os carotenóides são responsáveis pela coloração da polpa do maracujá e de muitos frutos, flores e folhas. Alguns possuem atividade antioxidante e outros atividade pró-vitamina A. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética entre oito acessos de quatro espécies de maracujás do Cerrado (dois acessos de *P. cincinnata*, um acesso de *P. nitida*, um acesso de *P. setacea* e quatro acessos de *P. edulis*) com potencial agrônomo, com base no perfil de carotenóides presentes na polpa de seus frutos utilizando, como referência, o maracujá-amarelo comercial (*P. edulis*). Os carotenóides foram extraídos em acetona, metade deles foram saponificados e separados por HPLC e identificados segundo Rodriguez-Amaya (2001). Com base nas áreas dos picos dos carotenóides e na presença e ausência de carotenóides que foi convertida em uma matriz de dados binários foram calculadas matrizes de distâncias euclidianas médias padronizadas entre os oito acessos de quatro espécies e realizadas análises de agrupamento e de dispersão gráfica. As distâncias genéticas entre os oito acessos das quatro espécies de maracujazeiros variaram entre 0,272 e 2,040 com base nas áreas dos picos dos carotenóides e entre 0,000 e 0,733 baseadas na presença e ausência de carotenóides. Na análise de agrupamento com base na matriz de distâncias euclidianas médias padronizadas calculadas utilizando-se as áreas dos picos dos carotenóides os dois acessos de *P. cincinnata* foram os mais próximos. Já na análise de agrupamento com base na matriz de distâncias euclidianas médias padronizadas calculadas utilizando-se a presença e ausência de carotenóides os dois acessos de *P. edulis* comercial foram os mais próximos. Existe diversidade genética entre os oito acessos das quatro espécies analisadas com base no perfil de carotenóides. Há a necessidade de caracterização, conservação e utilização dessa valiosa fonte de recursos genéticos de maracujá existente no Cerrado.

Palavras-chave: *Passiflora*, análise de agrupamento, coordenadas principais, compostos bioativos

GENETIC DIVERSITY OF CERRADO PASSION FRUIT BASED ON CAROTENOIDS PROFILE

ABSTRACT

In Cerrado are found more of 40 species of *Passiflora* genus. However, the potential of some of these species is unknown of scientific point of view. Carotenoids are responsible by pulp color of passion fruit and many fruits, flowers and leaves. Some have antioxidant activity and others pro-vitamin A activity. The objective of this study was evaluate the genetic diversity among eight accessions of four species of Cerrado passion fruit (two *P. cincinnata* accessions, one *P. nitida* accession, one *P. setacea* accession and four *P. edulis* accessions) with agronomic potential based on carotenoids profile in pulp fruit using commercial passion fruit (*P. edulis*) as reference. Carotenoids were extracted in acetone, half of them were saponified and separated by HPLC and identified according Rodriguez-Amaya (2001). Based on carotenoids peaks area and carotenoids presence and absence which was transformed in binary matrix data were calculated standardized means euclidian distances matrices among eight accessions of four species of passion fruit and to perform cluster and graphical dispersion analysis. The genetic distances among the eight accessions of four species of passion fruit varied from 0.272 to 2.040 based on carotenoids peaks area and 0.000 to 0.733 based on carotenoids presence and absence. In clustering analysis based on standardized means euclidian distances matrix calculated using carotenoids peaks area the *P. cincinnata* accessions were the closest. Already in the clustering analysis based on standardized means euclidian distances matrix calculated using carotenoids presence and absence the *P. edulis* commercial accessions were the closest. There is genetic diversity among eight accessions of four species of passion fruit based on carotenoids profile. There is use, conservation and characterization necessity this valuable source of genetic resources of Cerrado passion fruit.

Keywords: *Passiflora*, clustering analyses, principal coordinates, bioactive compounds

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da diversidade genética entre os acessos de uma espécie tem uma grande importância para o manejo correto e o uso destes recursos nos programas de melhoramento genético e para diversificação de sistemas produtivos. Nesse contexto, a caracterização da coleção de germoplasma tem uma aplicação estratégica na valoração dos recursos genéticos, além de proporcionar dados básicos que são necessários ao melhoramento de plantas ou para o mapeamento de genes (CASTELLEN et al., 2007). Além de proporcionar melhor conhecimento do germoplasma disponível, essencial para seu uso prático, a caracterização e avaliação morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma permitem a identificação dos acessos duplicados, o estabelecimento de coleções nucleares, facilitando o uso da diversidade nas avaliações subsequentes, mais voltadas a aspectos agrônômicos e permitem a identificação dos modos de reprodução predominantes nos acessos (VALLS, 2007).

Por isso, a caracterização física, físico-química bioquímica e morfológica de frutos de acessos e seleções de espécies fruteiras é muito importante na fase de pré-melhoramento genético na fruticultura, na medida em que são quantificadas propriedades interessantes de frutos de genótipos potencialmente úteis em futuros programas de melhoramento genético, garantindo sua qualidade para o mercado consumidor (CARDOSO-SILVA et al., 2007). Existem trabalhos sobre a diversidade genética avaliada pelas características físico-químicas dos frutos entre acessos de maracujazeiro-amarelo (GODOY et al., 2007) e em maracujazeiros-do-sono nativos (CARDOSO-SILVA et al., 2007).

O Brasil é um dos centros de diversidade do gênero *Passiflora* e por isso, possui um grande potencial para a utilização dos recursos genéticos de maracujá na área agrônômica (FALEIRO et al., 2008a). Existem cerca de 400 espécies, das quais aproximadamente 150 ocorrem no país e 70 produzem frutos comestíveis (FALEIRO et al., 2005). Dentre elas, várias se encontram distribuídas no Cerrado, como *P. setacea* DC. conhecida como maracujá do Cerrado, maracujá-do-sono, maracujá-sururuca e maracujá-de-boi; *P. cincinnata* Mast. chamada de maracujá do Cerrado, maracujá-mochila, maracujá-tubarão e maracujá-de-vaqueiro (OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005; BRAGA et al, 2006); *P. nitida* Kunth. conhecida por maracujá-suspiro, maracujá-de-rato, maracujá-do-mato e maracujá-de-cheiro (JUNQUEIRA, 2006) e *P. edulis*

conhecida como maracujá-amarelo ou azedo, maracujá-roxo ou preto, entre outros nomes (CERVI, 1997).

