UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Caracterização, isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de abacates das cultivares Hass e Fuerte

MARIA AUGUSTA TREMOCOLDI

Piracicaba
2015

MARIA AUGUSTA TREMOCOLDI

Caracterização, isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de abacates das cultivares Hass e Fuerte

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Severino Matias de Alencar

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Tremocoldi, Maria Augusta

Caracterização, isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de abacates das cultivares Hass e Fuerte / Maria Augusta Tremocoldi; orientador Severino Matias de Alencar. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

113 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Antioxidantes 2 Compostos fenólicos 3. Cromatografia 4. Estresse oxidativo 5. Ressonância magnética nuclear 6 Subprodutos agrícolas I. Título

CDU 634.653 : 543.54

A Deus,

AGRADEÇO.

A minha eterna mãezinha,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, pelo entusiasmo e pela persistência concedida nessa caminhada.

A minha família pela confiança depositada em mim e pelo imenso amor e compreensão nos momentos mais difíceis que surgiram ao longo dessa etapa. Obrigada mãe, pai! Obrigada Maria Victória!

Á Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade que possibilitou minha formação acadêmica, a realização deste projeto e realização pessoal.

Ao meu orientador Professor Dr. Severino Matias de Alencar pela oportunidade, confiança, força, atenção e por todo conhecimento adquirido ao longo destes anos. Também pelo exemplo de dedicação, profissionalismo e determinação. E pelos momentos de descontração e amizade.

Á pesquisadora Dra Érica Regina Daiuto, pelo incentivo, força e disposição para ajudar em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Pedro Rosalen e a Dra Carina Denny (Universidade Estadual de Campinas - FOP) pela análise de atividade anti-inflamatória dos resíduos.

À professora Dra Thaís Vieira, pela disponibilidade com a análise no Rancimat.

Ao Professor Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal (Universidade de São Paulo-USP Ribeirão Preto) pela identificação dos compostos.

Ao Professor Dr. Antônio Gilberto Ferreira (Universidade Federal de São Carlos-UFSCar) pela identificação do composto isolado.

À empresa Jaguacy pelo fornecimento da matéria-prima para realização deste projeto.

Às grandes amigas do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da ESALQ-USP, exemplos de determinação e dedicação e por terem enorme paciência para ajudar em todos os momentos e em todas as análises: Adna, Ana, Heloísa, Iva, Juliana, Luciana Ferracini e Priscilla. Também agradeço por outras grandes amigas que passaram pelo laboratório e deixaram saudade: Patrícia, Izabela, Keityane, Lu Mourão, Lucimara e Margarida. Pelas que passaram nesses anos e levarei sempre: Anirene, Luciana Elias, Joze Corrêa, Miriam e Fernanda Papa. As minhas eternas amigas fora do ambiente de trabalho: Kaliana, Patricia Oliveira e Rita Germek. E meu imenso agradecimento por meu amigo-irmão que me ajudou sempre e esteve praticamente comigo em todos os momentos: Felippe Campana.

Aos funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, especialmente à Regina e ao Fábio.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Daiane e Fábio, pela atenção e auxílio.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial a Marília pela colaboração na revisão da tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

Enfim, meu agradecimento a todos que participaram e fizeram parte deste ciclo importante da minha vida, que assim se encerra para outro novamente começar.

* Existem durante nossa vida, sempre dois caminhos a seguir: aquele que todo mundo segue, e aquele que a nossa imaginação nos leva a seguir. O primeiro pode ser mais seguro, o mais confiável, o menos critíco e o que você encontrará mais amigos. Mas, você será apenas mais um a caminhar. O segundo, com certeza vai ser o mais difícil, o que você terá maiores críticas e dificuldades, mas também, o mais criativo, o mais original. Não importa o que você seja, quem você seja, o que deseja na vida, a ousadia em ser diferente reflete na sua personalidade, no seu caráter, naquilo que você é. E é assim que as pessoas lembrarão de você um dia. *

(Ayrton Senna)

RESUMO

TREMOCOLDI, M. A. **Caracterização, isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de abacates das cultivares Hass e Fuerte**. 2015. 113 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

As frutas são fontes importantes de substâncias nutricionais e apresentam em sua constituição compostos com características funcionais, podendo ser apontadas como boas fontes de antioxidantes naturais. O abacate é uma fruta tropical com características nutricionais e organolépticas atrativas, destacando-se a quantidade de lipídeos com alto teor de ácidos graxos insaturados que trazem benefícios à saúde. Além disso, os resíduos de origem agroindustrial como cascas e sementes obtidos durante o processamento contêm compostos bioativos. Entretanto, ainda não existem estudos sobre a capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio, atividade anti-inflamatória e avaliação da composição fenólica em tempo real por HPLC-DAD-UV do fruto e dos resíduos do processamento de abacate, conforme a literatura científica. Por ser uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados, há possibilidade de uma grande variedade de antioxidantes presentes no fruto, dentre os quais compostos fenólicos, para proteção e integridade do óleo contra oxidação. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar, isolar e identificar substâncias com atividade antioxidante da polpa, casca e semente de abacates das cultivares Hass e Fuerte; avaliar a capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio e a atividade anti-inflamatória. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu, o potencial antioxidante foi avaliado pelos métodos do sequestro do radical livre DPPH e ABTS, redução do ferro, auto-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico, estabilidade oxidativa em Rancimat e capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio pelos métodos ORAC, ânion superóxido e ácido hipocloroso. No geral, cascas e sementes de ambas as cultivares apresentaram maior atividade antioxidante em relação à polpa dos frutos. Os compostos de maior atividade antioxidante dos resíduos do abacate foram quantificados pelas técnicas HPLC-DAD-UV e LC-MS/MS e confirmados por RMN. Nas cascas de ambas as cultivares foram encontrados o ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico, procianidina B_2 e epicatequina, enquanto que nas sementes foram o ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico, procianidina B_1, catequina e epicatequina. Os resíduos das duas cultivares apresentaram elevada capacidade de sequestro do radical superóxido e ácido hipocloroso. Os compostos fenólicos mais frequentemente encontrados nas amostras pela técnica de GC/MS foram o ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico e epicatequina. A casca da cultivar Fuerte suprimiu significativamente a produção de TNF-α e NO, envolvidos no processo inflamatório, e pode estar relacionado ao alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante encontrados nesta espécie. Portanto, resíduos da cadeia de processamento de abacate podem ser considerados fontes de compostos bioativos de grande potencial funcional.

Palavras-chave: Composição fenólica. Espécies reativas de oxigênio. Atividade anti-inflamatória. Fracionamento. *Persea americana* Mill.

ABSTRACT

TREMOCOLDI, M. A. **Characterization, isolation and identification of compounds with antioxidant activity of Hass and Fuerte avocados cultivars**. 2015. 113 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Fruits are important sources of nutritional substances and are rich in compounds with functional features that can be identified as good sources of natural antioxidants. The avocado is a tropical fruit with attractive nutritional and organoleptic characteristics, especially the amount of lipids with high content of unsaturated fatty acids that provide health benefits. Furthermore, agroindustrial residues such as peels and seeds obtained during processing contain bioactive compounds. However there are no studies about evaluate the capacity for scavenging reactive oxygen species, the anti-inflammatory activity and the phenolic composition of fruits and residues from avocado according to the scientific literature. A source of polyunsaturated fatty acids, the fruit must contain a variety of antioxidants, phenolic compounds among which, for protection and integrity against oil oxidation. The goal of the present study was to characterize, isolate and identify substances with antioxidant activity of the pulp, peel and seed of Hass and Fuerte avocados cultivars; evaluate the capacity for scavenging reactive oxygen species, the anti-inflammatory activity. The total phenolics content was measured by the Folin-Ciocalteu method. The methods for evaluating the antioxidant activity used were the DPPH free radical and ABTS, β-carotene bleaching, reduction of Fe^{3+}, oxidative stability in Rancimat, evaluate the capacity for scavenging reactive oxygen species by ORAC, superoxide anion and hypochlorous acid. Peels and seeds of both cultivars showed higher antioxidant activity than the pulp of the fruit. Compounds present in peels and seeds from both cultivars were quantified through LC-DAD-UV and LC-MS/MS and confirmed through RMN. The compounds exhibiting the greatest antioxidant activity were trans-5-O-caffeoyl-D- quinic acid, procyanidin B_2 and epicatechin in the peels and trans-5-*O*-caffeoyl-D-quinic acid, procyanidin B_1, catechin and epicatechin in the seeds. Residues from both cultivars exhibited high superoxide radical and hypochlorous acid-scavenging capacity. Phenolic compounds found most frequently in the samples by GC/MS technique were trans-5-*O*-caffeoyl-D-quinic acid and epicatechin. Peel from the cultivar Fuerte significantly suppressed the production of TNF-α and NO, which are involved in inflammatory processes, and this suppression may be related to the high phenolic content and antioxidant activity observed. Residues of avocado processing can therefore be considered sources of bioactive compounds with high functional potential.

Keywords: Phenolic compounds. Reactive oxygen species. Anti-inflammatory activity. Fractionation. *Persea americana* Mill.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DA LITERATURA.....17
2.1 Abacate.....17
2.2 Composição química do fruto 19
2.2.1 Compostos fenólicos 20
2.2.1.1 Flavonoides 22
2.2.1.1.1 Catequinas 24
2.2.1.1.2 Proantocianidinas 25
2.2.1.2 Ácidos fenólicos.....28
2.3 Formação das espécies reativas do oxigênio 29
2.4 Antioxidantes 31
2.5 Avaliação da atividade antioxidante.....33
2.5.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH$^{\bullet}$ 33
2.5.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS 33
2.5.3Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....34
2.5.4 Autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico.....35
2.5.5 Método Rancimat 35
2.5.6 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) 36
2.5.7 Ânion superóxido e Ácido hipocloroso.....36

3 MATERIAL E MÉTODOS 38
3.1 Matéria-prima.....38
3.1.1 Delineamento experimental.....38
3.2 Preparo do extrato bruto da polpa, casca e semente.....38
3.3 Avaliação do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante do extrato bruto da polpa, casca e semente 39
3.3.1 Teor de compostos fenólicos totais 39
3.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH.....39
3.3.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS 40
3.3.4 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro-FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) 41
3.3.5 Autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico.....41
3.3.6 Estabilidade oxidativa pelo método do Rancimat 42
3.4 Espécies reativas do oxigênio 42
3.4.1 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).....42
3.4.2 Sequestro do radical ânion superóxido ($O2^{\bullet-}$) 43
3.4.3 Ácido hipocloroso (HOCl).....43
3.5 Determinação simultânea de compostos fenólicos a atividade antioxidante *on line* por HPLC-DAD-UV 44
3.6 Fracionamento cromatográfico 46
3.6.1 Purificação do extrato bruto da casca e da semente em resina Amberlite XAD2 46
3.6.2 Fracionamento em gel Sephadex LH-20 46
3.6.3 Cromatografia em camada delgada em fase normal semi-preparativa.....47
3.7 Análises Cromatográficas 47

3.7.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)..... 47
3.7.2 Cromatografia gasosa em Espectrometria de Massa (GC/MS) 47
3.7.2.1 Derivatização- foramação de derivados do trimetilsilil (TMS) 47
3.7.2.2 Análise em cromatógrafo gasoso com Espectrometria de Massa (GC/MS)..... 48
3.7.3 Cromatografia líquida com Espectrometria de Massa (LC-MS/MS).....48
3.7.4 Análise por Ressonância Mangnética Nuclear (RMN) 49
3.8 Atividade anti-inflamatória..... 50
3.8.1 Crescimento celular 50
3.8.2 Viabilidade celular..... 51
3.8.3 Determinação da produção de TNF-α 51
3.8.4 Determinação da produção de óxido nítrico..... 51
3.9 Análise estatística 52

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 53
4.1 Teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante do extrato bruto da polpa, casca e semente 53
4.1.1 Teor de compostos fenólicos totais 53
4.1.2 Atividade sequestrante do radical livre DPPH 56
4.1.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS..... 58
4.1.4 Capacidade de redução do ferro (FRAP)..... 60
4.1.5 Autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico 62
4.1.6 Estabilidade oxidativa pelo método do Rancimat 63
4.1.7 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) 65
4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto da casca e da semente para o isolamento dos compostos bioativos 67
4.2.1 Purificação do extrato bruto da casca em resina Amberlite XAD2..... 69
4.2.2 Purificação do extrato bruto da semente em resina Amberlite XAD2 81
4.3 Quantificação dos compostos bioativos por HPLC-DAD-FR *on line* na polpa, casca e semente de abacate das cultivares Hass e Fuerte..... 87
4.4 Atividade anti-inflamatória..... 94
4.5 Correlação entre a capacidade antioxidante, radicais sintéticos e espécies reativas..... 96

5 CONCLUSÕES 97

REFERÊNCIAS 98

1 INTRODUÇÃO

Atualmente há grande interesse da população por bem estar e qualidade de vida, o que tem motivado as pesquisas na busca por compostos naturais benéficos ao organismo em substituição aos sintéticos utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica (RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011).

O abacateiro (*Persea americana* Mill) é uma frutífera que pertence à família Lauraceae a ao gênero *Persea* que inclui todas as variedades de abacates de interesse comercial no mundo (KOLLER, 2002). O fruto possui notável qualidade nutricional, pois apresenta uma grande quantidade de vitaminas, minerais, proteínas e fibras, além do elevado teor de ácidos graxos insaturados que trazem benefícios à saúde (YAHIA, 2010). Além disso, contém níveis elevados de compostos fitoquímicos bioativos, incluindo a vitamina E, carotenoides, esteróis, compostos fenólicos, entre outros (DING et al., 2007; MEYER; TERRY, 2010; HURTADO-FERNÁNDEZ; CARRASCO-PANCORBO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2011). Embora o abacate seja uma fruta nutritiva, pouco ainda se conhece sobre a composição fitoquímica e propriedades antioxidante, principalmente os de origem tropical.

Apesar das frutas serem ricas em nutrientes e compostos bioativos, vários são os casos em que esses constituintes se concentram majoritariamente nas cascas e sementes (ABRAHÃO et al., 2010; MELO et al., 2008). Assim, muitos subprodutos de origem agroindustrial, contêm compostos bioativos com potencial aplicação como antioxidantes em alimentos (DENG et al., 2012). Além disso, compostos de origem vegetal, como os fenólicos, também possuem atividade anti-inflamatória (DABAS et al., 2013), atividade antibacteriana (NAGARAJ et a., 2010; RAYMOND; CHIA; DYKES, 2010), antivirais, anticancerígenas e antialergênicas (KOO; SUHAILA, 2001; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

A composição química de resíduos de abacates já foi avaliada por Matsusaka, Kawabata e Kasai (2003) e Wang, Bostic e Gu (2010), porém nestes estudos os autores sempre analisaram o potencial antioxidante contra espécies reativas sintéticas, tais como DPPH e ABTS. Assim, esta é a primeira vez em que os compostos fenólicos bioativos são avaliados em tempo real por HPLC-DAD-UV, bem como feita a caracterização da capacidade antioxidante dos extratos contra espécies reativas de oxigênio (ROS). Wang, Bostic e Gu (2010) também identificaram compostos presentes na polpa, casca e semente de abacates de diferentes cultivares, entretanto, vários não foram possíveis de serem identificados, mesmo utilizando a técnica de espectrometria de massas de alta resolução. Desta forma, evidencia-se

a necessidade de um trabalho de isolamento, para na sequencia se identificar os compostos isolados com atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas específicas, como Espectrometria de Massa (MS) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Além das contribuições à saúde proporcionadas pelos antioxidantes presentes em frutas, estes compostos também têm despertado grande interesse na esfera industrial, já que os antioxidantes sintéticos mais usados pela indústria de alimentos como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) (RAMALHO; JORGE, 2006) têm despertado preocupação quanto às doses de segurança e toxicidade (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação desse substrato de maneira eficaz (HALIWELL, 2000; HALIWELL, 2012). A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS, 2006; VASCONCELOS, 2007).

Na indústria de alimentos, o uso de antioxidantes sintéticos e seus mecanismos de ação têm sido muito estudados, principalmente com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação de óleos, gorduras e alimentos gordurosos, assim a sua substituição pelos antioxidantes naturais também podem ser benéficos para a saúde. Neste sentido, a grande demanda social por produtos naturais aliada às preocupações do setor industrial na diminuição de perdas econômicas e do alto impacto dos resíduos descartados no meio ambiente, têm impulsionado e aumentado significativamente as pesquisas nos últimos anos por novas substâncias bioativas, dentre as quais os antioxidantes naturais, os quais tem sido cada vez mais elucidados e disseminados.

Pelo fato do fruto do abacate, juntamente com a casca e semente, ser uma fonte de antioxidantes naturais, o que pode justificar a estabilização do próprio óleo contido na polpa, o estudo dos fitoquímicos desses materiais favorece a descoberta de novos princípios ativos para uso pela indústria de alimentos, contribuindo simultaneamente para melhoria da qualidade de vida dos consumidores e geração de novos conhecimentos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar, isolar e identificar substâncias com atividade antioxidante da polpa, casca e semente de abacates das cultivares Hass e Fuerte; avaliar a capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio e a atividade anti-inflamatória.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Abacate

O abacate (*Persea americana* Mill.) é uma importante fruta tropical nativa da América Central e do México, e produzida em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (KATE; LUCKY, 2009). O México é o maior produtor mundial, com produção anual de 1.264.140 toneladas, seguido do Chile (368.568t), República Dominicana (295.081t) e Indonésia (275.953t). O Brasil ocupa a nona posição, com 160 mil toneladas, com sua produção concentrada principalmente na região Sudeste, sendo o estado de São Paulo (85t) o maior produtor seguido de Minas Gerais (36t) (AGRIANUAL, 2014), o que correspondem também a 60% da área cultivada e 70% da produção nacional (IBGE, 2014).

As variedades comerciais são em geral híbridas das espécies pertencentes a três raças de origens diferentes, Antilhana (*Persea americana* Mill. variedade americana), Guatemalense (*Persea americana* Mill. variedade guatemalensis) e Mexicana (*Persea americana* Mill. variedade drymifolia), as quais possuem características específicas (CAMPOS, 1988; DUARTE FILHO et al., 2008), que foram identificadas conforme as regiões de origem do abacateiro (CAMPOS, 1988). A possibilidade de hibridação confere à planta condições de adaptação às diferentes situações edafoclimáticas. A raça antilhana, originária da América Central, é a mais sensível a baixas temperaturas. A raça guatemalense é a originária de regiões altas da América Central e, por isso, é mais resistente ao frio. As variedades da raça mexicana são as mais tolerantes a baixas temperaturas, pois são originárias de regiões de elevada altitude do México e da Cordilheira dos Andes (TEIXEIRA et al., 1991). Os frutos de algumas variedades cultivadas em regiões mais frias apresentam maior teor de óleo (KOLLER, 2002), portanto conhecer a variedade de abacateiro que se pretende cultivar é de grande importância, haja vista que cada mercado tem suas preferências particulares em relação às características dos frutos.

O abacate é uma das plantas mais produtivas por unidade de área cultivada (TANGO et al., 2004; MOOZ et al., 2012), existindo no mundo mais de 500 variedades do fruto (DEMBITSKY et al., 2011). No Brasil são encontradas um grande número de variedades em diversas regiões, cujos frutos se diferem na composição química (TANGO et al., 2004; MOOZ et al., 2012), na forma e na cor (DEMBITSKY et al., 2011). As variedades preferidas no mercado nacional para consumo são as de tamanho grande com baixo teor de óleo. Em contrapartida, no mercado europeu o fruto pequeno com teor de óleo elevado tem maior

aceitação (RAMOS; SAMPAIO, 2008). O teor de lipídeos na polpa varia conforme a cultivar, estágio de amadurecimento do fruto e as condições de crescimento geográfico da planta, chegando a 30% em algumas cultivares e a 5% somente em outras (TANGO et al., 2004; SALGADO et al., 2008).

As cultivares existentes apresentam frutos com os mais variados tamanhos e pesos, assim como diferentes proporções de casca, polpa e semente (DONADIO, 1992). No mercado interno, as cultivares mais comercializadas são ‘Simmonds’, ‘Barbieri’, ‘Collison’, ‘Quintal’, ‘Fortuna’, ‘Breda’, ‘Reis’, ‘Solano’, ‘Imperador’, ‘Ouro Verde’, ‘Campinas’ ‘Geada’ e ‘Margarida’ (LEONEL; SAMPAIO, 2008), com teor de óleo que varia de 2 a 20%, (TANGO et al., 2004, OLIVEIRA et al., 2013). Para exportação, as principais são ‘Hass’ e ‘Fuerte’, conhecidas popularmente como ‘Avocado’, que em menor escala, também são consumidas no país (FRANCISCO; BAPTISTELLA, 2005; DAIUTO; TREMOCOLDI; VIEITES, 2010; VIEITES; DAIUTO; FUMES, 2012), e apresentam teor de óleo entre 18 e 25% (CRIZEL, 2008; DAIUTO et al., 2010).

A produção brasileira de abacates é quase toda voltada para abastecer o mercado interno, entretanto, a produção destas duas cultivares visando à exportação, tem aumentado para abastecer os países da América do Sul e Europa (CAMARGO; MANCO, 2004).

A empresa Jaguacy, situada na cidade de Bauru, interior de São Paulo é a maior produtora destes frutos, e para manter o alto padrão exigido no mercado internacional investiu em alta tecnologia e na certificação de produtos, e hoje essas cultivares possuem o selo GlobalGap. Desta forma, conquistou credibilidade e atualmente compete com outros grandes exportadores como o México, Chile e África do Sul. Atualmente são comercializadas cerca de 4.000 toneladas de “Avocado” por ano, atendendo a demanda para países como a França, Alemanha e Inglaterra.

A cultivar Fuerte é um híbrido guatemalense-mexicano. O fruto é piriforme, pesa de 150 a 350 gramas, possui casca lisa, fina, sem brilho e verde, não mudando de coloração com o amadurecimento. A época de produção dos frutos para exportação varia de março a junho. A cultivar Hass é também um híbrido guatemalense-mexicano, entretanto o fruto é oval-piriforme, pesa de 180 a 300 gramas, possui casca grossa, rugosa, mudando de cor durante o amadurecimento para marrom escuro. A época de produção é de junho a setembro (DONADIO, 1995).

O abacate é uma das frutas que mais se destaca pela sua qualidade nutricional e pelo alto potencial econômico, justificando plenamente a expansão do seu consumo.

Comparando-se a composição média da polpa de abacate, constata-se que o mesmo apresenta alto valor energético comparado a outras frutas tropicais (MOOZ et al., 2012), teores elevados de ácidos graxos monoinsaturados (oléico e palmitoléico) e ácidos graxos saturados (palmítico), baixo teor de ácido graxo polinsaturado (linoléico) e menor conteúdo do ácido esteárico (saturado) (TANGO et al., 2004; LU et al., 2009; YAHIA, 2010; OLIVEIRA et al., 2013), sendo muito próxima ao azeite de oliva azeite de oliva (SILVA et al., 2012) e até mesmo da noz macadâmica (MARO et al., 2012). Abacates são ricos em vitaminas E, B_6, ácido ascórbico, β-caroteno (BERGH, 1992; CORRAL-AGUAYO et al., 2008), fósforo, magnésio e potássio (SLATER; SHANKMAN; SHEPERD; ALFIN-SLATER, 1975; BERGH, 1992; WHILEY; SCHAFFER; WOLSTENHOLME, 2002; DAIUTO et al., 2014).

Além disso, elevados teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante encontrados nas cascas e sementes (WANG et al., 2010; YUUKO; JUN, 2010; DAIUTO et al., 2014) tem impulsionado pesquisas relacionadas a utilização destes resíduos como fonte de aditivos alimentares (AYALA-ZAVALA et al., 2011; RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011, VINHA; MOREIRA; BARREIRA, 2013, DAIUTO et al., 2014), na indústria farmacêutica e dermocosmética (VINHA; MOREIRA; BARREIRA, 2013). Também possuem ação anti-inflamatória (ROSENBLAT et al., 2010), inseticida (LEITE et al., 2009; ABE et al., 2005), fungicida (LEITE et al., 2009) e antimicrobiana (NAGARAJ et al., 2010; RAYMOND; CHIA; DYKES, 2010). Vale ressaltar que assim como o teor de óleo no fruto, o conteúdo destes compostos bioativos encontrados na polpa juntamente com seus resíduos pode ser alterado dependendo da cultivar, das condições edafoclimáticas e de cultivo, que incluem temperatura; luminosidade; adubação e irrigação; do estado de amadurecimento dos frutos, colheita e pós-colheita, processamento e armazenamento (WANG et al., 2012; VINHA et al., 2012).

O fruto também é apreciado de diferentes maneiras de acordo com hábitos alimentares de cada país. No Brasil, o fruto é consumido principalmente na forma de sobremesas, batido com leite, açúcar e suco de limão. Em outros países é apreciado na forma de saladas, sopas e molhos (DAIUTO; VIEITES, 2008).

2.2 Composição química do fruto

Os compostos químicos já identificados nas polpas de abacates de diferentes cultivares, segundo a literatura, foram procianidina, catequina, epicatequina (RODRÍGUEZ-

CARPENA et al., 2011), ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido protocatecuico (GOLAN et al., 1977; TORRES et al., 1987; GOLUKCO; OZDEMIR, 2010; RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011), *p*-hidroxibenzóico, ácido resorcílico, ácido gálico (TORRES et al., 1987; GOLUKCO; OZDEMIR, 2010; RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011), vanílico, isovanílico, siríngico, sinápico (TORRES et al., 1987; RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011), rutina e quercetina (GOLUKCO; OZDEMIR, 2010).

Procianidinas (WANG; BOSTIC; GU, 2010; RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011; KOSINSKA et al., 2012), catequina (TERASAWA; SAKAKIBAR; MURATA, 2006; WANG; BOSTIC; GU, 2010; RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011; KOSINSKA et al., 2012), ácido 5-*O*-cafeoilquínico (KOSINSKA et al., 2012), epicatequina (TERASAWA; SAKAKIBAR; MURATA, 2006; WANG; BOSTIC; GU, 2010; RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011), quercetina (KOSINSKA et al., 2012; RODRIGUEZ-CARPENA et al., 2011), ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, siringico e gálico (RODRIGUEZ-CARPENA et al., 2011) foram os compostos já identificados nas cascas de abacates.

Em sementes foram encontrados catequina, epicatequina (GEISSMAN; DITTMAR, 1965; MATSUSAKA, KAWABATA; KASAI, 2003; WANG; BOSTIC; GU, 2010; RODRIGUEZ-CARPENA et al., 2011; KOSINSKA et al., 2012), procianidinas (RODRIGUEZ-CARPENA et al., 2011; KOSINSKA et al., 2012; WANG, BOSTIC; GU, 2010), ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido 3-*O*-*p*-cumaroilquínico (KOSINSKA et al., 2012), ácido *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, siringico e gálico (RODRIGUEZ-CARPENA et al., 2011), kaempferide, ácido clorogênico, rutina e canferol (PAHUA-RAMOS et al., 2012).

Estes compostos, assim como suas respectivas quantidades, são afetados também pelo tempo e época de colheita. Portanto durante o amadurecimento do fruto, normalmente se observa decréscimo na quantidade dos compostos fenólicos totais (GOLUKCO; OZDEMIR, 2010).

Os grupos de compostos fenólicos de maior importância e ocorrência nos frutos e resíduos de abacate são abordados na sequência.

2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza, sendo que já foram detectados pelo menos 8000 destes compostos em plantas (SILVA et al., 2010).

Pertencem a uma classe de grande diversidade de estruturas simples e complexas, que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Sua estrutura pode variar desde moléculas simples a moléculas com alto grau de polimerização (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006), estando presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998). Fazem parte do metabolismo secundário das plantas, podem ser formados em condições de estresse e estão envolvidos na defesa contra organismos patogênicos, radiações ultravioletas, ferimentos e infecções (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Diversos fatores podem influenciar o conteúdo destes metabólitos secundários nos vegetais, como a sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataques de patógenos (Figura 1), sendo que a constância de concentrações de metabólitos secundários é praticamente uma exceção (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

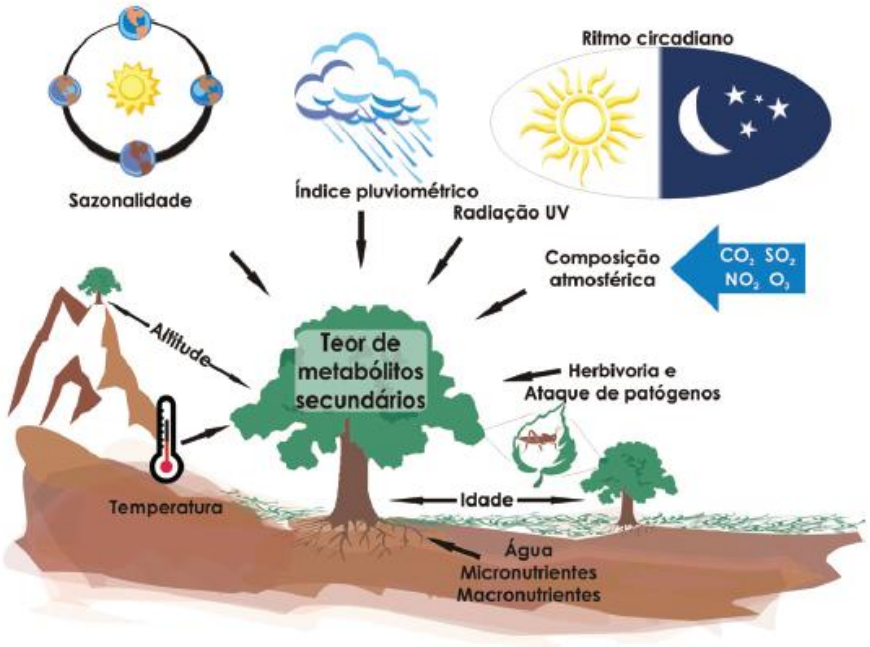


Figura 1 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas
Fonte: Gobbo-Neto e Lopes (2007).

São importantes na qualidade sensorial e nutricional das frutas e vegetais, contribuindo na cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa, sendo, portanto essencial o conhecimento destes compostos tanto qualitativa quanto quantitativamente (TOMAS-BARBERAN; FERRERES; GIL, 2000).

Os compostos fenólicos são multifuncionais, pois atuam de diversas maneiras: combatendo os radicais livres por meio da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática; quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^{+}; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio e reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (KYNGMI; EBELER, 2008). A atividade antioxidante destes compostos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais (DEGÁSPARIE; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os fenóis simples incluem os compostos que possuem apenas um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxílicos. Os polifenóis são os que possuem múltiplos anéis fenólicos em sua estrutura e podem ser divididos em classes de acordo com o número de anéis fenólicos e os elementos estruturais que os ligam (WATERHOUSE, 2002; D'ARCHIVIO et al., 2007).

Os principais grupos de compostos fenólicos são: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (flavonois, flavanonas, isoflavonas, flavanois, flavonas e antocianidinas), estilbenos, ligninas e taninos (D'ARCHIVIO et al., 2007).

2.2.1.1 Flavonoides

O grupo dos flavonoides é um dos de maior importância, sendo que já foram identificados mais de 5000 flavonoides até o momento (LAMPILA et al., 2009). Sua estrutura química C6-C3-C6 é constituída por dois anéis aromáticos (A e B), unidos por um anel heterocíclico, que caracteriza o núcleo flavânico (C) (D'ARCHIVIO et al., 2007) (Figura 2).

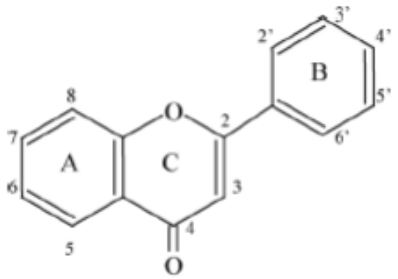


Figura 2 - Núcleo básico dos flavonoides, compostos por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)
Fonte: Adaptado de Merken e Beecher (2000).

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, dentre as quais estão proteção contra a incidência de raios ultravioleta (UV) e visível; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Quimicamente, os flavonoides são doadores de elétrons, pois apresentam estruturas químicas conjugadas em anel, ricas em grupos hidroxilas, que têm potenciais ações antioxidantes por reagirem e inativarem ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1O_2$) e/ou estabilizar radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (MACHADO et al., 2008; JIMÉNEZ et al., 2009). Além disso, possuem também ação anti-inflamatória, anti-hepatóxica, antialérgica, antitumoral (MUZITANO et al., 2006; HUANG et al., 2007). Assim, a ingestão de flavonoides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares, câncer, Alzheimer, entre outras (AYALA-ZAVALA et al., 2011).

As diferentes substituições do anel C resultam nas principais classes dos flavonoides, ou seja, flavonois, flavanonas, isoflavonas, flavanois, flavonas e antocianidinas (HOLLMAN; KATAN, 1999; WATERHOUSE, 2002) (Figura 3).

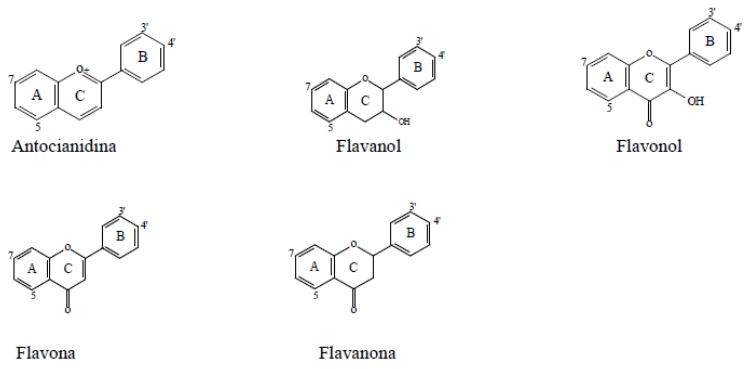


Figura 3 - Principais classes dos flavanoides
Fonte: Adaptado de Tsao (2010) e Ignat, Volf e Popa (2011).

Já as substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (PIETTA, 2000), o que se explica a grande diversidade destes compostos na natureza. Estas substituições podem incluir oxigenação, hidroxilação, metilação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação (HOLLMAN; KATAN, 1999; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006), formando assim os compostos de cada classe.

Os compostos pertencentes à subclasse dos flavonois incluem o kaempferol, a quercetina, miricetina; os pertencentes às flavanonas incluem naringenina e hesperetina; como exemplo de isoflavonas podem citar a genistina, genisteína, daidzeína e daidzina; pertencem à subclasse das flavonas a crisina, apigenina, rutina e luteolina e os pertencentes à subclasse das antocininas incluem a cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006).

A classe do flavanol, frequentemente chamada de flavan-3-ois, é a mais abundante e complexa dos flavonoides, as quais pertencem os monômeros catequina, epicatequina e galocatequina. Também podem formar estruturas poliméricas, chamadas proantocianidinas que se dividem em dois grupos: as procianidinas, derivadas de catequina e epicatequina e as prodelfinidinas, derivadas de galocatequina e epigalocatequina (TSAO, 2010).

2.2.1.1.1 Catequinas

As catequinas são constuídas por um anel floroglucinol (A), um anel pirânico (C) e um anel catecol (B) (TSAO, 2010) (Figura 4).

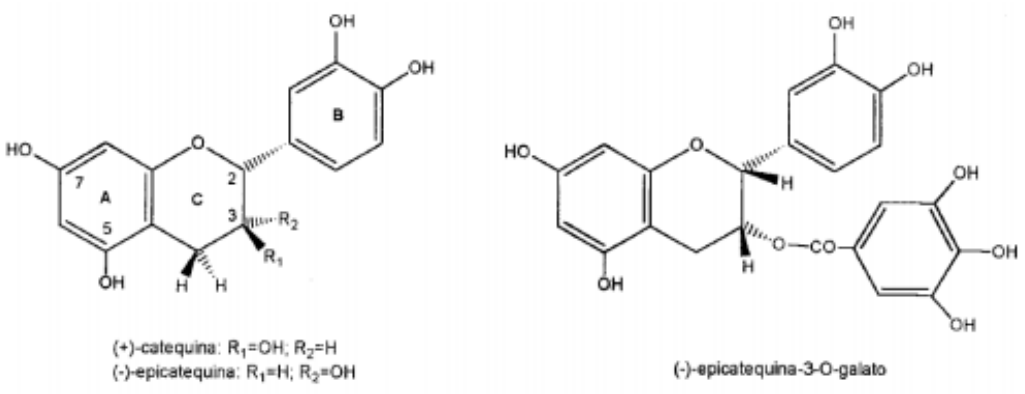


Figura 4 - Estrutura das catequinas mais abundantes na natureza
Fonte: Adaptado de Tsao (2010).

Os carbonos C2 e C3 desta unidade são assimétricos constituindo centros quirais, dos quais resultam em 4 isômeros de acordo com as substituições, formando (+), (-)-catequina e (+), (-)-epicatequina. Nos isômeros (+)-catequina e (+)-epicatequina o grupo 3,4-di-hidrofenilo ligado ao carbono C2 e o grupo hidroxilo no carbono C3 surgem em posição trans (2R, 3S) e nos restantes isômeros em posição cis (2R, 3R). Na natureza os isômeros mais abundantes são a (+)-catequina e a (-)- epicatequina. Estes compostos também podem se encontrar esterificados com um grupo galoílo na posição C3 (ésteres do ácido

gálico). Os flavonoides catequina, epicatequina e epigalocatequina são os constituintes monoméricos dos taninos condensados, embora eles sejam também muito comuns como monômeros livres (WATERHOUSE, 2002; TSAO, 2010).

Dentre seus benefícios à saúde humana destacam-se a redução na incidência de certos tipos de câncer, redução do colesterol sérico e estimulação do sistema imunológico (COZZOLINO, 2009).

2.2.1.1.2 Proantocianidinas

As proantocianidinas, também conhecidas por taninos condensados, são polímeros constituídos por duas ou mais unidades monoméricas de (+)-catequina e (-)-epicatequina. Estes compostos são hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A e variam na estereoquímica do carbono 3 do anel C e no grau de hidroxilação do anel B. Podem dividir-se em 2 grupos: procianidinas, constituídas por subunidades de (+)-catequina e (-)- epicatequina, e prodelfinidinas constituídas por subunidades de galocatequina e epigalocatequina. As procianidinas são os tipos de proantocianidinas mais abundantes nas plantas (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; TSAO, 2010) (Figura 5).