As espécies nativas do Cerrado destacam-se por apresentar uma ou mais características de potencial econômico, como maior resistência a doenças e a pragas, longevidade e adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado e/ou maior concentração de componentes químicos interessantes para a indústria farmacêutica (MELLETTI et al., 2005; FALEIRO et al., 2008a). Algumas espécies são muito produtivas e seus frutos têm as cascas rígidas que continuam verdes quando maduros, não sendo atraentes para animais silvestres enquanto estão na planta. Também se destaca a importância social já que o cultivo das espécies nativas ocorre predominantemente em pequenos pomares e a produção pode ocorrer em períodos de entressafra do maracujá comercial, gerando emprego e renda em áreas marginais para a agricultura convencional e dispensando o uso de defensivos agrícolas (FALEIRO et al., 2005).

O uso de espécies nativas é consagrado pelas populações locais, através do consumo *in natura* e da confecção de sucos, doces e sorvetes (SILVA et al., 2001; OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005). A importância medicinal deve-se às propriedades calmantes em algumas espécies, dentre outras que ainda são pouco conhecidas (DHAWAN et al., 2004; COSTA & TUPINAMBÁ, 2005). A utilização para fins ornamentais também tem ganhado importância. Além da riqueza oferecida pelas espécies nativas e pelas variedades silvestres, o Brasil também é o principal produtor e consumidor mundial de maracujá comercial (FALEIRO et al., 2008b). A principal espécie cultivada é o maracujá-azedo (*P. edulis* Sims.) e em menor escala, o maracujá-doce (*P. alata* Curtis).

A caracterização das variedades silvestres e espécies nativas de maracujá é importante, pois várias delas poderão ser utilizadas para ampliação da base genética dos programas de melhoramento genético (FALEIRO et al., 2005; FALEIRO et al., 2008a). O potencial funcional destas espécies na alimentação decorre da existência de antioxidantes, como carotenóides, compostos fenólicos e vitaminas que são associados à redução do risco de doenças crônicas degenerativas. Os carotenóides, responsáveis pela pigmentação de muitas frutas e verduras, desempenham múltiplas funções no organismo, envolvendo a atividade pró-vitamina A e o potencial antioxidante (BRITTON, 1995).

Apesar de todo esse potencial, a grande maioria das espécies do gênero *Passiflora* ainda não foi suficientemente estudada quanto às propriedades medicinais, funcionais e nutricionais. A obtenção do conhecimento científico através da caracterização dessas espécies permite a valoração, a conservação e o uso de uma biodiversidade essencialmente brasileira, suscitando o desenvolvimento de ações, programas e produtos para a diversificação de sistemas produtivos e de alimentos para a sociedade.

Nesse contexto, objetivou-se no presente trabalho avaliar a diversidade genética entre oito acessos de quatro espécies de maracujás do Cerrado (dois acessos de *P. cincinnata*, um acesso de *P. nitida*, um acesso de *P. setacea* e quatro acessos de *P. edulis*) com potencial agrônômico, com base no perfil de carotenóides presentes na polpa de seus frutos, utilizando, como referência, o maracujá-amarelo comercial (*P. edulis*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Os frutos dos maracujazeiros nativos analisados nesse trabalho foram obtidos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF em março e dezembro de 2008. Os frutos de maracujá-amarelo comercial foram adquiridos em um mercado de Brasília-DF em novembro de 2007 e março de 2008 (Tabela 3.1).

Tabela 3.1- Procedência dos maracujazeiros utilizados neste estudo. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

Nº	Espécie	Nome popular	Procedência	Estado	Código
1	<i>P. cincinnata</i> Mast.	maracujá do Cerrado	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-26-01 (redondo)
2	<i>P. cincinnata</i> Mast.	maracujá do Cerrado	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-26-02 (cabaça)
3	<i>P. nitida</i> Kunth	maracujá-suspiro	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-01-03
4	<i>P. setacea</i> D.C.	maracujá-do-sono	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-12-01 (BRS Pérola do Cerrado)
5	<i>P. edulis</i> Sims. amarelo nativo	maracujá-amarelo	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-36-01
6	<i>P. edulis</i> Sims. roxo nativo	maracujá-roxo	Embrapa Cerrados	DF	CPAC MJ-21-01
7	<i>P. edulis</i> Sims. amarelo comercial	maracujá-amarelo	Mercado	DF	–
8	<i>P. edulis</i> Sims. amarelo comercial	maracujá-amarelo	Mercado	DF	–

Foram analisados oito acessos de quatro espécies de maracujazeiros (dois acessos de *P. cincinnata*, um acesso de *P. nitida*, um acesso de *P. setacea* e quatro acessos de *P. edulis*). Todos os frutos utilizados na determinação de carotenóides estavam maduros. Foram coletados somente os frutos dos maracujazeiros nativos que haviam se desprendido da planta-mãe. O estágio de amadurecimento dos frutos de maracujá-amarelo comercial foi determinado pela aparência visual da casca completamente amarela e por observação da polpa solta do pericarpo ao se agitar os frutos. A massa utilizada para a extração de carotenóides variou de acordo com a coloração da polpa, laranja até incolor (17,0-249,0 g). Massas maiores foram utilizadas para as polpas de coloração mais claras. Para *P. cincinnata* acesso ‘redondo’ foram usados 25 frutos, entre 21,0-22,0 g de polpa por repetição (4 repetições saponificadas e 4 não saponificadas) e para *P. cincinnata* acesso ‘cabaça’ foram utilizados 9 frutos, entre 32,0-33,0 g de polpa por repetição (1 repetição saponificada e 1 não saponificada). Para um acesso de *P. edulis* comercial, chamado de a, foram usados 5 frutos, entre 19,0-20,0 g de polpa por repetição (3 repetições saponificadas e 3 não saponificadas). Para o outro acesso de *P. edulis*, chamado de b, foram usados 5 frutos, aproximadamente 18,0 g de polpa por repetição (3 repetições saponificadas e 3 não saponificadas). Para *P. edulis* amarelo nativo foram utilizados 23 frutos, entre 43,0-44,0g de polpa por

repetição (3 repetições saponificadas e 3 não saponificadas) e para *P. edulis* roxo nativo foram usados 27 frutos, 60,0 g de polpa por repetição (3 repetições saponificadas e 3 não saponificadas). Para *P. nitida*, de polpa branca, foram utilizados 42 frutos, que forneceram 249,0 g de polpa (1 repetição saponificada). Para *P. setacea* foram utilizados 15 frutos, entre 17,0-18,0 g de polpa por repetição (3 repetições saponificadas e 3 não saponificadas). Para a extração da polpa os frutos foram cortados com faca de aço inoxidável e o despulpamento foi realizado com auxílio de uma espátula e peneira plástica.