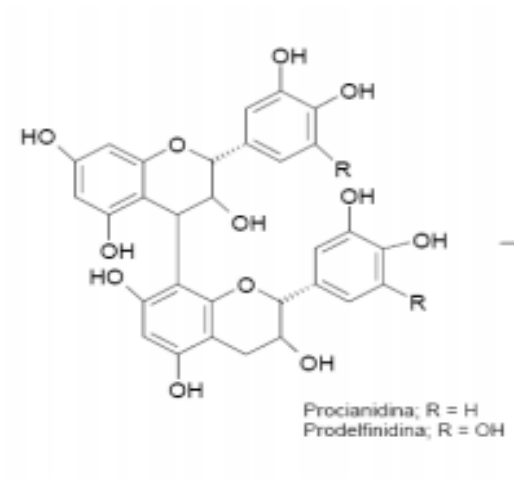


Figura 5- Estrutura química da prociantocianidina
Fonte: Adaptado de Crozier; Clifford e Ashihara (2006).

As procianidinas podem ser divididas em grupos com base no tipo de ligação das unidades monoméricas. As ligações interflavanol mais comuns são estabelecidas entre o C4 de uma unidade superior e o carbono C6 ou C8 da unidade inferior. As estruturas diméricas destes compostos com esta ligação são ditas do tipo B ou do tipo A ($C_{30}H_{24}O_{12}$) se, para além da ligação entre átomos de carbono, apresentam uma ligação éter C_2-O-C_7 adicional entre as

duas unidades monoméricas (Figura 6) (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006). Procianidinas do tipo A apresentam menor atividade antioxidante quando comparadas com as do tipo B (KONDO et al., 2000).

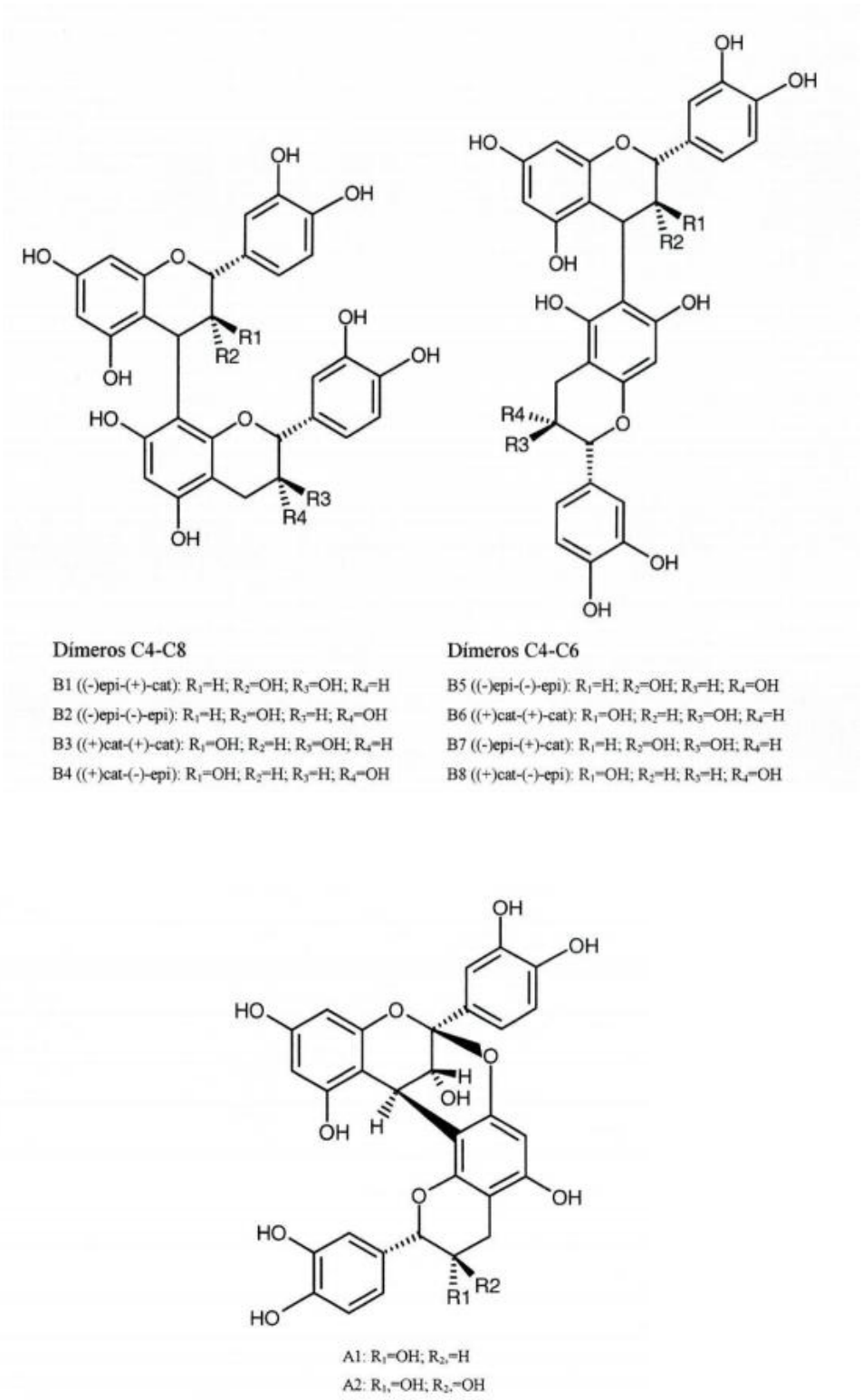


Figura 6- Estrutura de procianidinas diméricas do tipo B e A.
Fonte: Adaptado de Crozier, Clifford e Ashihara (2006).

As procianidinas triméricas podem ser do tipo C, se as ligações interflavonoides são do tipo B (Figura 7), ou do tipo D, se uma ligação é do tipo B e outra é do tipo A.

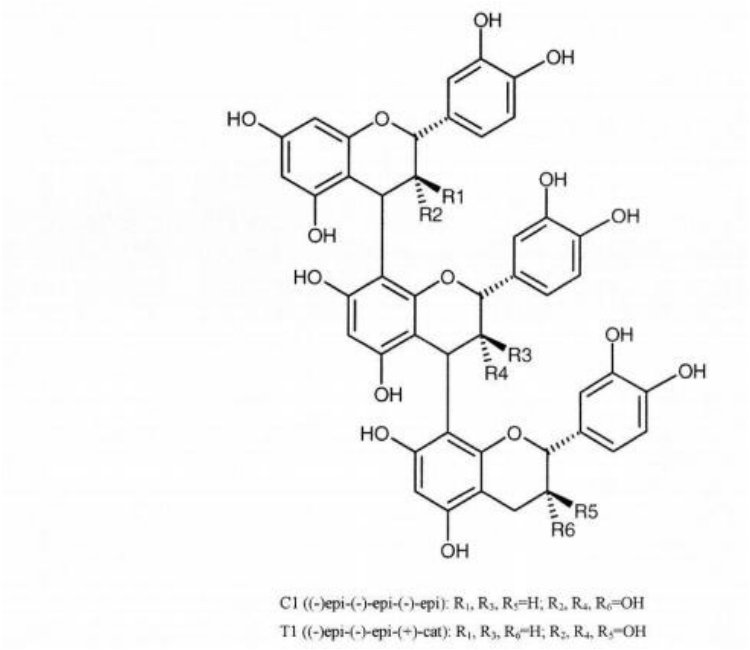


Figura 7- Estrutura de procianidinas triméricas do tipo C
Fonte: Adaptado de Crozier, Clifford e Ashihara (2006).

As procianidinas podem também apresentar na sua estrutura um ou mais grupos galoílo (ésteres galato) (Figura 8).

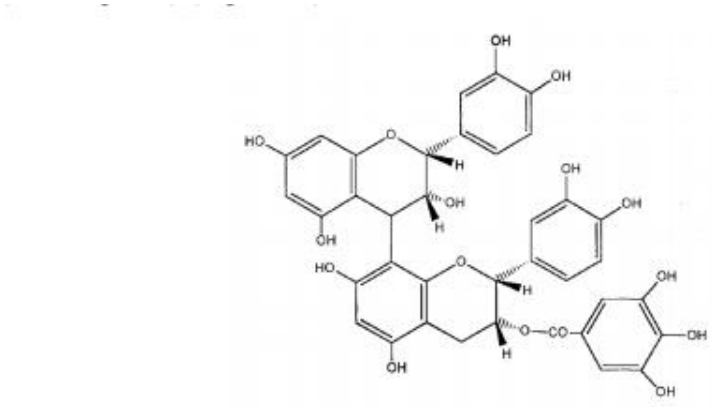


Figura 8- Estrutura de uma procianidina esterificada com o ácido gálico (B2-3-O-galato)
Fonte: Adaptado de Crozier, Clifford e Ashihara (2006).

Além das estruturas monoméricas, diméricas e triméricas existem formas mais polimerizadas de proantocianidinas; as procianidinas oligoméricas cujo número de unidades monoméricas é igual ou inferior a seis, e procianidinas poliméricas com um número de

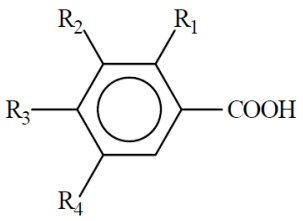
unidades monoméricas superior. Em ambos podem existir ligações de tipo C4-C8 e C4-C6 que permitem a formação de um número ilimitado de isômeros (HASLAM, 1998).

Portanto, procianidinas são potentes antioxidantes e suas formas oxidadas adquirem estabilização adicional devido ao extenso deslocamento do elétron, induzido pela unidade catecol no anel aromático B (WILLIAMS et al., 2004). Além disso, os vários grupos fenólicos o-di-hidroxi nas estruturas com alto peso molecular fornece as procianidinas uma alta capacidade de complexar metais como íons (Fe(III), Cu(II), Al(III)) e proteínas. Estas são as principais características responsáveis pelo interesse nutricional, biológico e aplicação industrial das procianidinas (CHUNG et al., 1998).

Outros efeitos benéficos são atribuídos a esta classe de compostos, como atividade antibacteriana, antivirais, anticancerígenas, anti-inflamatórias e antialergênica (KONDO, 2000).

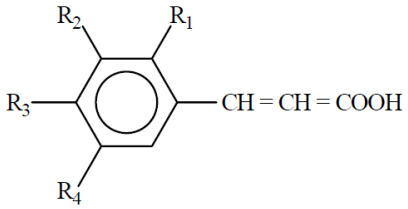
2.2.1.2 Ácidos fenólicos

Outro grupo importante de fitoquímico compreende os ácidos fenólicos, que são divididos em dois grupos: derivados dos ácidos hidroxibenzóicos e derivados dos ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos, que têm estrutura comum, C_6-C_1, são os mais simples encontrados na natureza e incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico. Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos, possuem nove átomos de carbono com (C_6-C_3), sendo os mais comuns os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sináptico (BRAVO, 1998; D'ARCHIVIO et al., 2007; HAMINIUK et al., 2012) (Figuras 9 e 10).



R_1 = OH (Ácido Salicílico); R_1 = R_4 = OH (Ácido Gentísico); R_3 = OH (Ácido ρ-hidroxibenzóico); R_2 = R_3 = OH (Ácido Protocatequínico); R_2 = OCH_3; R_3 = OH (Ácido Vanílico); R_2 = R_3 = R_4 = OH (Ácido Gálico); R_2 = R_4 = OCH_3; R_3 = OH (Ácido Siríngico)

Figura 9- Estrutura química dos principais ácidos benzóicos
Fonte: Soares (2002).



R1 = R2 = R3 = R4 = H (Ácido cinâmico); R1 = OH (Ácido *o*-cumárico); R2 = OH (Ácido m-cumárico); R3 = OH (Ácido ρ-cumárico); R2 = R3 = OH (Ácido Caféico); R2 = OCH3; R3 = OH (Ácido Ferúlico); R2 = R4 = OCH3; R3 = OH (Ácido Sinápico)

Figura 10- Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos
Fonte: Soares (2002).

Esses dois grupos de ácidos fenólicos possuem atividade antioxidante, entretanto, a atividade antioxidante dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos é maior do que a dos ácidos hidroxibenzóicos (ANDREASEN et al., 2001; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). A presença do grupo –CH=CH-COOH na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres. Provavelmente, há conjugação da dupla ligação do grupo –CH=CH-COOH com as duplas do anel. Deve-se destacar que o ácido gálico apresenta atividade antioxidante maior do que a catequina (flavonoide), que conta com cinco grupos hidroxilas em sua estrutura (RICE-EVANS et al., 1996).

2.3 Formação das espécies reativas do oxigênio

As espécies reativas são átomos, moléculas, ou íons derivados do oxigênio, que normalmente possuem alta reatividade (MARTELLI; NUNES, 2014). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas (VASCONCELOS et al., 2007). No organismo encontram-se envolvidos com a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, (ABRAHÃO et al., 2010), sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (ALVES et al., 2010).

A transferência de elétrons é um dos processos químicos mais fundamentais para a sobrevivência das células (ALVES et al., 2010). Quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (SCHAFER; BUETTNER, 2001; MARTELLI; NUNES, 2014). Entretanto, em determinadas condições, a elevação na produção de ERO (LEMOS, 2006) resulta num desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante (SCHAFER; BUETTNER, 2001), levando ao estresse oxidativo, durante o qual algumas destas espécies reativas, tais como o radical

superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($OH^\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem produzir danos ao organismo (CERQUEIRA et al., 2007; GANDHI; ABRAMOV, 2012; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado que as EROs estão associadas a diversos processos patológicos, como acidentes vasculares cerebrais, fibrose pulmonar, doenças cardiovasculares, alzheimer, câncer (GANDHI; ABRAMOV, 2012; GOMES et al., 2012; DeMARCHI et al., 2013), além do processo de envelhecimento, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ABRAHÃO et al., 2010). Dentre essas espécies reativas encontram-se o oxigênio singlete ($^1O_2$), hidroperóxido (ROOH), ácido hipocloroso (HClO), ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$), hidroperoxila (HOO•), radicais hidroxila (HO), peroxila (ROO•) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pertencem ao grupo das espécies reativas do oxigênio (EROs). Já as espécies reativas de nitrogênio compreendem o óxido nítrico (NO•), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (CERQUEIRA et al., 2007; DeMARCHI et al., 2013; MARTELLI; NUNES, 2014).

Cada ERO tem suas próprias características em relação à reatividade e tempos de meia vida. Entre esses radicais, $HO^\bullet$ e $O_2^{-\bullet}$ são os que têm maior importância. O radical hidroxila ($HO^\bullet$) é o mais reativo e lesivo radical conhecido, podendo reagir com todos os tipos de moléculas biológicas (AGUIAR; FERRAZ, 2007; MYLONA; POLIDOROS, 2010). Uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa (VASCONCELOS et al., 2007). Já o $O_2^{-\bullet}$ pode favorecer a formação de espécies radicalares (WINTERBOURN, 2008).

A geração de radicais livres, fisiológica ou não, é normalmente equilibrada pela ação dos antioxidantes endógenos, produzidos pelo próprio organismo, e pelos exógenos ou dietéticos, que são adquiridos por meio da ingestão alimentar (como ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides, compostos fenólicos e demais metabólitos secundários vegetais). Juntos, promovem reciclagem e reações de regeneração que otimizam a proteção contra os radicais livres das células (SHAHIDI; HO, 2007). Nessa perspectiva, os antioxidantes presentes nos alimentos da nossa dieta assumem grande importância como possíveis agentes protetores do organismo, que são fundamentais na redução dos danos celulares.

2.4 Antioxidantes

O termo antioxidante tem natureza multiconceitual e pode ser definido como uma família heterogênea de moléculas naturais, presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam o organismo, podendo prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (HALLIWELL, 2000; HALLIWELL, 2012).

Durante os processos metabólicos os quais resultam em uma produção contínua de radicais livres, foram desenvolvidos diversos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos causados por esses radicais (SIES, 1993; LIOCHEV, 2013).

Os antioxidantes são os responsáveis pela inibição e redução de radicais livres nas células (BIANCHI; ANTUNES, 1999; LIOCHEV, 2013) e algumas características são necessárias para ser considerado um bom antioxidante, como possuir substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução; ter a capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura e a de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e ter acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofilia ou lipofilia e de seu coeficiente de partição (MANACH et al., 2004).

Algumas moléculas podem exercer efeito antioxidante, como carotenoides, flavonoides, polifenóis, tocoferóis, taninos, vitaminas (A, C e E), encontradas principalmente em frutas e vegetais (MANDAL et al., 2009). O seu consumo está associado à redução da mortalidade e morbidade por algumas doenças crônicas não transmissíveis devido a estes e outros compostos fitoquímicos possuírem efeito protetor contra doenças crônico-degenerativas (MELO et al., 2008).

As moléculas típicas de antioxidantes são derivadas das formas isoméricas das flavonas, isoflavonas, flavonois, catequinas, cumarinas, ácidos fenólicos entre outras substâncias (PRADO, 2009), entretanto, a eficácia da ação antioxidante depende da estrutura química e da concentração destes fitoquímicos (MELO et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2010).

As substâncias antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção do organismo. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do

DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999; ABRAHÃO et al., 2010).

O outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999; LIMA et al., 2012).

As frutas e vegetais, assim como os subprodutos gerados a partir do seu processamento na indústria de alimentos, são fontes de antioxidantes naturais (LAPORNIKIC; PROSEK; WONDRA, 2005). Os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria brasileira alimentícia são o BHA (butil-hidroxianisol), BHT (butil-hidroxitolueno) e TBHQ (terc- butilhidroquinona) (RAMALHO; JORGE, 2006), entretanto, apesar de serem muito efetivos e estáveis, têm despertado preocupação quanto às doses de segurança e toxicidade (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Dessa forma, há grande interesse em se encontrar novos antioxidantes que sejam seguros e provenientes de fontes naturais, reduzindo assim esses componentes nos alimentos por meio da associação ou até mesmo da sua substituição. Portanto as frutas e seus resíduos vêm sendo bastante explorada nos últimos anos, como fonte alternativa aos antioxidantes sintéticos (AYALA-ZAVALA et al., 2011).

Atualmente, não existe um método oficial para determinação da atividade antioxidante em alimentos de origem vegetal e seus subprodutos, tendo em vista os vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer, bem como a diversidade de compostos bioativos. A literatura descreve vários métodos antioxidantes, cada um com um princípio distinto que utilizam radicais livres e/ou padrões diversos. Dessa forma, os estudos que visam avaliar propriedades antioxidantes de extratos vegetais utilizam mais de uma metodologia para inferir, com maior segurança, se os extratos analisados poderão apresentar também alguma atividade em combater os radicais livres formados no organismo humano (SOUSA; VIEIRA, 2011).

2.5 Avaliação da atividade antioxidante

2.5.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH•

O sequestro do radical DPPH é um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois é considerado um método rápido e com boa estabilidade. O DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de coloração violeta e possui absorção máxima na faixa de 515-520 nm. Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical muda de cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados (BRANDWILLIANS; CUVELIER; BERSET, 1995).