2.2 Extração de Carotenóides

A extração de carotenóides foi realizada segundo Rodriguez-Amaya (2001). Os carotenóides foram extraídos com acetona gelada em funil de Buchner a vácuo, em ambiente fresco e com luminosidade reduzida. Foi adicionado hyflosupercel (Diacel) para auxiliar a extração e filtragem do extrato e antioxidante BHT (butil hidroxitolueno) em todas as amostras para evitar a degradação dos carotenóides. A extração com acetona foi repetida até a descoloração total do resíduo da polpa. Os carotenóides foram transferidos para o éter etílico, usando um funil de separação. Metade das amostras foram saponificadas com KOH 10% em metanol por uma noite (16 horas) à temperatura ambiente. No dia seguinte foi feita a lavagem do extrato com água destilada até pH neutro (na presença de fenolftaleína) para eliminar o álcali. O éter etílico foi evaporado em evaporador rotativo Tecnal modelo TE-210 (temperatura inferior a 35 °C) até quase *secura*.

O resíduo do extrato foi seco em nitrogênio, diluído com hexano (4 mL), adicionado de BHT e acondicionado em *vial* na ausência de ar, que foi retirado com uma seringa de agulha fina (seringa de insulina). A tampa e o selo do *vial* foram envolvidos com parafilme e o extrato foi mantido sob refrigeração (-20 °C) até o momento da injeção, que foi feito dentro de 7 dias.

2.3 Separação de carotenóides

A separação dos carotenóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) segundo Kimura & Rodriguez-Amaya (2002) e Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2004), utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência

(Varian) equipado com detector de conjunto de diodos (PDA PS-335), bomba (PS-240), injetor (PS-410) e software Galaxie 1.9 para processamento, aquisição e armazenamento dos dados, em ambiente com temperatura controlada (22 ± 01 °C). O preparo das amostras para a injeção no cromatógrafo consistiu na secagem completa do extrato com nitrogênio, adição de acetona grau HPLC (o volume de acetona adicionado variou conforme a coloração do extrato) e filtragem em Millex LCR com membrana PTFE modificada $0,45\ \mu\text{m}$ $13\ \text{mm}$ (Millipore) diretamente em vials. Os carotenóides foram separados em coluna C_{18} ODS-2 $150 \times 4,6\ \text{mm}$, $3\ \mu\text{m}$ de tamanho de partícula (Waters). A fase móvel utilizada foi acetonitrila (contendo 0,05% de trietilamina):metanol:acetato de etila em gradiente de 95:5:0, durante os 20 minutos iniciais da corrida, e 60:20:20 entre 20 e 60 minutos de corrida; o tempo de equilíbrio da coluna foi de 20 minutos. O fluxo utilizado foi $0,5\ \text{mL min}^{-1}$ e o volume de amostra injetado foi $10\ \mu\text{L}$. A solução de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina foi filtrada em membrana PTFE modificado $0,45\ \mu\text{m}$ para eliminação de resíduos.

2.4. Identificação de carotenóides

A identificação dos carotenóides foi realizada através das informações obtidas dos espectros de absorção no UV-visível fornecidos pelo detector de conjunto de diodos, pelo tempo de retenção (t_r), valores de R_f em camada delgada (utilizando éter de petróleo:acetato de etila na proporção 9:3 como fase móvel), co-cromatografia com padrões e por reações químicas específicas (isomerização *cis-trans* catalisada por iodo; rearranjo epóxido-furanóide e redução da carbonila conjugada). Os espectros foram adquiridos entre 500 e 360 nm e os cromatogramas foram processados no comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) de cada carotenóide.

2.5 Quantificação dos carotenóides e obtenção de padrões

Os carotenóides foram quantificados através de curva de calibração externa e fator de correção, conforme Kimura & Rodriguez-Amaya (2002). O padrão de *trans*- β -caroteno foi fornecido pela DSM Nutritional Products (Suíça). Como os carotenóides são altamente instáveis, a concentração do padrão de β -caroteno foi confirmada após diluição em hexano e verificação da pureza em HPLC (acima de 95%) e medida da absorbância (λ_{max}) em espectrofotômetro de varredura UV-visível Lambda 25, Perkin-

Elmer. Os demais padrões foram purificados conforme Rodriguez-Amaya (2001) por cromatografia em coluna aberta de óxido de magnésio (VETEC): hyflosupercel (Diacel) (1:2), a partir da polpa de maracujá-amarelo comercial. Os padrões purificados foram quantificados em espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo lambda 25 a partir das respectivas absorbâncias máximas, utilizando-se os valores de absorvidade tabelados por Davies (1976) e considerando-se a pureza de cada padrão avaliada por HPLC.

Para estocagem, os padrões purificados foram secos em nitrogênio, diluídos em hexano (4 mL), adicionados de BHT e acondicionados em *vial* na ausência de ar, que foi retirado com uma seringa de agulha fina (seringa de insulina). A tampa e o selo do *vial* foram envolvidos com parafilme e os padrões foram mantidos sob refrigeração (-20 °C) até o momento da injeção. Para monitorar a estabilidade do processo de estocagem, padrões de *trans*- β -caroteno foram injetados ao longo de 30 dias. As curvas de calibração foram injetadas dentro de 7 dias.

Foram construídas curvas de calibração dos padrões obtidos a partir da polpa de maracujá-amarelo comercial: *trans*-violaxantina (pureza = 97%; $r = 0,9992$), *cis*-violaxantina (pureza = 99%; $r = 0,9931$), β -criptoxantina (pureza = 86%; $r = 0,9988$), prolicopeno (pureza = 92%), luteína (pureza = 94%; $r = 0,9999$) poli-*cis*- ϵ -caroteno (pureza = 91%; $r = 0,9995$), *trans*- ζ -caroteno (pureza = 97%; $r = 0,9995$) e *trans*- β -caroteno (pureza = 96%; $r = 0,9972$) com 4 a 6 níveis de concentração. O limite inferior de linearidade da curva de calibração foi de $8,2\mu\text{g mL}^{-1}$ e $8,5\mu\text{g mL}^{-1}$ para o *trans* β -caroteno e para o *trans*- ζ -caroteno, respectivamente. O 13-*cis*- β -caroteno e o *cis*- ζ -caroteno foram quantificados utilizando-se as curvas dos respectivos carotenóides *trans*. Pontos de concentração conhecida de *trans*- β -caroteno foram injetados 2 a 3 vezes por semana durante a determinação de carotenóides das amostras para verificar a reprodutibilidade da resposta obtida e para avaliar o fator de resposta dos diferentes carotenóides.

2.6 Determinação da diversidade genética

Estatísticas descritivas baseadas nas médias das áreas dos picos dos carotenóides foram calculadas. Com base nas áreas dos picos dos carotenóides encontrados em cada material genético foi calculada uma matriz de distâncias genéticas, utilizando a Distância Euclidiana Média Padronizada (DEMP) com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 1997). Já a presença e ausência de carotenóides nas espécies e acessos

analisados foi convertida em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre as diferentes espécies e acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979), utilizando-se o Programa Genes (CRUZ, 1997).

As matrizes de distâncias genéticas construídas a partir das áreas dos picos dos carotenóides e do critério de presença e ausência de carotenóides foram utilizadas para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se o método do UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*) como critério de agrupamento, e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC., 1999). A contribuição relativa de cada carotenóide para a diversidade genética também foi avaliada, utilizando o método de Singh (1981), com o auxílio do Programa Genes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cromatográfica permitiu a identificação de quatorze carotenóides (Tabela 3.2). Foram encontradas variações nas áreas dos picos dos carotenóides nos oito acessos das quatro espécies de maracujazeiros (Tabela 3.3). Este resultado evidencia a grande diversidade genética das espécies e entre os acessos da mesma espécie com base nas áreas dos picos dos carotenóides. A alta diversidade genética entre acessos de maracujazeiros tem sido verificada com base em marcadores moleculares (FALEIRO et al., 2008c), características físico-químicas de frutos (GODOY et al., 2007), além de descritores morfoagronômicos (ARAÚJO et al., 2008).

As distâncias genéticas entre os maracujás do Cerrado com base nas áreas dos picos dos carotenóides, utilizando a Distância Euclidiana Média Padronizada, variaram entre 0,272 e 2,040 (Tabela 3.4). A maior distância genética (2,040) foi obtida entre *P. nitida* e *P. edulis* comercial a. A menor distância genética foi obtidas entre os dois acessos de *P. cincinnata* (0,272). De um modo geral, os acessos comerciais de *P. edulis* apresentaram altas distâncias genéticas em relação às outras espécies e também em relação aos acessos silvestres da mesma espécie. A alta variabilidade genética entre acessos silvestres e comerciais de *P. edulis* também tem sido verificada com base em marcadores moleculares do DNA (BELLON et al., 2007).

Os carotenóides apresentaram diferentes contribuições relativas para a diversidade genética (Tabela 3). O *cis*- ζ -caroteno foi o carotenóide que teve maior contribuição no índice de diversidade genética, 38,23%; seguido pelo *trans*- ζ -caroteno, 36,71% e pelo poli-*cis*- ϵ -caroteno 9,69% (Tabela 3.3).

As distâncias genéticas entre os maracujás do Cerrado baseados na presença e ausência de carotenóides, utilizando como índice o complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979), variaram entre 0,000 e 0,733 (Tabela 3.5). A maior distância genética (0,733) foi obtida entre *P. edulis* roxo nativo e *P. nitida* e entre os dois acessos comerciais de *P. edulis* e *P. setacea*. A menor distância genética foi obtida entre os dois acessos de *P. edulis* comercial. A distância genética entre o acesso amarelo nativo e os dois acessos de *P. edulis* comercial (0,083) foi pequena. A distância genética entre os dois acessos de *P. cincinnata* também foi pequena (0,091). A distância genética entre os acessos de *P. edulis* roxo nativo e *P. edulis* comercial de 0,182 foi relativamente pequena, ao contrário da distância genética baseada nas áreas dos picos dos carotenóides. Esta diferença pode estar relacionada ao trabalho de melhoramento genético e domesticação da espécie. Variedades comerciais apresentam frutos com tamanho 5 a 10 vezes superior aos acessos silvestres. Estas diferenças no tamanho dos frutos aliadas a outras diferenças obtidas pelos trabalhos de seleção podem ter alterado significativamente as concentrações dos carotenóides, sem alterar os tipos de carotenóides presentes.

A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas calculadas a partir das áreas dos picos dos carotenóides permitiu subdividir os oito acessos das quatro espécies de *Passiflora* em cinco grupos de similaridade genética a uma distância genética relativa de 0,8 (Figura 3.1). O acesso de *P. edulis* comercial foi o que apresentou maiores diferenças em relação aos demais acessos e as outras espécies. O maior grupo foi formado pelos dois acessos de *P. cincinnata* e pela espécie *P. nitida*. Dentro desse grupo é possível verificar maior similaridade entre os dois acessos de *P. cincinnata* e depois com o acesso de *P. nitida*, os quais apresentam coloração de polpa mais clara. A espécie *P. setacea*, que apresenta coloração da polpa mais escura (amarelo claro) ficou mais próxima do grupo formado por *P. nitida* e pelos dois acessos de *P. cincinnata*, a qual também pode ser verificada no gráfico de dispersão (Figura 3.2). Os dois acessos de *P. edulis* nativos se agruparam entre si e os dois de *P. edulis* comercial não se agruparam entre si. As distâncias genéticas relativas são grandes, pois as áreas dos picos dos carotenóides têm variação entre as espécies e entre os acessos. As

distâncias entre as espécies e os acessos e a distribuição dos mesmos nos grupos de similaridade podem ser também observadas no gráfico de dispersão (Figura 3.2). Este gráfico de dispersão corrobora com o que foi observado na análise de agrupamento. Fica evidente a formação do maior grupo de similaridade envolvendo os acessos de *P. cincinnata* e as espécies *P. nitida* e *P. setacea*, sendo esta última a mais divergente do grupo. Os acessos de *P. edulis* nativo e os acessos comerciais ocupam a mesma região gráfica, entretanto existe uma considerável distância entre eles.

A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas calculadas baseadas na presença e ausência de carotenóides permitiu subdividir os oito acessos das quatro espécies de *Passiflora* em quatro grupos de similaridade genética a uma distância genética relativa de 0,20 (Figura 3.3). Houve uma coincidência entre os grupos formados de acordo com a espécie. A espécie *P. nitida* foi a que apresentou maiores diferenças em relação às demais. Os acessos de *P. cincinnata* formaram o primeiro grupo. Os quatro acessos de *P. edulis* formaram um grupo, sendo que os acessos de *P. edulis* amarelo nativo e *P. edulis* comercial foram os mais próximos. As distâncias entre os oito acessos das quatro espécies e a distribuição dos mesmos nos grupos de similaridade podem ser também observadas no gráfico de dispersão (Figura 3.4). A coincidência dos grupos em relação às espécies foi corroborada no gráfico de dispersão.

Espécies silvestres podem ser utilizadas com o objetivo de melhorar características físicas, químicas ou sensoriais da polpa do maracujazeiro para diversificação das opções de mercado, como fruta exótica ou para aumentar as propriedades funcionais. A espécie *P. caerulea*, que possui polpa avermelhada e acessos silvestres de *P. edulis* têm apresentado potencial para deixar mais avermelhada a polpa do maracujazeiro-amarelo comercial e melhorar suas propriedades funcionais (FALEIRO et al, 2008b). Por isso, estudos sobre a caracterização bioquímica, juntamente com a caracterização morfoagronômica, citogenética e molecular de espécies nativas e silvestres de maracujazeiros são importantes para complementar e/ou preencher a falta ou pouca informação que existe sobre essas espécies. Essas informações podem auxiliar no desenvolvimento de programas de melhoramento de maracujá visando à melhoria da qualidade nutricional, como o aumento na concentração de substâncias bioativas como os carotenóides.