O método é influenciado pelo solvente e pelo pH das reações, entretanto é considerado fácil, rápido, estável e útil para análise de substâncias puras e amostras complexas (SUCUPIRA et al., 2012) (Figura 11).

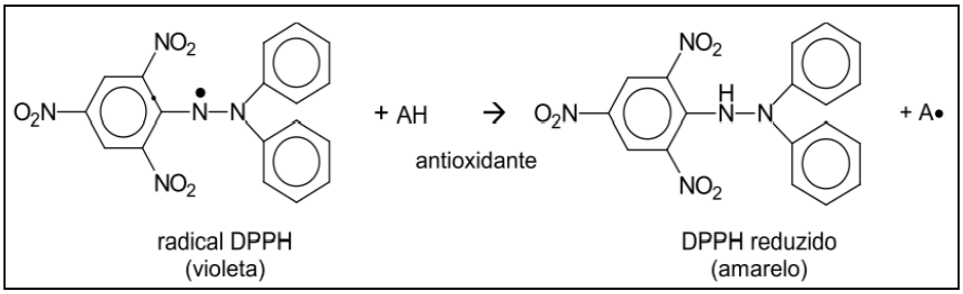


Figura 11- Estrutura química do DPPH e reação antioxidante
Fonte: Molyneux, 2004.

Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micromols de equivalentes de um padrão utilizado ou ainda como EC_{50} (quantidade de um antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração do DPPH inicial) (BROINIZI et al., 2007).

2.5.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A captura do radical 2,2'–azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($ABTS^{•+}$) é um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante *in vitro* o qual pode ser gerado por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. O método $ABTS^{•+}$ se

enquadra como um dos testes de atividade antioxidante mais rápido e que oferece resultados reprodutíveis, podendo ser usado para medir a atividade de compostos tanto de natureza hidrofílica quanto lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

O método baseia-se na geração do radical $ABTS^{\bullet+}$, de cor azul esverdeado, por meio na reação do ABTS com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do $ABTS^{\bullet+}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional (Figura 12). Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do $ABTS^{\bullet+}$ é determinada geralmente em função de um padrão comercial análogo à vitamina E (Trolox). O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (RE et al., 1999).

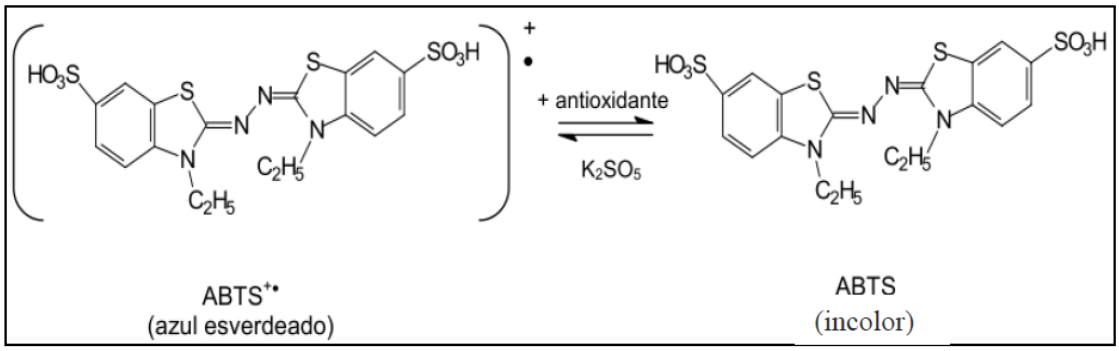


Figura 12- Estabilização do radical ABTS por um antioxidante
Fonte: Moon e Shibamato, 2009.

2.5.3 Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Este método está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+}. Quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)- 1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso) com o $Fe^{2+,}$ com uma absorção máxima a 593 nm. Este ensaio oferece resultados rápidos e reprodutíveis, entretanto, uma das limitações desta técnica consiste no fato de apenas avaliar a capacidade da amostra em reduzir ions férricos e não a sua capacidade em neutralizar radicais livres ou outras espécies antioxidantes (HUANG; OU; PRIOR, 2005; PRIOR; GU, 2005) (Figura 13).

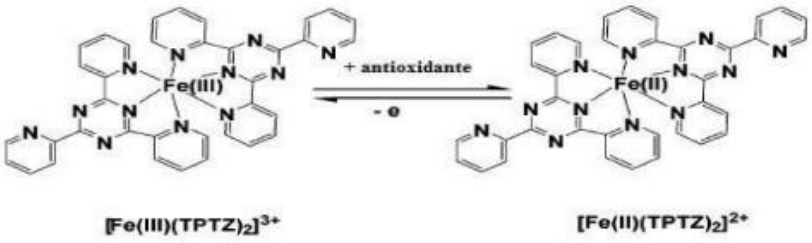


Figura 13- Redução do Fe (III) a Fe (II) pela adição de um antioxidante
Fonte: Huang, Ou e Prior (2005).

2.5.4 Autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico

A autoxidação do sistema beta caroteno/ácido linoleico é um método colorimétrico, realizado em comprimento de onda de 470 nm. É baseado na leitura referente à descoloração da solução preparada com β-caroteno e ácido linoléico, em meio aquoso, com leitura imediata e em intervalos de 15 min, por um tempo total de 2 horas (MILLER, 1971; BROINZI et al., 2007). A descoloração ocorre em função das estruturas radicalares formadas pela oxidação do ácido linoléico, que atacam as duplas ligações do β-caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução. A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoléico, prolongando o período de formação dos radicais (HUANG; WANG, 2004). Trata-se de um ensaio espectrofotométrico no qual se avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA, 2006). Normalmente se utiliza o antioxidante sintético butilhidroxidotolueno (BHT) como padrão positivo para comparação dos resultados.

Esta metodologia, apesar dos inconvenientes como interferência de substâncias oxidantes ou redutoras no ensaio, é amplamente usada, pois uma vez que não necessita de elevadas temperaturas durante sua execução, permite a determinação do poder antioxidante em produtos termossensíveis (AMIN; NORAZAIDAH; HAINIDA, 2006).

2.5.5 Método Rancimat

A oxidação lipídica é uma das principais causas da perda de qualidade em alimentos. Métodos rápidos têm sido empregados para avaliar a resistência de óleos e gorduras à oxidação, além de comparar a atividade antioxidante de muitos compostos bioativos em

sistemas lipídicos. O método Rancimat é um método fácil e de alta reprodutibilidade e baseia-se determinação automática do tempo decorrido para se atingir a taxa máxima de oxidação de um óleo, envolvendo altas temperaturas, pois a razão da reação oxidativa é exponencialmente afetada por esse parâmetro. Esse tempo, também chamado de período de indução ou índice de estabilidade oxidativa do óleo, é determinado pelo aumento da condutividade da água deionizada, em função dos compostos finais da oxidação do óleo nela borbulhados (KRISTOTT, 2000; FARHOOSH et al., 2008).

2.5.6 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)

Atualmente, o método ORAC tem sido considerado um dos métodos mais relevantes aos sistemas biológicos, pois mensura a capacidade da amostra em inibir reações de oxidação induzidas por uma espécie reativa de oxigênio pertencente ao grupo de radicais livres peroxila (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Neste ensaio o radical peroxil, gerado pelar reação do AAPH [dicloreto de 2,2’-azobis(2-amidinopropano)] com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofluorometria . Este ensaio avalia a atividade antioxidante por meio da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio. Os resultados são expressos em unidade de ORAC ou equivalentes de Trolox, que corresponde à quantidade de trolox em μmol que tem a mesma atividade antioxidante para o radical peroxila em 1 L de plasma (VASCONCELOS, 2007).

2.5.7 Ânion superóxido e Ácido hipocloroso

O radical superóxido $O_2^{\bullet -}$ é gerado constantemente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microssomo, enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase), ou pela redução monoeletrônica de O_2 (RAY; HUANG; TSUJI, 2012). A reação ocorre com a adição de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) à mistura de PMS (fenazina metassulfato) e NBT (azul de nitrotetrazólio), com formação do ânion radical superóxido. Em seguida, dois radicais superóxido são capazes de doar, cada um, um elétron para o NBT, que se reduz a formazana, então monitorada em um comprimento de onda de 560 nm. Quando o antioxidante é adicionado ao meio, ele é capaz de competir com o

NBT pelo ânion radical superóxido gerado, diminuindo, dessa forma, a redução do NBT e, consequentemente, a formação de formazana (GOMES et al., 2007; CHISTÉ et al., 2011).

Em relação ao ácido hipocloroso (HOCl) sabe-se que é um potente agente oxidante gerado nos neutrófilos pela reação de íons cloreto (Cl^-) com peróxido de hidrogênio catalisado pela mieloperoxidase (MPO). Acredita-se que a produção de HOCl por este sistema constitui um importante mecanismo de defesa contra microrganismos (WINTERBOURN, 2008). In vivo, o HOCI pode atacar vários alvos. Uma das suas principais ações é a inativação da α-antiproteinase (pelo ataque ao resíduo da metionina), um importante protetor das células contra o ataque de enzimas proteolíticas como a elastase (YAN et al, 1996; NEVE; PARIJ; MOGUILEVSKY, 2001). O HOCI oxida grupos sulfidrilo, o ascorbato, o NADPH e promove a cloração das bases do ADN, especialmente as pirimidínicas, e dos resíduos de tirosina nas proteínas. O método, portanto avalia a atividade antioxidade de substâncias em relação ao HOCl (ALVES, et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

Foram utilizados frutos de abacate das cultivares Hass e Fuerte das safras de 2011, 2012 e 2014, fornecidos pela empresa Jaguacy Avocado Brasil, localizada em Bauru, SP, cujas coordenadas geográficas são: latitude 22º19’18” S, longitude 49º04’13” W e 526 m de altitude. Os frutos da cultivar Hass foram colhidos no mês de junho de 2011 e março de 2014 e os da cultivar Fuerte em abril de 2012. Os frutos, depois de cuidadosamente colhidos no ponto de maturação fisiológica e de acordo com o teor de óleo, foram transportados para o Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Na sequência, foram selecionados visando à homogeneização do lote quanto ao tamanho, cor, ausência de injúrias e defeitos. Após esta etapa foram separados manualmente em casca, polpa e semente e, finalmente, congelados e liofilizados.

3.1.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (D.I.C.) em esquema de parcela subdividida, onde a parcela foi composta pelo fruto e as subparcelas foram a polpa, casca e semente. Foram utilizados 3 lotes de cada variedade (Hass e Fuerte), contendo 20 frutos em cada lote, colhidos ao acaso de acordo com os meses especificados no item 3.1. Foram utilizados 60 frutos de cada cultivar, totalizando 120 frutos para o experimento.

3.2 Preparo do extrato bruto da polpa, casca e semente

Antes de realizar o processo de extração a amostra da polpa foi desengordurada de acordo com a metodologia de Sanbongi et al. (1998), com modificações. Foram pesadas 6 g da polpa liofilizada em tubos falcon de 50 ml e adicionou-se 30 ml de hexano. Os tubos foram levados para a centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) durante 10 minutos (5000 x g). O processo foi repetido por 3 vezes. A amostra foi filtrada e o extrato foi então preparado em triplicata com o emprego dos solventes etanol:água, 80:20 (v/v).

A extração das amostras de polpa, casca e semente foi feita de acordo com o método descrito por Kähkönen et al. (1999), com algumas modificações. As amostras foram congeladas a -18ºC e posteriormente liofilizadas. Em seguida, o material foi triturado e pesado 2 g da amostra na forma de pó em tubos Falcon de 50 ml. Na sequência, uma alíquota de 20 mL de etanol 80% foi adicionada. Posteriormente, os tubos foram sonicados (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) por 15 minutos e centrifugados por 15 minutos (5000 x g), e, os sobrenadantes coletados para as análises subsequentes. Todas as amostras foram extraídas em triplicata.

3.3 Avaliação do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante do extrato bruto da polpa, casca e semente

3.3.1 Teor de compostos fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau descrito por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão. O reagente de Folin-Ciocateau é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. Os extratos brutos obtidos foram diluídos (polpa 1:20, casca e semente 1:100) e, uma alíquota de 0,5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo e adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau, diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso por 3 a 8 minutos. Em seguida adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos foram deixados em repouso por 2 horas ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico, com base em uma curva de calibração de ácido gálico com concentrações variando de 5 a 80 µg/mL.

3.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da capacidade sequestrante pelo método DPPH baseia-se no princípio de que o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), sendo um radical estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de um antioxidante e adquirindo coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH

possui uma absorção característica a 517 nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (MENSOR et al., 2001). Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos brutos foram diluídos (polpa 1:20, casca e semente 1:500) e a mistura de reação foi constituída pela adição de 500 µL dos extratos, 3,0 mL de etanol 99% e 300 µL do radical DPPH em solução de etanol 0,5 mM e incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 517 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de trolox, com base em uma curva de calibração de trolox com concentrações variando de 0 a 200 µM.

A atividade sequestrante do radical livre DPPH também foi expressa em termos de EC_{50}, ou seja, concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH. Desta forma, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante dos compostos presentes. A cinética do extrato foi determinada por meio do monitoramento, a cada 20 minutos durante 120 minutos, do declínio da absorbância da solução de DPPH a 517 nm. Os valores do EC_{50} foram calculados por regressão linear dos gráficos em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas a atividade antioxidante.

A atividade sequestradora do radical DPPH também foi determinada para as frações, subfrações e compostos isolados catequina, epicatequina, procianidinas B_1 e B_2 de acordo com a metodologia descrita por Al-Duais et al. (2009). A mistura da reação foi constituída pela adição de 66 µL das amostras e 134 µL do radical DPPH em solução de etanol 150 µM e incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A absorbância foi determinada a 517 nm, num leitor de microplacas SpectraMax® M3 (Molecular Devices). Os resultados foram expressos em equivalente de trolox, com base em uma curva de calibração de trolox com concentrações variando de 20 a 140 µM. A atividade sequestrante do radical livre DPPH também foi expressa em termos de EC_{50}.

3.3.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS 2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi feita conforme metodologia descrita por Re et al. (1999). O radical $ABTS^{\bullet+}$ foi formado pela reação de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25 ºC e no escuro, durante 12 - 16h. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorbância de 0,700 ± 0,200 a 734 nm. Em ambiente escuro, um volume de 3,0 mL da solução de radical $ABTS^{\bullet+}$ foi acrescentado a

30 µL de cada diluição dos extratos brutos (polpa: extrato etanólico puro, casca e semente 1:200) e as absorbâncias lidas após seis minutos em espectrofotômetro a 734 nm, utilizando etanol 100% como branco. Para a construção da curva padrão foi utilizado o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E nas concentrações de 100 a 2000 µM. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µM trolox/g de amostra.

3.3.4 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. Este método se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+}/tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{2+}, de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 ml de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 ml de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 ml de $FeCl_3$ (20 mM) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 µL do extrato bruto diluído (polpa 1:5; casca 1:200 e semente 1:50) foi adicionado a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso, nas concentrações de 100 a 2000 µM, e os resultados foram expressos em µmol Fe^{2+}/g amostra (liofilizada).

3.3.5 Autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante pela oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoléico, foi realizada de acordo com o método de Emmons et al. (1999), com algumas modificações. Foram pesados 10 mg de β-caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio/β-caroteno e adicionado 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. O clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 minutos. Alíquotas de 3 mL da emulsão β-caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 50 µL dos extratos brutos e incubadas em banho maria a 50ºC. A oxidação da emulsão foi monitorada em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo

inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas. Para a amostra controle foi utilizado solvente no lugar do extrato. A atividade antioxidante (AA) foi expressa como percentual de inibição relativa comparada ao controle depois de 120 minutos usando a equação:

$$AA (\%) = [(DRc - DRs) / DRc] \times 100$$

Onde:

DRc = taxa de degradação do controle (= ln(a/b)/120);

DRs = taxa de degradação na presença do padrão ou extrato (= ln(a/b)/120);

“a“ e “b” são as absorbâncias no tempo inicial (0 min) e no tempo final (120 min), respectivamente.

3.3.6 Estabilidade oxidativa pelo método do Rancimat

A estabilidade oxidativa foi realizada de acordo com método descrito por Murcia et al. (2001) com algumas modificações. Amostras de 5 g de óleo refinado de soja (fornecido pela empresa Cargill, sem adição de antioxidantes) foram misturados aos extratos brutos etanólicos. Em seguida, a mistura foi submetida a uma temperatura de 110±1°C sob fluxo de ar seco a taxa de 9L/h, conforme o método cd 12b-92 (AMERICAN OIL CHEMIST´S SOCIETY, 2003), em equipamento Rancimat 743 (Metrohm AG, CH-9100 Herisau Swatzerland). As leituras de condutividade crescente em função do acúmulo de compostos de oxidação compuseram a curva, que traçada em função do tempo de reação, permitiu o cálculo do período de indução (PI). Um controle preparado com óleo de soja sem antioxidante também foi submetido a essa análise. Dessa forma, o Fator de Proteção (PF) foi calculado, por meio da equação:

$$PF (\%) = (PIa/PIc) \times 100$$

Onde:

PIa = Período de indução do óleo com os extratos;

PIc = Período de indução do controle (óleo sem os extratos)

3.4 Espécies reativas do oxigênio

3.4.1 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

O método ORAC foi determinado conforme a metodologia descrita por Chisté et al. (2011), com algumas modificações. Os reagentes utilizados foram diluídos em tampão fosfato

de potássio 75 mM, pH 7,4. Para a análise foi utilizado 30 μL da amostra dos extratos brutos diluídos (polpa 1:50; casca e semente 1:1000), frações, subfrações e dos compostos isolados de catequina, epicatequina, procianidinas B_1 e B_2, 60 μL da solução de trabalho de fluoresceína 508, 25 mM e 110 μL da solução de trabalho de AAPH 76 mM. O branco foi preparado somente com tampão fosfato (200 μL). Após a adição dos reagentes as amostras foram incubadas a temperatura de 37°C, num leitor de microplacas SpectraMax® M3 (Molecular Devices), e submetidas a uma cinética por 2 horas, com intervalo de 1 minuto entre as leituras, utilizando-se emissão de 528 nm e excitação de 485 nm. Para a construção da curva padrão foi utilizado o Trolox 1 mM nas concentrações de 12,5 a 400 μM. Os resultados foram expressos em μmol Trolox/mg.

3.4.2 Sequestro do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A determinação da capacidade de sequestro do radical superóxido ($O_2^{\cdot\bullet-}$), gerado pelo sistema NADH / PMS, foi realizada de acordo com Gomes et al. (2007) e Chisté et al. (2011), com modificações. Para o volume final de 300 μl foram adicionados 100 μL de NADH 166 μM, 50 μL de NBT 107,5 μM, 50μL de PMS 2,7μM e 50 μL dos extratos brutos, frações, subfrações e compostos isolados catequina, epicatequina, procianidinas B_1 e B_2 em diferentes concentrações. Os reagentes e amostras foram diluídos em tampão fosfato de potássio 19 mM, pH 7,4. O ensaio foi realizado a 25°C, num leitor de microplacas SpectraMax® M3 (Molecular Devices), a uma absorbância de 560 nm por 5 minutos. O controle foi feito substituindo a amostra por tampão e um branco para cada diluição de amostra foi preparado através de substituição de PMS e NADH por tampão. Os resultados foram expressos como EC_{50}, como a quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% o radical superóxido, em mg/mL.