Tabela 3.2- Áreas dos picos dos carotenóides (mAU.Sec) nos maracujazeiros analisados. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

Espécies/Acessos	<i>P. cincinnata re</i>	<i>P. cincinnata ca</i>	<i>P. nitida</i>	<i>P. setacea</i>	<i>P. edulis amarelo n</i>	<i>P. edulis roxo n</i>	<i>P. edulis comerc a</i>	<i>P. edulis comerc b</i>
Carotenóide	Área (mAU.Sec)							
neoxantina	0,00	39,65	0,00	0,00	0,00	0,00	813,53	607,73
<i>trans</i> -violaxantina	11,31	154,00	0,00	89,57	292,03	0,00	1127,17	386,55
<i>cis</i> -violaxantina	0,00	0,00	0,00	610,08	292,03	0,00	2215,33	780,60
anteraxantina	32,04	87,30	11,25	584,53	106,03	104,80	733,93	275,23
luteína	33,69	39,75	0,00	26,62	0,00	0,00	0,00	0,00
zeaxantina	152,14	13,85	0,00	433,95	34,53	0,00	311,35	67,13
β -criptoxantina	0,00	0,00	0,00	0,00	206,13	154,23	542,83	662,23
prolicopeno	0,00	0,00	0,00	0,00	2785,47	4145,93	2335,57	1281,76
poli- <i>cis</i> - ϵ -caroteno	0,00	0,00	0,00	0,00	2298,53	5135,07	3324,73	1430,72
<i>cis</i> - ζ -caroteno	0,00	0,00	0,00	11,85	6172,40	10409,03	3896,17	1552,97
<i>trans</i> - ζ -caroteno	0,00	0,00	0,00	0,00	5265,40	9633,63	6502,77	1614,27
<i>trans</i> - β -caroteno	57,19	22,00	187,25	1078,45	3105,40	2557,80	2376,85	1650,01
fitoflueno	0,00	0,00	0,00	0,00	355,80	308,15	268,15	144,83
13- <i>cis</i> - β -caroteno	0,00	0,00	0,00	41,78	1414,60	2105,60	1706,00	267,98

Tabela 3.3- Estatísticas descritivas relacionadas às áreas dos picos dos carotenóides (mAU.Sec) e contribuição relativa para a diversidade genética de quatorze carotenóides avaliados em oito acessos de quatro espécies de maracujazeiro. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

Carotenóides	Média	Mínimo	Máximo	Variância	Desvio-Padrão	CRDG ¹ (%)
neoxantina	182,61	0	813,53	109422,38	330,79	0,28
<i>trans</i> -violaxantina	257,58	0	1127,17	143758,12	379,15	0,37
<i>cis</i> -violaxantina	487,55	0	2215,33	582166,15	763,00	1,51
anteraxantina	241,99	11,25	733,93	74111,68	272,23	0,19
luteína	12,51	0	39,75	310,31	17,62	0,00
zeaxantina	126,62	0	433,95	26575,73	163,02	0,07
β -criptoxantina	195,68	0	662,23	70453,14	265,43	0,18
prolicopeno	1318,59	0	4145,93	25900844,50	1609,61	6,71
poli- <i>cis</i> - ϵ -caroteno	1523,63	0	5135,07	3740193,70	1933,96	9,69
<i>cis</i> - ζ -caroteno	2755,30	0	10409,03	1475841,33	3841,59	38,23
<i>trans</i> - ζ -caroteno	2877,01	0	9633,63	14172244,95	3764,60	36,71
<i>trans</i> - β -caroteno	1379,37	22	3105,40	1505486,49	1226,98	3,90
fitoflueno	139,84	0	355,80	108,03	806234,58	0,06
13- <i>cis</i> - β -caroteno	686,77	0	2105,60	130,74	897,91	2,09

¹Contribuição Relativa para a Diversidade Genética, utilizando-se o método de Singh (1981).

Tabela 3.4- Matriz de Distâncias Euclidianas Médias Padronizadas entre oito acessos de quatro espécies de maracujazeiro, baseada nas áreas dos picos (mAU.Sec) de quatorze carotenóides. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

Espécies/Acessos	1	2	3	4	5	6	7	
<i>P. cincinnata re</i>	1	-						
<i>P. cincinnata ca</i>	2	0,272	-					
<i>P. nitida</i>	3	0,570	0,620	-				
<i>P. setacea</i>	4	0,789	0,927	1,039	-			
<i>P. edulis amarelo n</i>	5	1,432	1,447	1,313	1,486	-		
<i>P. edulis roxo n</i>	6	1,819	1,835	1,720	1,911	0,714	-	
<i>P. edulis comerc a</i>	7	2,035	2,040	2,022	1,718	1,431	1,700	
<i>P. edulis comerc b</i>	8	1,212	1,212	1,094	1,231	1,058	1,518	1,197

Tabela 3.5- Matriz de Distâncias de Euclidianas Médias Padronizadas entre oito acessos de quatro espécies de maracujazeiro, baseada na presença e ausência de quatorze carotenóides, utilizando o complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979). Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008

	Espécies/Acessos	1	2	3	4	5	6	7
<i>P. cincinnata</i> re	1	-						
<i>P. cincinnata</i> ca	2	0,091	-					
<i>P. nitida</i>	3	0,429	0,500	-				
<i>P. setacea</i>	4	0,286	0,333	0,636	-			
<i>P. edulis</i> amarelo n	5	0,500	0,529	0,692	0,300	-		
<i>P. edulis</i> roxo n	6	0,714	0,733	0,636	0,444	0,100	-	
<i>P. edulis</i> comerc a	7	0,556	0,474	0,733	0,273	0,083	0,182	-
<i>P. edulis</i> comerc b	8	0,556	0,474	0,733	0,273	0,083	0,182	0,000

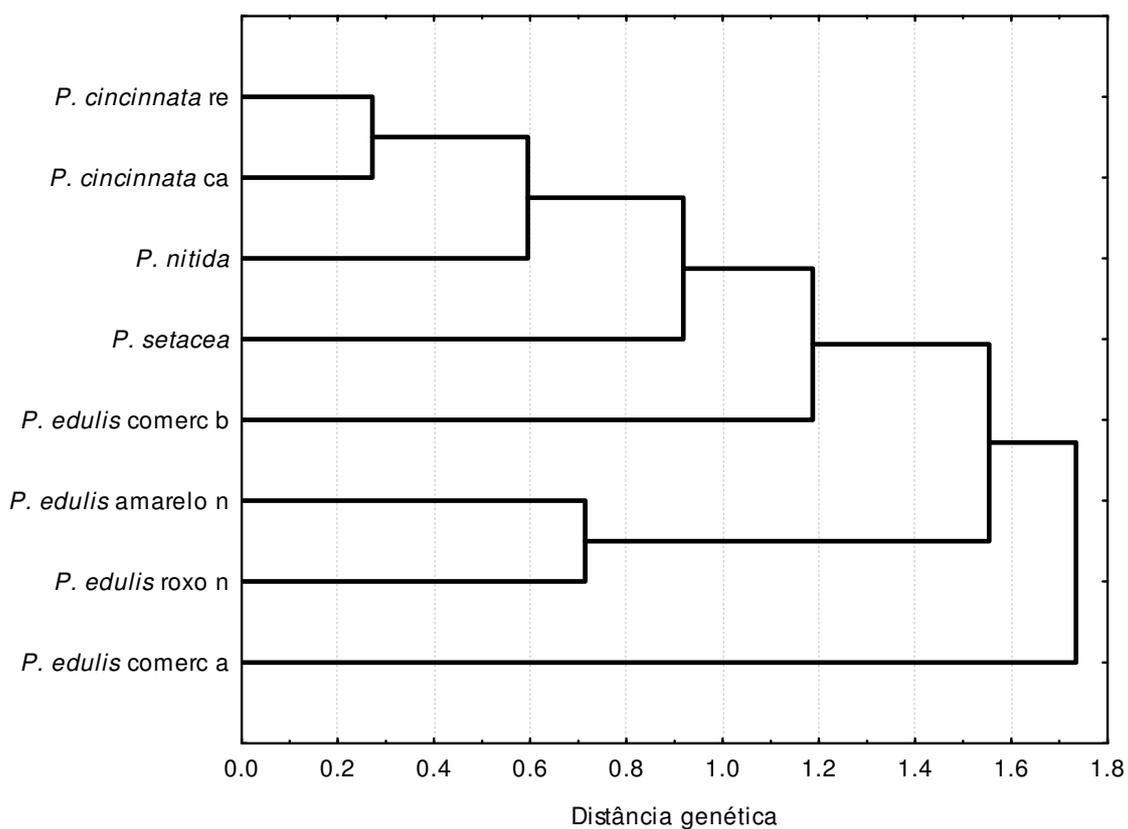


Figura 3.1- Análise de agrupamento de oito acessos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias euclidianas médias padronizadas calculadas utilizando-se as áreas dos picos de quatorze carotenóides. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

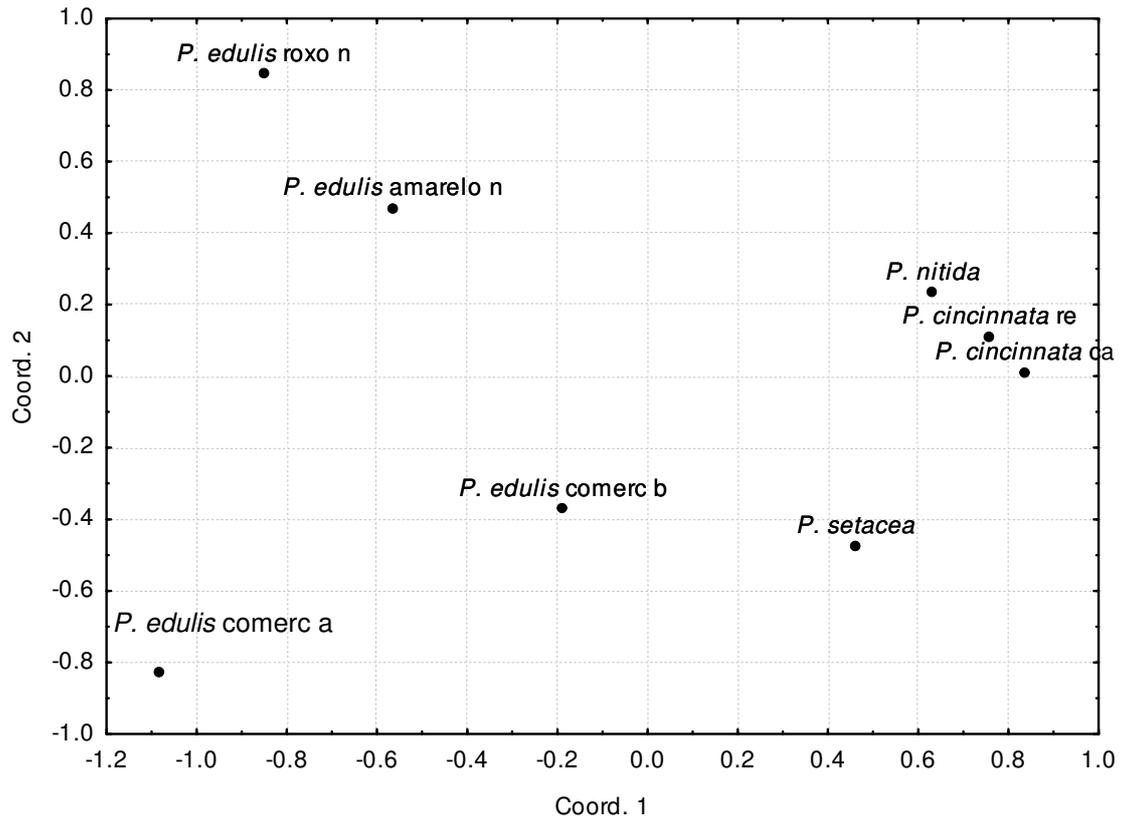


Figura 3.2- Dispersão gráfica de oito acessos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias euclidianas médias padronizadas calculadas utilizando-se as áreas dos picos de quatorze carotenóides. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