3.4.3 Ácido hipocloroso (HOCl)

A capacidade de sequestro do ácido hipocloroso (HOCl) foi medida por meio do monitoramento dos efeitos dos extratos na oxidação induzida por HOCl de DHR a rodamina 123, de acordo com Gomes et al. (2007) e Chisté et al. (2011) com modificações. O HOCl foi preparado usando uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, com o pH ajustado para 6,2 por adição de uma solução de H_2SO_4 a 10%. Para a análise foram utilizados 100 μL extratos

brutos, frações, subfrações e compostos isolados catequina, epicatequina e procianidinas B_1 e B_2, em diferentes concentrações, 100 μL tampão fosfato 100 mM (pH 7,4), 50 μL DHR 1,25 μM e 50 μL HOCl 5 mM, em um volume final de 300 μL. O ensaio foi realizado a 37 ° C num leitor de microplacas SpectraMax® M3 (Molecular Devices) e a fluorescência foi medida imediatamente com o comprimento de onda de emissão de 528 ± 20 nm com excitação a 485 ± 20 nm. Os resultados foram expressos como EC_{50} (mg/mL) da amostra.

3.5 Determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* por HPLC-DAD-UV

O ensaio da determinação simultânea de compostos fenólicos por HPLC associada à atividade antioxidante ABTS foi realizado utilizando o método desenvolvido por Koleva et al. (2001) com algumas modificações. Uma solução estoque contendo persulfato de potássio 140 mM e ABTS 7mM foi preparada e mantida a 25°C no escuro durante 16 horas para estabilização do radical. O radical foi preparado por diluição da solução estoque em metanol a uma absorbância de 0,700 ± 0,020 a 730 nm. Os analitos separados por HPLC foram detectados primeiro usando um detector de diodos (DAD), e a solução metanólica do radical livre ABTS reagiu com os compostos separados da amostra, pós coluna, durante aproximadamente 1 min. A vazão do reagente do ABTS foi de 0,8mL/min e a intensidade de cor foi detectada por meio de picos negativos à 734 nm (Figura 14). Os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

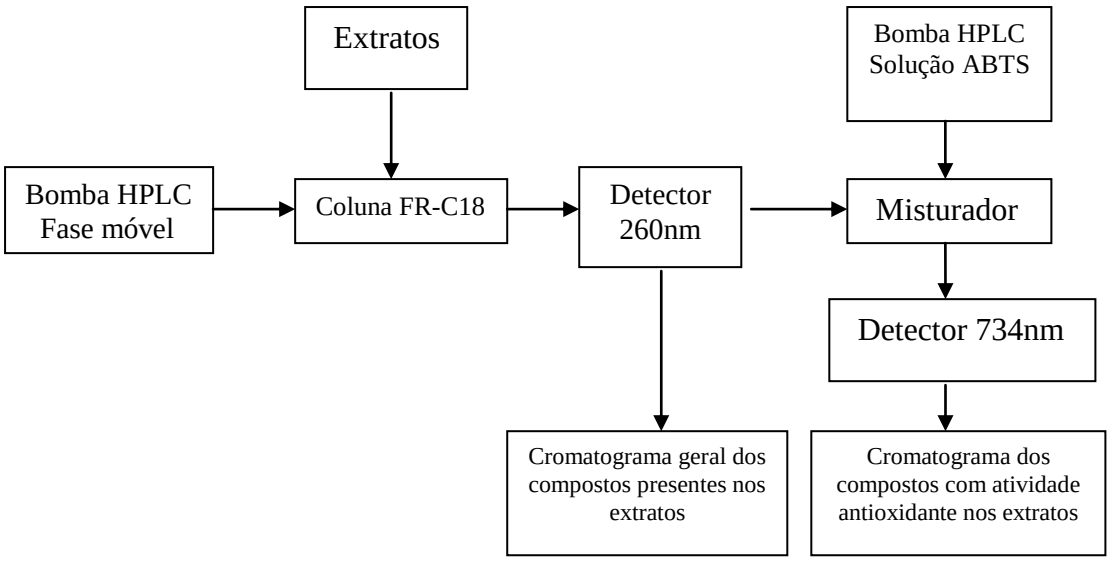


Figura 14- Esquema da determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* por HPLC-DAD-UV.

A separação por HPLC foi realizada usando fase reversa num cromatógrafo Shimadzu equipado com ODS-A (C-18, tamanho da coluna 4,6 x 250 mm, tamanho de partícula 5µm), detector de fotodiodos (SPD-M10AVp, Shimadzu Co., Kyoto, Japão) e detector UV-Vis (SPD-20AV, Shimadzu). Os extratos foram filtrados através de um filtro de 0,22 µm (Millipore) antes da injeção de uma alíquota de 20 µL. A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de ácido fórmico em água 0,1% e (B) acetonitrila. A vazão da fase móvel foi de 0,8 mL/min e o gradiente foi iniciado em 5% do solvente B passando a 10% de B em 5 minutos, 15% de B aos 30 minutos, 25% de B aos 40 minutos, 80% de B aos 55 minutos e retornando novamente a 5% de B aos 65 minutos.

Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Foram utilizados os padrões autênticos de flavonóides e ácidos fenólicos (Extrasynthese Co.): catequina, epicatequina, procianidinas B_1 e B_2, quercetina, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido ferrúlico, kanferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, kanferide, isosakuranetina, sakuranetina, além das antocianinas: mirtilina, kuromanina, oenina, petunidina e peonidina. A quantificação dos compostos identificados foi feita utilizando-se o método da padronização externa.

Os limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ) foram calculados conforme as equações 1 e 2:

$$LOD = 3.3 \times s \div S \quad \text{(Equação 1)}$$

$$LOQ = 10 \times s \div S \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde "s" é o desvio padrão estimado do coeficiente linear da equação, e "S" é a média do coeficiente angular da equação. Os limites de detecção (LOD) do ácido cafeico, procianidina B1, procianidina B2, catequina e epicatequina foram 0.00001, 0.0031, 0.0409, 0.025, e 0.0231 µg/mL, respectivamente, enquanto que os limites de quantificação (LOQ) foram 0.0003, 0.0095, 0.1240, 0.0985 e 0.0701 µg/mL, respectivamente.

3.6 Fracionamento cromatográfico

3.6.1 Purificação do extrato bruto da casca e da semente em resina Amberlite XAD2

Para a remoção de interferentes químicos da amostra, cem gramas do material liofilizado, obtido conforme o item 3.1, foram pesados e a extração foi feita de acordo com o item 3.2. O sobrenadante obtido foi rotaevaporado e diluído em água destilada, acidificado até pH 2,0 e misturados com 30 g de resina Amberlite XAD2 (Supelco, Bellefonte, PA – poros de 9 nm e partícula de 0,3 - 1,2 mm). Na sequência, o extrato junto com a resina foi homogeneizado durante 10 minutos e a mistura empacotada em uma coluna de vidro (36 x 2 cm). A coluna foi eluída com 300 mL de água ácida pH 2,0, 100 mL de água destilada pH 7, e em seguida, com 300 mL de metanol (ALENCAR, 2002). As frações aquosa e metanólica recolhidas foram congeladas e em seguida liofilizadas para posterior análise. Ambas as frações obtidas foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e a atividade antioxidante foi monitorada pelos métodos de ORAC, DPPH (EC_{50}) e *on-line* por HPLC-FR-ABTS.

3.6.2 Fracionamento em gel Sephadex LH-20

O fracionamento do material da casca obtido na XAD2 foi realizado com o gel lipofílico Sephadex LH-20. Para a montagem da coluna, com base na metodologia descrita por Alencar (2002), com modificações, foram pesados 7,0 g do gel, os quais foram misturados com metanol. A mistura foi então colocada em uma coluna de vidro e o empacotamento feito apenas com a força da gravidade. A coluna preenchida com o gel possuía 30 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro. A fração obtida pela purificação em resina Amberlite XAD2 foi utilizada para o preparo de uma solução onde foram dissolvidos 50 mg em 2 mL de metanol. Na sequência, a solução foi aplicada no topo da coluna de gel Sephadex LH-20, e, após a total penetração da amostra no gel, foi realizada a eluição com metanol. A vazão da coluna foi de 56 gotas por minuto e as frações foram retiradas a cada 2 minutos. As subfrações obtidas foram avaliadas e monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD). A atividade antioxidante das subfrações foi monitorada pelos métodos de DPPH (EC_{50}), *on-line* por HPLC-FR-ABTS, ORAC, ânion superóxido e ácido hipocloroso.

3.6.3 Cromatografia em camada delgada em fase normal semi-preparativa

As análises de cromatografia em camada delgada em fase normal semi-preparativa foram realizadas em placa PLC Sílica gel 60 F_{254} (Merck Co.). Foram pesados 10 mg da fração da semente resultante da XAD2 e em seguida diluídas em 200 µL de metanol. Alíquotas de 200 µL das frações foram aplicadas na placa. O tempo e o desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 3 horas, utilizando-se o sistema acetato de etila:metanol:água:ácido acético (75:20:4:1, v/v), como fase móvel. As cromatoplacas foram visualizadas sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 254 e 365 nm, sendo marcadas as bandas existentes, raspada com um estilete e redissolvidas em metanol para posterior análise de atividade antioxidante pelos métodos de DPPH (EC_{50}), *on-line* por HPLC-FR-ABTS, ORAC, ânion superóxido e ácido hipocloroso.

3.7 Análises Cromatográficas

3.7.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F_{254} (Merck Co.), conforme descrito por Alencar et al. (2007), com modificações. Alíquotas de 40 µL das frações obtidas da coluna de LH-20 foram aplicadas na placa. O tempo e o desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 30 minutos, utilizando-se o sistema acetato de etila:metanol:água:ácido acético (75:20:4:1, v/v), como fase móvel. As cromatoplacas foram visualizadas sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 254 e 365 nm, a fim de se agrupar as frações com o mesmo comportamento físico-químico.

3.7.2 Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (GC/MS)

3.7.2.1 Derivatização - formação de derivados do trimetilsilil (TMS)

Antes da realização das análises por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC/MS), as amostras passaram por uma etapa imprescindível, chamada derivatização. A cromatografia gasosa analisa gases, substâncias voláteis e termicamente estáveis. Quando a amostra é constituída principalmente por compostos de alta

massa molar e/ou grupos funcionais fortemente polares, há necessidade de derivatização, reação que transforma as substâncias de interesse em derivados com características adequadas à análise (BONATO, 2006). Dessa forma, a derivatização química é usualmente utilizada para reduzir a polaridade de grupos funcionais e facilitar sua separação no cromatógrafo gasoso.

Foram adicionados às subfrações da casca e da semente, obtidas pela coluna de LH-20 e pela cromatografia em camada delgada em fase normal, respectivamente, 100 µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA). A mistura foi homogeneizada e levada em estufa à 70 ºC durante 10 minutos para reação. Em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil – TMS) rediluído em hexano (800 µL). Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido a outro *vial* para injeção no GC/MS.

3.7.2.2 Análise em cromatógrafo gasoso com Espectrometria de Massa (GC/MS)

As análises por GC/MS foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu QP 2010 *Plus*. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm). A programação de temperatura iniciou em 80ºC (1 minuto), a taxa de aquecimento de 20 ºC/minuto alcançou 250ºC (1 minuto), passou a 300 ºC (5 minutos) a taxa de 6 ºC/minuto, a 310 ºC (5 minutos) a taxa de 15 ºC/minuto, a 320 ºC (10 minutos) a taxa de 20 ºC/minuto, totalizando 40 minutos de análise. Hélio foi utilizado como gás de arraste. O volume de injeção foi de 0,6 µL no modo "*splitless*". O detector operou no modo "*scanning*" (*m/z* 40-800). A integração foi feita por meio do *software* LabSolutions-GCMS. Flavonóides, ácidos fenólicos e derivados foram identificados por comparação com os dados obtidos do GC/MS (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições e com a biblioteca Wiley® 8.

3.7.3 Cromatografia líquida com Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

A análise por cromatografia líquida foi realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), onde o sistema consistiu de uma bomba de solvente 10AD LC, um controlador de sistema SLC 10A, um forno CTO 10AS e um injetor Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, EUA), com um loop de 20 µl. A separação foi feita em uma coluna S5-100 ODS (250 mm x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 µm, Rexchrom, Morton

Grove, EUA), a temperatura de 30 °C. Foi utilizado uma coluna guarda (10 mm x 4,6 mm de diâmetro, 5 mm de tamanho de partícula), da Rexchrom, Morton Grove, EUA. A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de ácido fórmico em água 0,1% e (B) acetonitrila, com vazão de 0,8 mL/min utilizando um sistema de gradiente linear. A fase móvel do HPLC foi dividido por meio de uma válvula (Restek, Pennsylvania, EUA), o que propiciou uma vazão de aproximadamente 0,4 mL/min, antes da introdução na sonda capilar de aço inoxidável no sistema MS. Para identificação dos analitos foi utilizado um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, UK), com ionização por electrospray (ESI) e operando no modo de íons negativos. As temperaturas da fonte e do gás de dessolvatação foram 100 °C e 450 °C, respectivamente. Utilizou-se nitrogênio tanto como gás de dessolvatação (cerca de 380 L/h) quanto nebulizador (cerca de 38 L/hora), enquanto que o argônio foi utilizado como gás de colisão. As voltagens empregadas na fonte ESI durante as análises foram de 20 V para o cone, 3 kV para o capilar e 3 V para o extrator. Para confirmação da identidade, as análises foram realizadas no modo de monitorização de reação múltipla (MRM) utilizando energia de colisão de 15 eV.

3.7.4 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (*Ultrashield Plus*®). O espectrômetro é equipado com sonda criogênica TCI (*Triple Resonance Cryoprobe Inverse*) de 5 mm, com bobinas de ^{1}H e ^{13}C e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA® (*Automatic Tunning e Matching*).

As amostras foram dissolvidas em solvente deuterado, metanol (250 µL) e colocadas em tubos de RMN (Bruker, 3 mm de diâmetro externo), à 25ºC. Para todas as amostras, os primeiros experimentos de RMN obtidos foram: ^{1}H, *g*COSY, *g*HSQC, *g*HMBC. Todos os espectros foram adquiridos em uma temperatura controlada de 25ºC. Os parâmetros de aquisição de cada um desses experimentos estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN

Parâmetros[A]	^{1}H	*G*cosy	*g*HSQC	*g*HMBC
sequência de pulsos	*lcpnf2*	*Cosygpprqf*	*Hsqcetgp*	*hmbcgplpndqf*
TD - TDF2	65.536	4.096	4.096	4.096
TDF1*	-	256	256	256
SW - SW2 (ppm)	20,02	20,02	20,02	20,02
SW1*(ppm)	-	20,02	238,88	238,82
AQ - AQF2 (s)	2,72	0,17	0,17	0,17
AQF1* (s)	-	0,01	0,003	0,004
Ns	32	16	32	96
p1 ^{1}H (ms)	7,00	7,00	7,00	7,00
p1 ^{13}C* (ms)	-	-	14,00	14,00
d1 (s)	2,4	1,0	1,0	1,0

[A] Nomenclatura Bruker. * somente para os experimentos bidimensionais. TDF2 - número de pontos do domínio de tempo direto; TDF1 - número de pontos do domínio de tempo indireto; SW2 - janela espectral do domínio direto; SW1 - janela espectral do domínio indireto; AQ-F2 - tempo de aquisição no domínio direto; AQ-F1 - tempo de aquisição no domínio indireto; ns - número de promediações; p1 ^{1}H - duração do pulso de 90º ^{1}H; p1 – ^{13}C - duração do pulso de 90º ^{13}C; d1 - tempo de relaxação.

O processamento para os espectros de RMN de ^{1}H foi feito aplicando-se uma transformada de Fourier com 65.536 pontos (SI), a fase (apk) e a linha de base (abs) foram corrigidas automaticamente. Para os espectros bidimensionais, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 (SIF2) e 512 em F1 (SIF1), utilizando a função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 3, em ambos os eixos. A fase foi ajustada manualmente.

3.8 Atividade anti-inflamatória

3.8.1 Crescimento celular

Mácrofagos de camundongos (Raw 264.7), provenientes da ATCC; Rockville, MD foram mantidas em Meio Eagle de Dulbecco modificado - DMEM (GIBCO®, United Kingdom) acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO®) e penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μg/mL). As células foram cultivadas em placas de petri para cultura de tecido de 61 cm^2 (TPP®) em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Aproximadamente 4 x 10^4/mL

de células foram adicionadas a placas de cultura de tecidos com 24 e 96 poços, onde eram mantidas até atingirem a semi-confluência para a utilização nos experimentos (GREEN et al., 1982).

3.8.2 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). As células (RAW 264.7) foram aderidas em placas de 96 poços por 24 h (37°C, 5% de CO2). Após esse período foram adicionadas as amostras diluídas em meio de cultura, seguindo-se incubação por 24 ou 48 horas (37°C, 5% de CO_2). Após a incubação, o meio foi substituído por 1 mL de RPMI 1640 + SFB 5% + 1 mg de MTT. As células foram então incubadas por mais 3 horas (37°C, 5% de CO_2) e em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionado 150 µg de DMSO/poço. A leitura da absorbância em 550 nm foi realizada em leitor de Elisa utilizando-se o DMSO como branco das amostras. A porcentagem da atividade foi determinada como (A1/A0)/100%, onde A0 e A1 foram as absorbâncias na ausência e presença das amostras, respectivamente (GREEN et al., 1982).

3.8.3 Determinação da produção de TNF-α

Depois de 30 minutos de exposição da cultura de células a 10 µg/mL das amostras, as células foram estimuladas com LPS de *E. coli* (Sigma Aldrich Corp.) a uma concentração de 1 µg de LPS/ml e incubou-se por 4 horas numa incubadora com atmosfera de 5% de CO_2/ 95% de ar, a 37 ° C. A quantificação de TNF-α foi realizada por ELISA no sobrenadante da cultura da linhagem das células RAW. Leituras de densidades ópticas foram realizadas com leitor de microplacas (ASYS, UVM340, Biochrom, UK) a 450 nm de comprimento de onda e os resultados foram expressos em pg/ mL (GREEN et al., 1982).

3.8.4 Determinação da produção de óxido nítrico

As células foram cultivadas na concentração de 1 x 10^5/mL dispostas em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C com ou sem tratamento e estimuladas com LPS (1 µg/mL). O total de nitritos foi determinado usando um kit comercial “Griess Reagent System” (Promega). O sobrenadante das células tratadas e não tratadas foram coletados e transferidos para placas de 96 poços. Foram

adicionados de 50 μL de solução de Sulfanilamida, incubados a temperatura ambiente por 10 minutos e adicionados 50 μL de solução NED. Os níveis de NO_2- foram determinados por espectrofotometria em absorbância de 520 a 550 nm. Uma curva padrão de nitrito foi realizada para cada ensaio para a quantificação precisa de NO_2^- (GREEN et al., 1982).