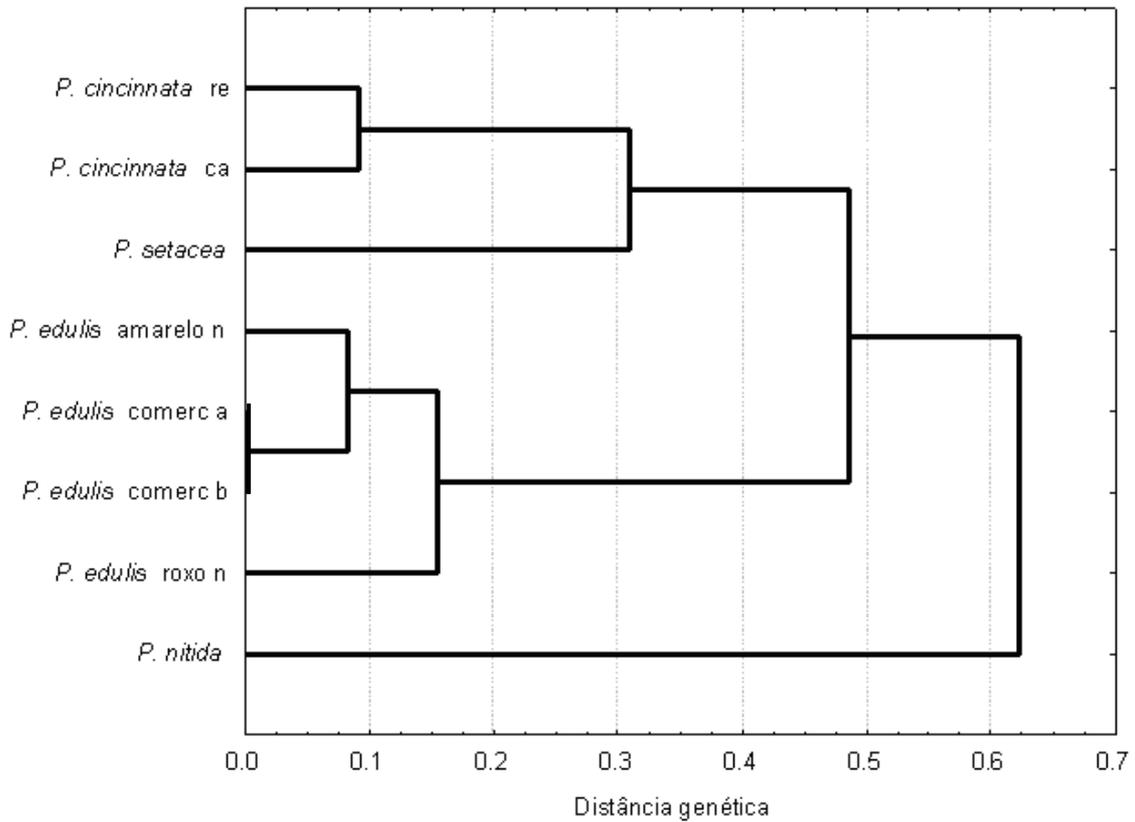


Figura 3.3- Análise de agrupamento de oito acessos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias euclidianas médias padronizadas utilizando-se a presença e ausência de quatorze carotenóides. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

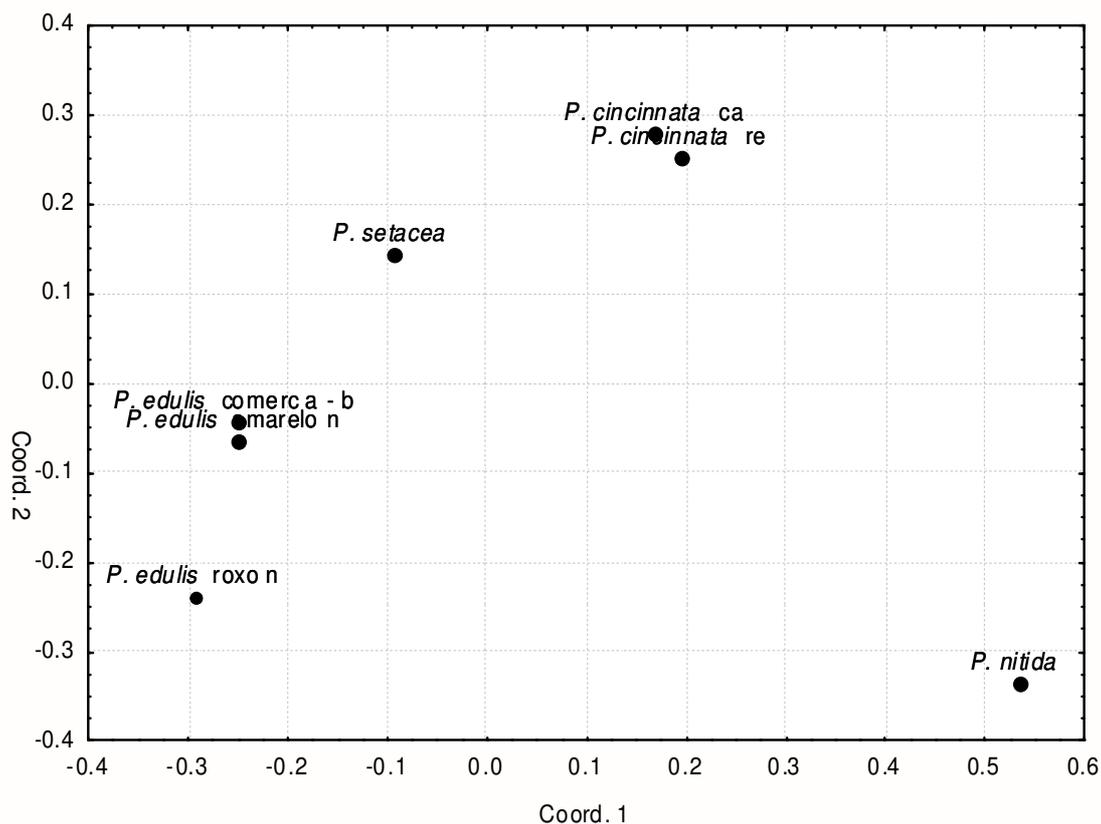


Figura 3.4- Dispersão gráfica de oito acessos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias euclidianas médias padronizadas calculadas utilizando-se a presença e ausência de quatorze carotenóides. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

4 CONCLUSÕES

Houve diversidade genética entre os oito acessos das quatro espécies de maracujazeiro analisados com base no perfil de carotenóides, tanto pelas áreas dos picos dos carotenóides quanto pela presença e ausência de carotenóides.

As áreas dos picos dos carotenóides verificados nas espécies nativas do Cerrado de *P. cincinnata*, *P. edulis* roxo e amarelo, *P. nitida* e *P. setacea* foram diferentes das verificadas na espécie comercial.

Há necessidade de caracterização, conservação e utilização dos maracujazeiros nativos para a diversificação da alimentação em programas de melhoramento genético e a criação de novas alternativas para os sistemas de produção.

5 AGRADECIMENTOS

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

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F. P.; SILVA, N.; QUEIROZ, M. A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 723-730, 2008.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, Rome, v. 17, p. 385-396. 2004.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, p. 1551-1558, 1995.

CARDOSO-SILVA, C. B.; MELO, J. R. F.; PEREIRA, A. S.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; OLIVEIRA, A. C. Estudo da diversidade genética mediante caracterização físico-química de frutos de maracujazeiros-do-sono nativos do estado da Bahia. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 352-358, 2007.

CASTELLEN, M. S.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, E. J.; MONTEIRO FILHO, L. S.; DANTA, J. L. L. Caracterização de acessos do banco ativo de germoplasma de mamão por meio de análise multivariada. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 299-303, 2007.

CERVI, A. C. *Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero Passiflora L., subgênero Passiflora*. Madrid: FONTQUERIA, XLV, 1997. 92 p.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais - estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 474-501.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442p.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T. W. (Ed). **Chemistry and Biochemistry of plant pigments**. 2. ed. London: Academic Press, v. 2, p. 38-165, 1976.

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

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Desafios da Pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina:, DF Embrapa Cerrados, p. 187-209, 2005.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FÁVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de Plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. (Eds). **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008a. p. 45-62.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Pesquisa e desenvolvimento do maracujá no Brasil. In: SILVA, A. G.; ALBUQUERQUE, A. C. S.; MANZANO, N. T.; SILVA, R. C.; RUSSELL, N. C. (Eds). **Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008b.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008c. 58p. il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Nº 207).

GODOY, R. C. B.; LEDO, C. A. S.; SANTOS, A. P.; MATOS, E. L. S.; LIMA, A. A.; WASZCZYNSKYJ, N. Diversidade genética entre acessos de maracujazeiro amarelo avaliada pelas características físico-químicas dos frutos. **Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 316, p. 541-547, 2007.

JUNQUEIRA, K. P. **Características físico-químicas de frutos e variabilidade genética de *Passiflora nitida* Kunth, por meio de RAPD**. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chemistry**, Norwich, v. 78, p. 389-398, 2002.

MELLETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético de maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 54-78.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington DC, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

OLIVEIRA, J. C. de; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá:**

germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 143-158, 2005.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food.** Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 2001. 64 p.

SAS INSTITUTE INC. 1989. **SAS/STAT user's guide. Version 6, 4 ed.** SAS Institute, North Caroline, Cary. 1989.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do cerrado.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 179 p.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic diversity. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 41, n. 2, p. 237-245, 1981.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual]** Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.

VALLS, J. F. M. Caracterização de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L. L (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 281-305.

5 CONCLUSÕES

As diferenças encontradas nos maracujzeiros analisados tanto com relação à metodologia, à análise qualitativa e quantitativa de carotenóides e a diversidade genética reforçam a necessidade de caracterização, conservação e a utilização dessa valiosa fonte de recursos genéticos de maracujá existente no Cerrado.

6 ANEXO

FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES

(RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)

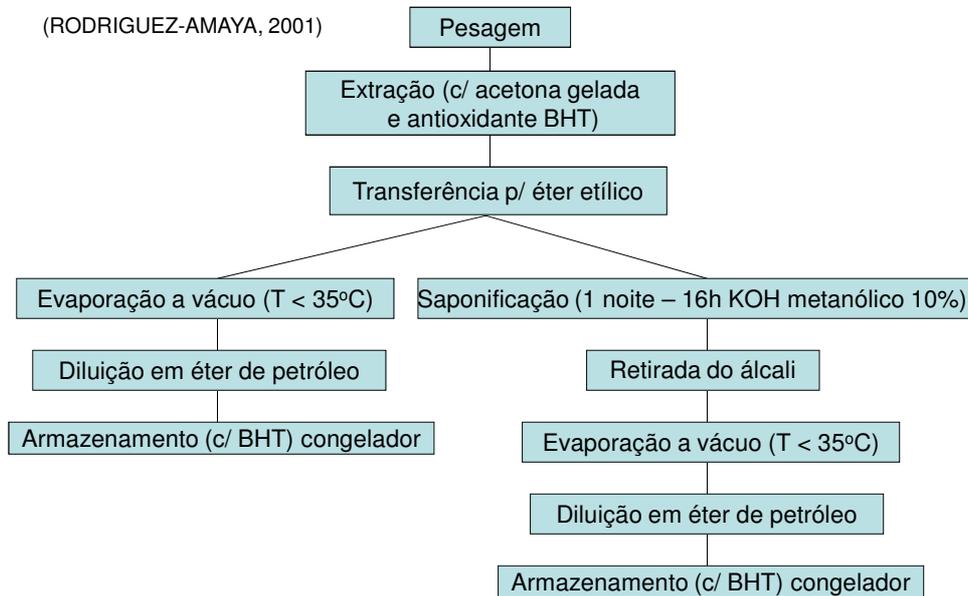


Figura 3: Fluxograma de extração de carotenóides. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.

FLUXOGRAMA DE SEPARAÇÃO DE CAROTENÓIDES

(KIMURA & RODRIGUEZ-AMAYA, 2002; AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004)

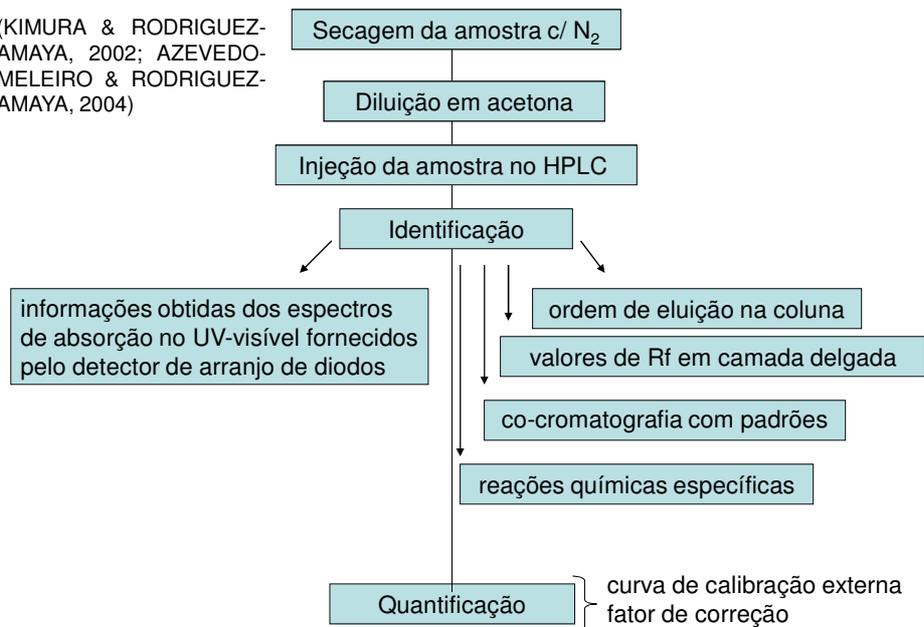


Figura 4: Fluxograma de separação dos carotenóides. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Cerrados, 2008.