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram feitas por meio do software SAS (SAS SYSTEM, 2002). Para a comparação das médias, utilizou-se o teste de *Tukey*, a 5% de probabilidade. Para as metodologias de atividade antioxidante pelas quais os extratos foram avaliados, aplicou-se ainda a Correlação de Pearson.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante do extrato bruto da polpa, casca e semente

4.1.1 Teor de compostos fenólicos totais

Os resultados dos teores de compostos fenólicos totais dos extratos da polpa, casca e semente de abacates das cultivares Hass e Fuerte, obtidos com os solvente etanol 80% (v/v), expressos em mg/g (equivalentes em ácido gálico), estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos (80%) da polpa, casca e semente de abacate da cultivar Hass

Partes do Fruto	Compostos fenólicos totais (mg/g)[1]
Polpa	$3,3 \pm 0,7^{B}$
Casca	$63,5 \pm 7,2^{A}$
Semente	$57,3 \pm 2,7^{A}$

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*
[1]expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (liofilizada).

Tabela 3 - Compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos (80%) da polpa, casca e semente de abacate da cultivar Fuerte

Partes do fruto	Compostos fenólicos totais (mg/g^{-})[1]
Polpa	$3,7 \pm 0,2^{C}$
Casca	$120,3 \pm 7,8^{A}$
Semente	$59,2 \pm 6,9^{B}$

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*
[1]expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (liofilizada).

Os compostos fenólicos presentes nos vegetais são os principais responsáveis pela atividade antioxidante (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Dentro das duas cultivares analisadas, nota-se que casca e a semente apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais quando comparadas à polpa dos frutos. No entanto, a casca da cultivar Fuerte apresentou

maior teor de compostos, equivalentes em ácido gálico a 120,3 mg/g, superando, inclusive, a casca da cultivar Hass (63,5 mg/g), que por sua vez não diferiu do teor de compostos da semente (57,3 mg/g).

Assim como os resultados encontrados neste trabalho, Wang, Bostic e Gu (2010) analisando a composição fenólica de oito cultivares de abacate, verificaram que cascas e sementes apresentaram elevados teores destes compostos quando comparados à polpa. Esses mesmos autores verificaram na semente da cultivar Hass, um teor de 51,6 mg/g em equivalente de ácido gálico, porém somente 12,6 mg/g na casca.

Rodríguez-Carpena et al. (2011) ao avaliarem o teor de compostos fenólicos da polpa, casca e semente de abacates das cultivares Hass e Fuerte, utilizando diferentes solventes de extração, também encontraram maiores teores de compostos fenólicos nos resíduos dos frutos. Nesta pesquisa, a extração com acetona foi mais eficiente para ambas as cultivares, seguido do metanol e acetato de etila. Entre as cultivares, os extratos acetônicos e metanólicos da casca da cultivar Fuerte (172,2 e 137,7 mg GAE/g de matéria seca, respectivamente) apresentaram maiores teores quando comparados a Hass (89,9 e 78,4 mg GAE/g de matéria seca, respectivamente). Vários autores têm enfatizado a importância dos solventes utilizados na extração. Solventes como metanol, etanol, acetona, propanol e acetato de etila têm sido comumente utilizados (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009; TURKMEN; SARI; VELIOGLU, 2006).

Kosinska et al. (2012) ao avaliarem a atividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos em cascas e sementes de abacates das cultivares Hass e Shepard, verificaram que o extrato metanólico da casca da cultivar Hass apresentou maior teor de compostos fenólicos (25,32 mg em equivalente de catequina/g de matéria seca) quando comparado à cultivar Shepard (15,61 mg em equivalente de catequina/g de matéria seca), sendo estes teores maiores que na semente (9,51 e 13,04 mg em equivalente de catequina/g em matéria seca para Hass e Shepard, respectivamente). Resultados semelhantes foram encontrados por Vinha, Moreira e Barreira (2013) ao estudarem extratos aquosos da polpa, casca e semente de abacate da cultivar Hass provenientes de Portugal.

Pahua-Ramos et al. (2012) também encontraram alto teor de compostos fenólicos em extratos metanólicos de semente de abacate provenientes do México, inclusive com valores superiores ao encontrados neste trabalho, ou seja, 292mg/g em equivalentes de ácido gálico.

Altos teores de compostos fenólicos em semente de abacate, manga, tamarindo, longan e jaca, quando comparado a polpa, também foram relatados no trabalho de Soong e Barlow (2004), as quais apresentaram concentrações de 88, 2; 117; 94,5; 62,6 e 27,7 (equivalentes de ácido gálico/g), respectivamente.

O teor destes compostos em vegetais varia, entre outros fatores, em função das cultivares, grau de maturação da fruta e das condições edafoclimáticas de cultivo (WANG et al., 2012). Porém, há estudos relatando que em cascas de frutas é comum se observar maior concentração destes compostos (TEHRANIFAR et al., 2011), possivelmente porque são metabólitos secundários, os quais estão envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta ou agressão por agentes patogênicos (CAZARIN et al., 2014).

Vários trabalhos apontam os resíduos como a porção do fruto com alto teor destes compostos. Em frutos do cerrado, o teor equivalente em ácido gálico na casca de pequi, semente de araticum e semente de cagaita foi 7 vezes maior em relação à polpa (ROESLER et al., 2007). Da mesma forma, altos teores também foram encontrados em resíduos de polpa de acerola e de goiaba (SOUSA; VIEIRA; 2011). Para casca e amêndoa de manga ‘Tommy Atkins’ analisadas por Arbos, Stevani e Castanha (2013), o teor de compostos fenólicos do extrato etanólico da casca foi significativamente superior ao quantificado no extrato da amêndoa. Assim, segundo os autores, estes resíduos apresentam potencial de aplicação para formulação de novos produtos pela indústria alimentícia.

Os resíduos encontrados no presente trabalho foram melhores quando comparados aos resíduos de sementes de uva, casca e semente de lichia, casca e semente de laranja e cascas de banana, os quais exibiram entre 3,6 a 37,4 equivalentes em mg de ácido gálico por grama em base seca (BABBAR et al., 2011). Gonzalez-Montelongo, Lobo e González (2010) relataram teores de 12 a 19 mg de ácido gálico nos extratos metanólicos obtidos a partir de cascas de banana para duas variedades diferentes, sendo inferiores aos encontrados para casca de abacate deste estudo.

Assim, a determinação do teor de fenólicos totais demonstra que a maioria dos resíduos de polpas de frutas apresenta quantidade significante destes compostos, normalmente desprezada durante o consumo *in natura*, o que suge um grande potencial de utilização dos mesmos.

4.1.2 Atividade sequestrante do radical livre DPPH

A atividade antioxidante pelo método sequestro do radical livre DPPH dos extratos da polpa, casca e semente de abacates das cultivares Hass e Fuerte, obtidos com os solvente etanol 80% (v/v), expressos em µmol TE/g (equivalente ao trolox), estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Atividade antioxidante pelo método sequestro do radical livre DPPH nos extratos etanólicos (80%) das amostras de abacate da cultivar Hass

Partes do Fruto	Atividade antioxidante DPPH (µmol TE/g)[1]
Polpa	8,1 ± 1,9[B]
Casca	310,0 ± 36,9[A]
Semente	410,7 ± 35,8[A]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*
[1]expressos como µmol equivalente ao trolox por grama de amostra (liofilizada).

Tabela 5 - Atividade antioxidante pelo método sequestro do radical livre DPPH nos extratos etanólicos (80%) das amostras de abacate da cultivar Fuerte

Partes do Fruto	Atividade antioxidante DPPH (µmol TE/g)[1]
Polpa	5,0 ± 0,4 [C]
Casca	420,5 ± 23,2 [B]
Semente	464,9 ± 32,7 [A]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*
[1]expressos como µmol equivalente ao trolox por grama de amostra (liofilizada).

Pelo método do sequestro do radical livre sintético DPPH, pode-se verificar que para as duas cultivares casca e semente apresentaram as maiores atividades quando comparadas à polpa. No entanto, a semente da cultivar Fuerte apresentou a melhor atividade (464,9 µmol/g), superando, inclusive, a semente da cultivar Hass (410,7 µmol/g), que por sua vez não diferiu da atividade antioxidante da casca (310,0 µmol/g).

Estudos recentes têm demonstrado que as frutas, juntamente com seus resíduos, são ricas em compostos antioxidantes (MELO et al., 2008). Resíduos de oito cultivares de abacate também foram analisados por Wang, Bostic e Gu (2010), onde foram encontradas atividades pelo método do DPPH que variaram de 128,3 a 240,2 e de 38,0 a 189,8 µmol de trolox/g respectivamente, para sementes e cascas. Para a cultivar Hass foram encontrados valores de

164 µmol/g para semente e 189 µmol/g para casca, inferiores aos encontrados neste trabalho. Para todas as cultivares analisadas, os resíduos sempre apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados às respectivas polpas.

A mesma tendência foi observada no estudo de Rodriguez-Carpena et al. (2011), onde foi encontrada maior atividade antioxidante em cascas e sementes de abacate das cultivares Hass e Fuerte em relação à polpa. Resultados semelhantes também foram verificados por Vinha, Moreira e Barreira (2013), em estudo de avaliação da atividade antioxidante de extratos aquosos de polpa, casca e semente de abacate da cultivar Hass. Mesmo utilizando extratos aquosos, as maiores atividades foram verificadas nos resíduos.

Rockenbach et al. (2011) visando o aproveitamento dos resíduos da vinificação como fonte de antioxidantes naturais, verificaram que dentre seis variedades de uvas estudadas somente a casca da variedade Isabel é que apresentou atividade antioxidante maior em relação à semente.

Elevados potenciais de redução do DPPH também foram observados por outros autores em cascas e sementes de diversos frutos como umbu (MELO; ANDRADE, 2010), acerola (CAETANO et al., 2009), goiaba (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009), casca de citrus (AL-JUHAIMI, 2014; BABBAR et al., 2011), casca de maçã (VIEIRA et al., 2011), casca e sementes de lichia, sementes de uva (BABBAR et al., 2011) e casca e sementes de manga (ARBOS; STEVANI; CASTANHA, 2013).

A interpretação dos resultados do método DPPH pode ser também expressa em EC_{50}. Portanto, quanto menor o valor do $EC_{50,}$ maior será a atividade antioxidante do extrato analisado. Nas Tabelas 6 e 7 estão apresentados os valores das concentrações dos extratos da polpa, casca e semente de abacates das cultivares Hass e Fuerte.

Tabela 6 - Valor do EC_{50} dos extratos etanólicos (80%) das amostras de abacate da cultivar Hass

Partes do Fruto	EC_{50} (mg/mL)
Polpa	$12,6 \pm 1,27^{A}$
Casca	$0,11 \pm 0,01^{B}$
Semente	$0,18 \pm 0,05^{B}$

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*

Tabela 7 - Valor do EC_{50} dos extratos etanólicos (80%) das amostras de abacate da cultivar Fuerte

Partes do Fruto	EC_{50} (mg/mL)
Polpa	18,5 ± 2,7 [A]
Casca	0,11 ± 0,01 [B]
Semente	0,16 ± 0,01 [B]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*

Novamente os extratos das polpas apresentaram as menores atividades antioxidante. As concentrações foram bastante pequenas, evidenciando assim alta atividade para as amostras de cascas (0,11 mg/mL) e sementes (0,18 e 0,16 mg/mL, para Hass e Fuerte, respectivamente). As polpas das cultivares Hass e Fuerte apresentaram as menores atividades, com EC_{50} de 12,6 e 18,5 mg/mL, respectivamente.

Kosinska et al. (2012) avaliaram o potencial de reaproveitamento de resíduos de frutos de abacate de duas cultivares distintas. Foi verificado que dentre as amostras estudadas a casca da cultivar Hass, em EC_{50} (0,358 mg em base seca), mostrou-se superior à semente (0,920 mg em base seca), enquanto que a semente da cultivar Shepard (0,776 mg em base seca) mostrou-se superior à casca (0,927 mg em base seca). No trabalho de Arbos, Stevani e Castanha (2013), a atividade antioxidante mensurada em casca de manga também foi superior quando comparada à semente, com valores de 1,01 mg/mL e 1,33 mg/mL, respectivamente.

4.1.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A capacidade antioxidante da polpa, casca e semente também foi avaliada pelo método de captura do radical $ABTS^{\bullet+}$. Este método pode ser aplicado tanto para estudos de antioxidantes lipofílicos quanto hidrofílicos e ainda para compostos puros e extratos de alimentos (RE at al., 1999). As Tabelas 8 e 9 apresentam os valores da atividade antioxidante equivalentes ao Trolox (valores TEAC), referentes aos extratos etanólicos de polpa, casca e semente de abacates das cultivares Hass e Fuerte.

Tabela 8- Atividade antioxidante equivalente ao Trolox do ABTS nos extratos etanólicos (80%) das amostras de abacate da cultivar Hass

Partes do Fruto	ABTS (µmol TEAC/g)
Polpa	15,2 ± 1,2 [B]
Casca	791,5 ± 35,9 [A]
Semente	645,8 ± 17,9 [A]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de *Tukey*
[1]expressos como µmol equivalente ao trolox por grama de amostra (liofilizada).

Tabela 9 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox do ABTS nos extratos etanólicos (80%) das amostras de abacate da cultivar Fuerte

Partes do Fruto	ABTS (µmol TEAC/g)
Polpa	10,7 ± 0,3 [C]
Casca	1.004,5 ± 52,0 [A]
Semente	580,8 ± 31,0 [B]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de *Tukey*
[1]expressos como µmol equivalente ao trolox por grama de amostra (liofilizada).

Assim como no ensaio antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH, a casca e a semente apresentaram maiores valores de atividade antioxidante quando comparadas à polpa dos frutos. No entanto, a casca da cultivar Fuerte apresentou maior atividade (1.004,5 µmol TEAC/g), superando, inclusive, a casca da cultivar Hass (791,5 µmol TEAC/g), que por sua vez não diferiu da atividade antioxidante da semente (645,8 µmol/g).

No estudo de Rodriguez-Carpena et al. (2011), a atividade antioxidante dos resíduos de abacate das cultivares Hass e Fuerte também mostrou maior atividade antioxidante quando comparados às respectivas polpas. Entretanto, observaram diferenças entre os solventes utilizados e as cultivares. Extratos acetônicos de ambas as cultivares apresentaram maior atividade antioxidante que o demais solventes utilizados, em cascas e sementes. Entre as cultivares, a casca da cultivar Fuerte apresentou maior atividade (242,26 mmol trolox/g peso fresco), já para a cultivar Hass, a maior atividade foi observada na semente (158,29 mmol trolox/g peso fresco). Pahua-Ramos et al. (2012), assim como nesta pesquisa, também relataram alta atividade antioxidante em extratos metanólicos de semente de abacate (173,3 µmol TE/g), embora inferiores aos encontrados neste trabalho.

Os resultados deste estudo também corroboram com os encontrados por Kosinska et al. (2012), que encontraram em extratos metanólicos da casca de abacate das cultivares Hass e Shepard, maiores atividades quando comparadas às sementes, com valores de 0,161 e 0,112 mmol trolox/g de peso seco, respectivamente.

Extratos etanólicos de sementes de abacate, jaca, longan, manga e tamarindo, avaliados pelo método ABTS, apresentaram maiores valores de atividade antioxidante quando comparados à polpa, com valores equivalentes em trolox de 725; 25,4; 692; 1397 e 1160 µmol/g, respectivamente (SOONG; BARLOW, 2004). O alto potencial antioxidante verificado para sementes de abacate corrobora com os obtidos no presente estudo. Valores elevados de atividade antioxidante por este método para cascas de *Punica granatum* (romã), *Nephelium lappaceum* (rambutam) e *Garcinia mangostana* (mangostão) também foram encontrados por Okonogi et al. (2007). Deng et al. (2012), em trabalho visando ao potencial bioativo de resíduos de frutas a fim de serem utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica, verificaram que dentre os resíduos de 50 frutas, cascas de manga, atemóia e carambola; e sementes de uva, longan e abacate foram os que apresentaram as maiores atividades, demonstrando novamente a importância dos estudos de reaproveitamento de resíduos de frutas.

Vieira et al. (2011), com cascas e polpas de 11 cultivares de maçã, verificaram que para todas as cultivares, a atividade exibida pelos resíduos foi de 3 a 5 vezes maior quando comparadas às respectivas polpas.

4.1.4 Capacidade de redução do ferro (FRAP)

Os resultados do poder redutor para os extratos etanólicos de polpa, casca e semente de abacates das cultivares Hass e Fuerte estão mostrados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP) nos extratos etanólicos (80%) das amostras de abacate da cultivar Hass

Partes do Fruto	FRAP (µmol Fe^{+2}/g)[1]
Polpa	34,2 ± 5,4 [C]
Casca	1.175,1 ± 102,9 [A]
Semente	656,9 ± 26,0 [B]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*
[1]expressos como µmol de Fe^{2+} por grama de amostra (liofilizada).

Tabela 11 - Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP) nos extratos etanólicos (80%) das amostras de abacate da cultivar Fuerte

Partes do Fruto	FRAP (µmol Fe^{+2}/g)[1]
Polpa	22,7 ± 1,1 [C]
Casca	1.881,4 ± 75,3 [A]
Semente	931,7 ± 65,6 [B]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de *Tukey*
[1]expressos como µmol de Fe^{2+}por grama de amostra (liofilizada).

O extrato da casca das duas cultivares reduziu a maior quantidade de Fe^{+3} em Fe^{+2} (1.175,1 e 1.881,4 µmol Fe^{+2}/g), o que foi seguido pelo extrato da semente (656,9 e 931,7 µmol Fe^{+2}/g). Os menores resultados encontrados foram nos extratos da polpa de ambas as cultivares. Tendência semelhante foi encontrada por Contreras-Calderón et al. (2011), ao estudarem as frutas exóticas da Colômbia, onde foi demonstrado maiores atividades para sementes de cajá, araçá jatobá, cupuaçu e abiu, comparadas às respectivas polpas.

Deng et al. (2012) observaram que cascas de atemóia, manga e blueberry foram mais efetivas na capacidade de reduzir Fe^{+3} em Fe^{+2} quando comparadas às respectivas sementes. Sementes de manga, tamarindo, longan e abacate, analisadas por Soong e Barlow (2004), apresentaram alto poder redutor quando comparadas à polpa, com valores de FRAP, em extratos etanólicos, de 2.572, 2.486, 1.388 e 1.484 µmol/g, respectivamente. Para os frutos de abacate, encontraram valores superiores ao presente trabalho para a semente, entretanto valor inferior para a polpa (9,6 µmol Fe^{+2}/g), o que pode estar associado às diferenças das cultivares em estudo, amadurecimento e entre outros fatores, como clima (WANG et al., 2012) e metodologia de extração.

Assim como nos frutos aqui analisados, outras pesquisas apontam a polpa como a parte de menor capacidade redutora. Em estudo feito por Vieira et al. (2011), foi observado que cascas de diferentes cultivares de maçã foram mais efetivas na capacidade de reduzir Fe^{+3} em Fe^{+2} quando comparada com às respectivas polpas. Kosinska et al. (2012) analisando extratos metanólicos de resíduos de duas cultivares de abacate observaram que a casca da cultivar Hass apresentou maior redução do Fe^{+3} em relação a casca da cultivar Shepard, o que pode ser explicado pela variabilidade genética influenciar e contribuir para a mudança do perfil químico dos compostos, influenciando assim na atividade antioxidante. As sementes de ambas as cultivares apresentaram menor redução, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

Analogamente, no trabalho de Rockenbach et al. (2011), onde foi analisado o poder de redução do ferro em resíduos de diferentes cultivares de uva, os autores verificaram que o maior poder redutor se concentrou nas sementes Pinot Noir e cascas da cultivar Isabel.

Wijngaard, Roble e Brunton (2009) em estudo visando à utilização de resíduos de frutas como fonte de antioxidantes naturais, também observaram maior poder de redução do ferro em extratos metanólicos de cascas de maçã, kiwi e uva quando comparados às polpas.

4.1.5 Autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico

A ação antioxidante dos extratos brutos etanólicos puros das amostras de polpa, casca e semente de abacate das cultivares Hass e Fuerte, avaliada pelo método de autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico, variou de 51,5 a 94,7%, como mostrado nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Atividade antioxidante pelo método de autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico nos extratos etanólicos (80%) das amostras de polpa, casca e semente de abacate da cultivar Hass

Partes do fruto	Atividade Antioxidante (%)
Polpa	65,3 ± 16,9 [B]
Casca	91,4 ± 2,3 [A]
Semente	94,7 ± 3,7 [A]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*

Tabela 13 - Atividade antioxidante pelo método de autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico nos extratos etanólicos (80%) das amostras de polpa, casca e semente de abacate da cultivar Fuerte

Partes do Fruto	Atividade Antioxidante (%)
Polpa	51,5 ± 3,9 [B]
Casca	92,4 ± 1,2 [A]
Semente	92,1 ± 2,8 [A]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*

Considerando o conceito de antioxidante, como substâncias que em baixas concentrações são capazes de inibir o processo oxidativo, cascas e sementes de ambas as cultivares foram as amostras que apresentaram relevante papel antioxidante em relação à polpa, indicando serem efetivas ao previnir em 91,4; 92,4; 94,7 e 92,1%, respectivamente, a oxidação da emulsão β-caroteno/ácido linoléico, expressando, assim, maior estabilidade frente à oxidação. Apesar dos melhores resultados não terem sido encontrados nos extratos das polpas (65,3 e 51,5%, Hass e Fuerte, respectivamente), a atividade por eles exibida foi significativa quando comparada a outros estudos. Costa et al. (2013) verificaram que no sistema β-caroteno/ácido linoleico, os extratos etanólicos de sementes e casca de "noni" apresentaram melhores percentuais de proteção da oxidação (54, 5 e 54,3%), sendo a menor atividade conferida pela polpa (31,6%). Valores próximos também foram encontrados entre os extratos etanólicos de bagaço de uvas tintas analisadas por Rockenbach et al. (2008), com porcentagem de 53 a 55. Analisando os resíduos de abacate deste trabalho verifica-se certa similaridade ao antioxidante sintético BHT, o qual capaz de inibir a oxidação em 93,9% (PRADO, 2009).

Outros resíduos agroindustriais também têm mostrado ação antioxidante, como extrato hidroacetônico de resíduo de goiaba, o qual apresentou uma porcentagem de inibição da oxidação de 81,95 (NASCIMENTO, ARAÚJO; MELO, 2010) e extratos etanólicos de bagaço de uva tinta, com uma porcentagem de 60 (MELO et al., 2011).

No sistema β-caroteno/ácido linoléico a atividade de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico é determinada por meio da atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. É um ensaio que difere dos outros métodos de avaliação da atividade antioxidante, como ABTS e DPPH, pois sua matriz de reação é uma emulsão, e o comportamento de muitos antioxidantes pode mudar ante o meio em que se encontram. Em emulsões, é relatada maior eficácia protetora de antioxidantes lipofílicos, já que se direcionam na interface óleo-água (KIOKIAS; VARZAKAS; OREOPOULOU, 2008).

4.1.6 Estabilidade oxidativa pelo método do Rancimat

Para a análise da estabilidade oxidativa, os extratos etanólicos de polpa, casca e semente de abacate das cultivares Hass e Fuerte foram adicionados ao óleo de soja. Os resultados são apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14 – Período de indução e Fator de proteção dos extratos etanólicos (80%) das amostras de polpa, casca e semente de abacate da cultivar Hass analisadas no rancimat (controle e óleo adicionado de extratos)

Partes do Fruto	Período de Indução (PI-horas)	Fator de proteção (PF)
Polpa	8,3 ± 0,09	1,13
Casca	9,3 ± 0,02	1,27
Semente	8,5 ± 0,03	1,16
Controle	7,3	

Tabela 15 – Período de indução e Fator de proteção dos extratos etanólicos (80%) das amostras de polpa, casca e semente de abacate da cultivar Fuerte analisadas no rancimat (controle e óleo adicionado de extratos)

Partes do Fruto	Período de Indução (PI-horas)	Fator de proteção (PF)
Polpa	7,4 ± 0,11	1,01
Casca	8,2 ± 0,03	1,12
Semente	8,0 ± 0,01	1,09
Controle	7,3	

Este método é um teste de oxidação acelerada, que determina a estabilidade de óleos e gorduras, onde o período de indução é caracterizado pela mudança da condutividade da água deionizada devido aos produtos gerados da oxidação. O processo é realizado sob altas temperaturas e constante aeração. O período de tempo necessário para o início da oxidação do óleo de soja, sem adição de fontes de antioxidantes (controle), foi de 7,3h. Contudo, o tempo necessário para o período de indução do óleo foi mais elevado quando os extratos etanólicos foram adicionados.

Todos os extratos, sem exceção, apresentaram período de indução maior que o controle (7,3h), demonstrando serem efetivos no atraso do início da fase de propagação da oxidação. Entretanto, quando comparados ao antioxidante sintético BHT, utilizado como padrão (7,5h) (PRADO, 2009), somente a polpa da cultivar Hass apresentou um período de indução menor (7,4h).

As amostras da casca de ambas as cultivares apresentaram maiores fatores de proteção (1,27 e 1,12, Hass e Fuerte, respectivamente), quando comparadas à semente e polpa dos frutos. Broinizi et al. (2007), analisando o efeito da adição de extratos aquoso e alcoólico do

pedúnculo do caju, obtiveram fatores de proteção de 1,2, resultados próximos aos encontrados a este trabalho.

Baboli e Kordi (2010) avaliaram a estabilidade oxidativa de óleo de semente de melancia e obtiveram período de indução de 5,41 horas, resultado menor quando comparado a este estudo para todas as amostras analisadas. O mesmo foi observado por Anwar, Bhanger e Kazi (2003), que ao avaliarem o período de indução de óleo de semente de girassol e canola, obtiveram um período de indução de 3,7 e 5,4 horas, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo para amostras das duas cultivares de abacate corroboram com os encontrados por Farhoosh (2007), que ao avaliarem a estabilidade oxidativa de óleo de soja, obtiveram um período de indução de 8,25 horas.

Como pode ser observado, os resíduos de abacate apresentam elevada atividade antioxidante em matriz lipídica, superando até mesmo o potencial do antioxidante sintético BHT utilizado na indústria alimentícia.

4.1.7 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

A capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) tem sido considerado um método importante em sistemas biológicos, porque mensura a capacidade de substâncias em inibir reações de oxidação induzidas por uma espécie reativa de oxigênio pertencente ao grupo de radicais livres denominados peroxila (VALDEZ-MORALES et al., 2014).

A atividade antioxidante pelo método de sequestro dos radicais peroxila dos extratos da polpa, casca e semente de abacates das cultivares Hass e Fuerte, obtidos com os solvente etanol 80%, expressos em µmol TE/mg (equivalente ao trolox), estão apresentados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 - Atividade antioxidante pelo método ORAC nos extratos etanólicos (80%) das amostras de polpa, casca e semente de abacate da cultivar Hass

Partes do Fruto	ORAC (µmol trolox/mg)[1]
Polpa	0,09±0,01 [C]
Casca	2,8±0,4[A]
Semente	2,2±0,7 [B]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*

[1]expressos como µmol de Trolox por miligrama de amostra (liofilizada).

Tabela 17 - Atividade antioxidante pelo método ORAC nos extratos etanólicos (80%) das amostras de polpa, casca e semente de abacate da cultivar Fuerte

Partes do Fruto	ORAC (µmol trolox/mg)[1]
Polpa	0,04±0,004 [B]
Casca	9,9±0,9 [A]
Semente	10,6±1,0 [A]

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de *Tukey*
[1]expressos como µmol de Trolox por miligrama de amostra (liofilizada).

Dentro das duas cultivares analisadas, casca e semente apresentaram maiores valores de atividade antioxidante quando comparadas à polpa dos frutos. No entanto, os resíduos da cultivar Fuerte apresentaram maior atividade 9,9 e 10,6 µmol/mg, respectivamente para casca e semente, superando, inclusive, os resíduos da cultivar Hass (2,84 e 2,23 µmol/mg para casca e semente, respectivamente).

A mesma tendência foi observada no estudo de Wang, Bostic e Gu (2010), que ao avaliarem oito cultivares de abacate demonstraram maior capacidade de absorção do radical oxigênio em cascas e sementes dos frutos, com valores ORAC variando de 58,3 a 631,4 e de 229,0 a 464,4 µmol TE/g. Para a mesma cultivar Hass, foi encontrada maior atividade antioxidante na casca quando comparada à respectiva semente. Para as demais variedades, a maior atividade foi verificada na semente.

Já em cascas de laranja, manga, goiaba e maçã o valor ORAC encontrado por Zulkifli et al. (2012) foi de 60,59; 59,83; 54,91 e 37,54 µM ET/g. No estudo de Valdez-Morales et al. (2014), cascas de diferentes cultivares de tomate apresentaram maiores valores de ORAC (705,3 a 4.131,7 µmol) quando comparadas às respectivas sementes (1.028,3 a 1.825,0 µmol equivalente em Trolox/100 g).

Kosinska et al. (2012) utilizando duas cultivares de abacate, encontrou maior valor ORAC (0,47 mmol Trolox/g em base seca) no extrato metanólico da casca de abacate Hass quando comparado com a semente (0,21 mmol Trolox/g em base seca). Entretanto, para a cultivar Shepard, a maior atividade antioxidante foi encontrada na semente (0,35 mmol Trolox/g em base seca). A alta atividade antioxidante exibida pela casca da cultivar Hass em relação a Shepard pode estar associada com a presença de alguns compostos fenólicos que não foram encontrados na casca desta cultivar (HAGERMAN et al., 1998; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Dentre outros resíduos com capacidade de sequestrar radicais peroxila, destacam-se também casca de uva, manga, romã e maçã; e sementes de abacate, longan e manga (Pérez-

Jiménez et al., 2008). Sousa e Vieira (2011) sugeriram categoricamente que os resíduos agroindustriais deveriam ter seu reaproveitamento implementado de forma a minimizar o desperdício de alimentos e gerar nova fonte alimentar.

Assim, os resíduos gerados na indústria a partir de frutos e vegetais, especificamente de abacate, possuem potencial para serem utilizados como fonte de antioxidantes naturais, conforme demonstrado pelas diferentes metologias discutidas anteriormente.

4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto da casca e semente para o isolamento dos compostos bioativos

Pelo fato da casca e semente da cultivar Fuerte ter apresentado os melhores resultados para o teor de fenólicos totais (Tabela 3) e atividade antioxidante pelos métodos do DPPH (Tabela 5), ABTS (Tabela 9), FRAP (Tabela 11) e ORAC (Tabela 17) em relação a Hass, esta foi então selecionada para o fracionamento.O fluxograma do processo de fracionamento e isolamento do extrato bruto da casca e da semente está ilustrado na Figura 15.

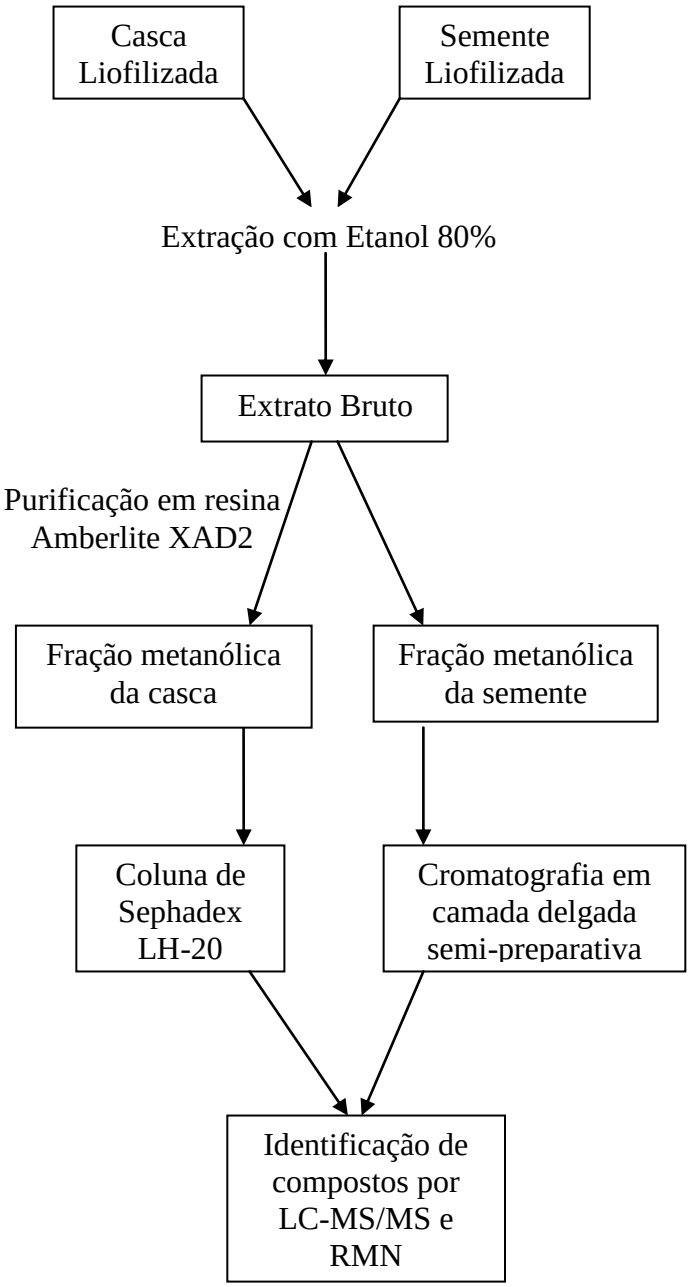


Figura 15- Fluxograma do processo de fracionamento e isolamento do extrato bruto da casca e da semente da cultivar Fuerte

4.2.1 Purificação do extrato bruto da casca em resina Amberlite XAD2

O processo inicial de purificação de compostos com atividade antioxidante da casca foi realizado utilizando a resina Amberlite XAD2. Os resultados da atividade antioxidante pelos métodos DPPH (EC_{50}) e ORAC das frações metanólica e aquosa oriundas do processo de purificação com a resina XAD2 estão mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ORAC e EC_{50} das frações da purificação em resina Amberlite XAD2 da cultivar Fuerte

	DPPH (µmol trolox/mg)	ORAC (µmol trolox/mg)	EC_{50} (mg/mL)
Extrato bruto casca	5,91±0,72 ^{A}	15,30± 2,10 ^{A}	17,79
Fração metanólica	4,94±0,14 ^{A}	15,92± 1,17 ^{A}	20,38
Fração aquosa	6,08±0,57 ^{A}	5,48± 0,87 ^{B}	50,65

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de *Tukey*

Com relação à atividade antioxidante pelo método DPPH, os resultados obtidos foram de 5,91; 4,94 e 6,08 µmol trolox/mg para o extrato bruto, fração metanólica e fração aquosa, respectivamente, os quais não diferiram estatisticamente. Com relação à atividade antioxidante pelo método ORAC, verifica-se que o extrato bruto (15,30 µmol trolox/mg) não diferiu da fração metanólica (15,92 µmol trolox/mg), mas foi significativamente maior que a fração aquosa (5,48 µmol trolox/mg). Com relação à atividade pelo método do EC_{50}, verifica-se que o extrato bruto e a fração metanólica da XAD2 apresentaram os maiores valores de atividade (17,79 e 20,38 mg/mL, respectivamente), seguida pela fração aquosa, a qual apresentou menor atividade (50,65 mg/mL).

Estas frações também foram analisadas por Cromatografia em camada delgada (CCD), o que foi possível verificar algumas diferenças. A cromatoplaca revelada sob luz UV a 254 nm (Figura 16) e UV a 365nm (Figura 17) permitiu a visualização de um composto concentrado na fração metanólica da XAD2, o qual não foi encontrado no extrato bruto e nem na fração aquosa.

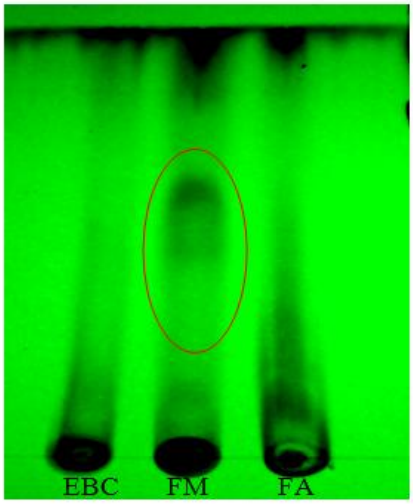


Figura 16 – Cromatografia em camada delgada irradiada a 254nm.
EBC: Extrato bruto da casca; FM: Fração metanólica da XAD 2; FA: Fração aquosa da XAD 2

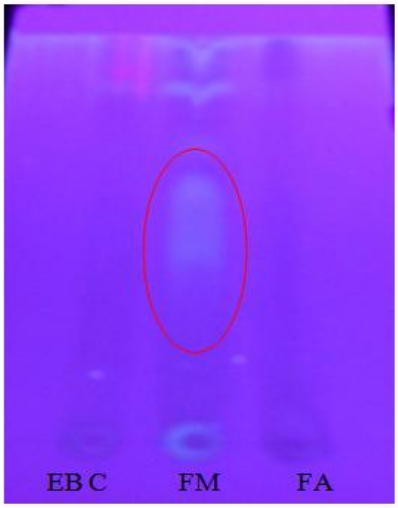


Figura 17 – Cromatografia em camada delgada irradiada a 365nm.
EBC: Extrato bruto da casca; FM: Fração metanólica da XAD 2; FA: Fração aquosa da XAD 2

O extrato bruto da casca (EBC) e as frações (metanólica e aquosa) foram analisados pela atividade antioxidante *on-line* por HPLC-FR-ABTS (Figuras 18, 19 e 20), para comparação dos perfis químicos e avaliação da evolução da atividade antioxidante durante o processo de fracionamento.

De acordo com as figuras, observa-se que o extrato bruto apresentou 5 picos com atividade antioxidante (Figura 18). Quando da purificação com a resina XAD2, a composição química bioativa ficou concentrada em 3 picos (Figura 19). A fração aquosa da XAD2 apresentou vários picos, entretanto com baixa atividade antioxidante (Figura 20). Embora os valores da atividade antioxidante do extrato bruto pelo método ORAC, DPPH e pelo EC_{50} sejam relevantes quando comparados à fração aquosa e semelhantes quando comparados à fração metanólica da XAD2 (Tabela 18), nota-se que na fração metanólica da XAD2 a atividade foi concentrada em poucos compostos.

Portanto, a partir dos resultados obtidos, a etapa de purificação pela XAD2 foi imprescindível para a continuação do fracionamento. A fração metanólica foi coletada, concentrada e utilizada para a próxima etapa.

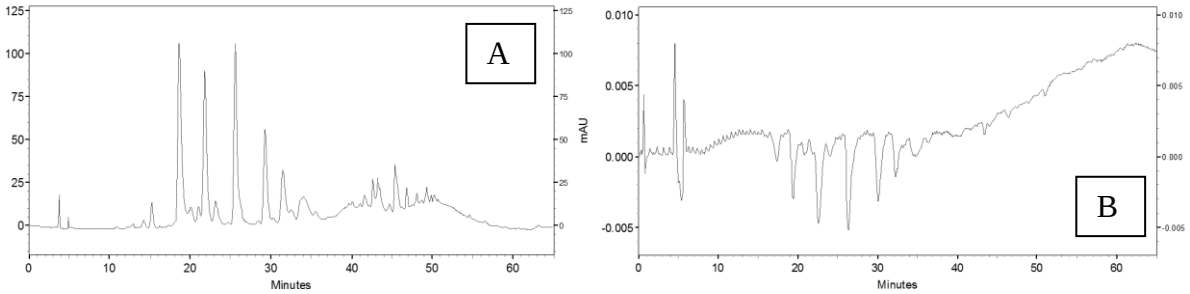


Figura 18 - Cromatogramas do extrato bruto da casca de abacate Fuerte detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B)

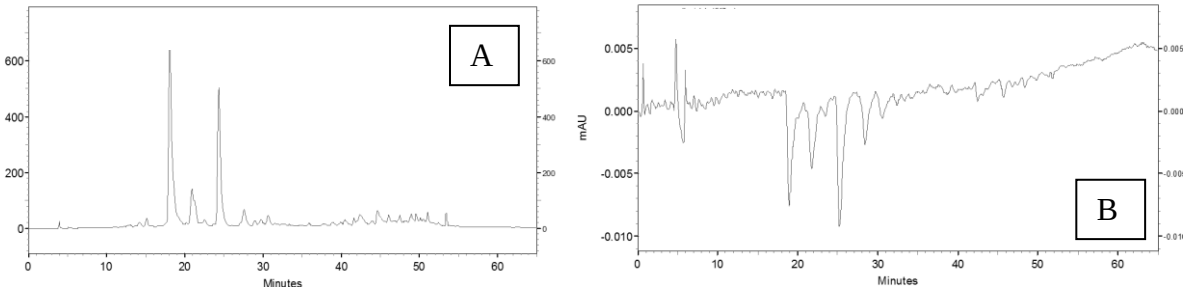


Figura 19 - Cromatogramas da fração metanólica da XAD2 detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B)

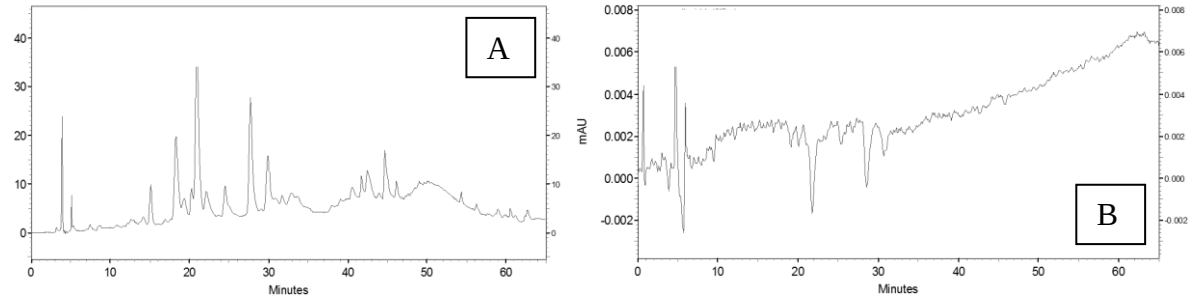


Figura 20 - Cromatogramas da fração aquosa da XAD2 detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B)

Pelo fato da fração metanólica XAD2 apresentar alta atividade antioxidante e estar parcialmente purificada em relação ao extrato, esta foi selecionada para o fracionamento pela técnica de cromatografia em coluna aberta em gel de Sephadex LH-20, como uma segunda etapa para o processo de isolamento dos compostos bioativos.

A eluição da fração XAD2 através da coluna de Sephadex LH-20 proporcionou a coleta de 76 subfrações, que na sequência foram submetidas à análise por CCD e reveladas com luz UV a 254 e 365 nm (Figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28). Na sequência as subfrações foram agrupadas de acordo com a separação cromatográfica.

Nas primeiras subfrações aplicadas na placa de CCD (subfrações 1 a 28) não foram observadas bandas intensas após eluição (Figuras 21, 22, 23 e 24). Entretanto, a partir da subfração 29 estas começaram a aparecer com intensidades distintas de fluorescência quando irradiadas com luz UV a 365nm (Figuras 24 e 26). As subfrações 29, 30 e 31 (Figura 24) apresentaram bandas de coloração amarela fluorescente no início da eluição e bandas de coloração branca fluorescente no meio da placa. A partir da subfração 32 (Figura 24) observam-se bandas de coloração branca fluorescentes no topo da placa, até desaparecerem na subfração 41 (Figura 26). Estas mesmas subfrações também apresentaram bandas de coloração amarela e vermelha fluorescentes. Na subfração 42, bandas de coloração vermelha aparecem no topo da placa, que se intensificaram com o decorrer do fracionamento até o momento que desapareceram nas subfrações 58 a 76 (Figura 28).

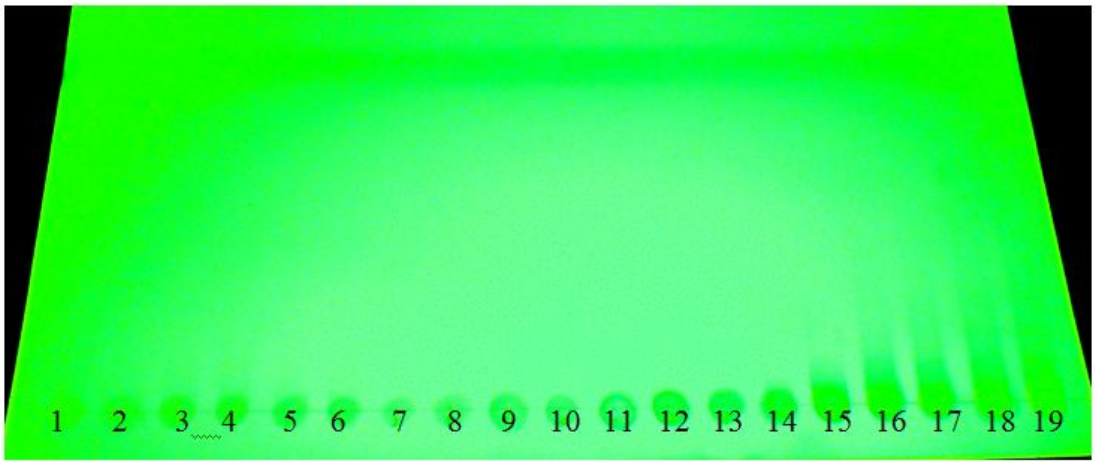


Figura 21 - Cromatografia em camada delgada, irradiada a 254nm, das subfrações 1 a 19 obtidas pela coluna de Sephadex LH-20

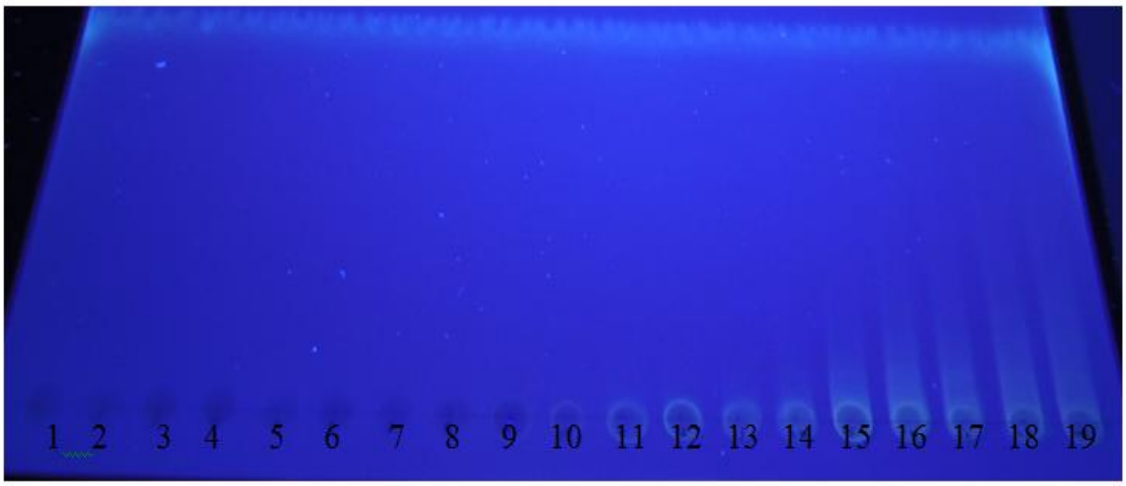


Figura 22- Cromatografia em camada delgada, irradiada a 365nm, das subfrações 1 a 19 obtidas pela coluna de Sephadex LH-20

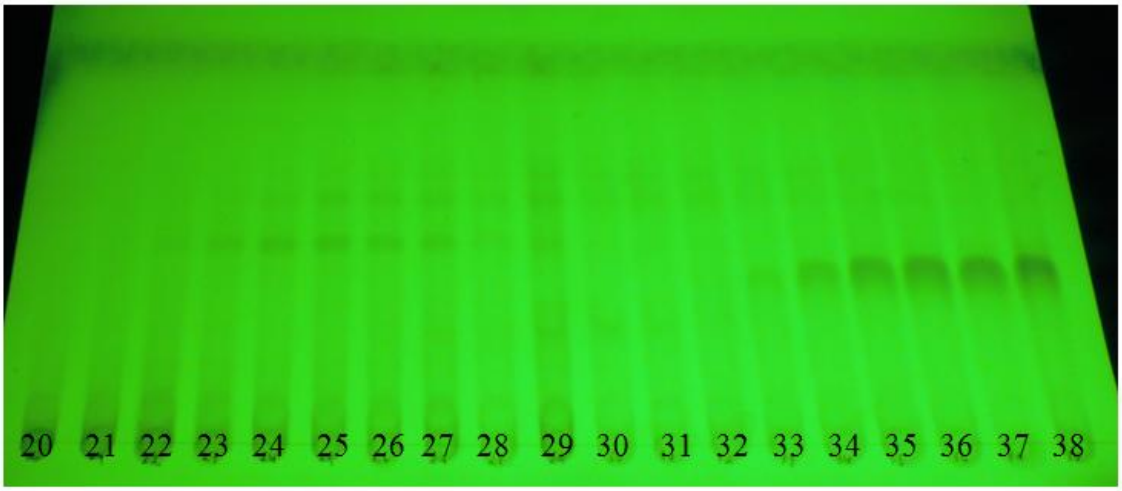


Figura 23 - Cromatografia em camada delgada, irradiada a 254nm, das subfrações 20 a 38 obtidas pela coluna de Sephadex LH-20

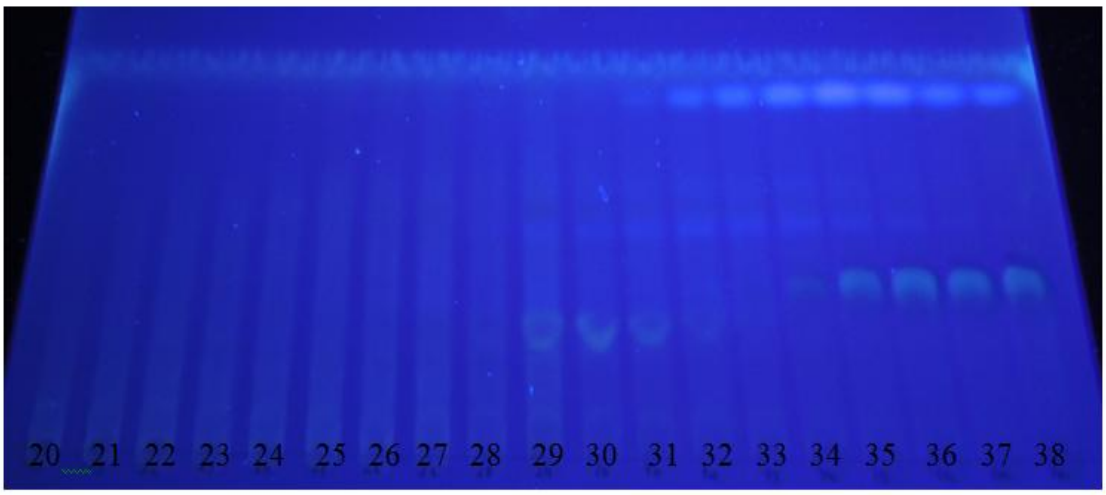


Figura 24 - Cromatografia em camada delgada, irradiada a 365nm, das subfrações 20 a 38 obtidas pela coluna de Sephadex LH-20

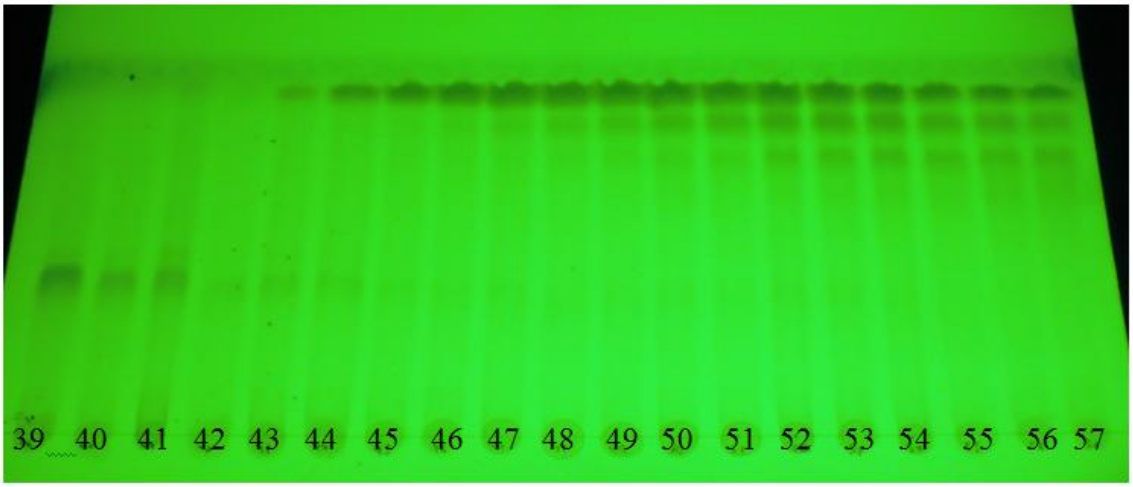


Figura 25 - Cromatografia em camada delgada, irradiada a 254nm, das subfrações 39 a 57 obtidas pela coluna de Sephadex LH-20

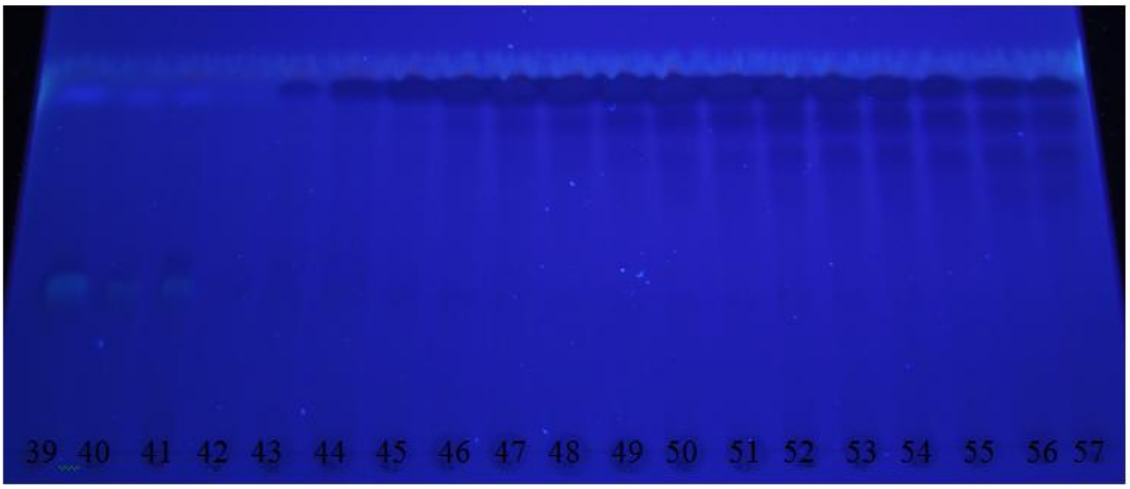


Figura 26 - Cromatografia em camada delgada, irradiada a 365nm, das subfrações 39 a 57 obtidas pela coluna de Sephadex LH-20

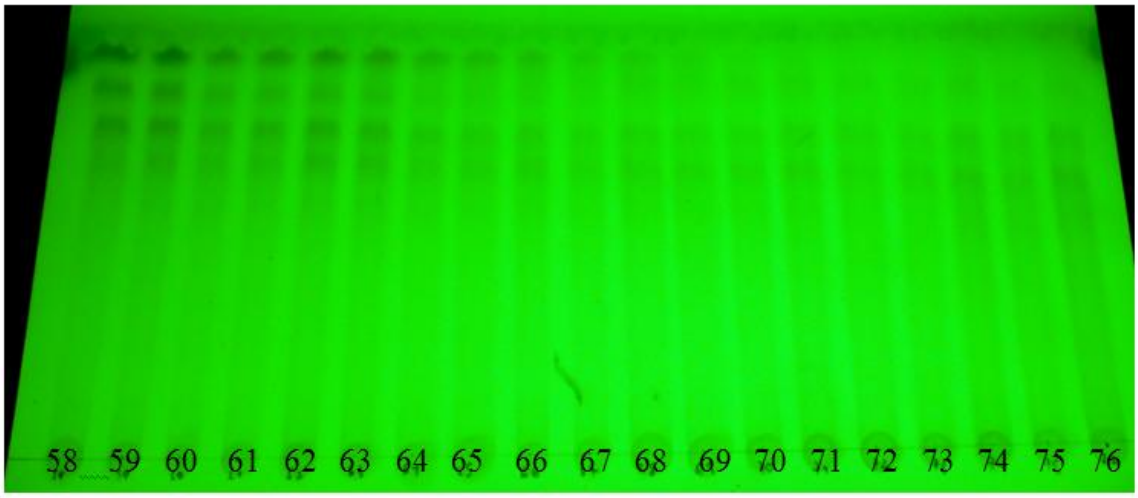


Figura 27 - Cromatografia em camada delgada, irradiada a 254nm, das subfrações 58 a 76 obtidas pela coluna de Sephadex LH-20

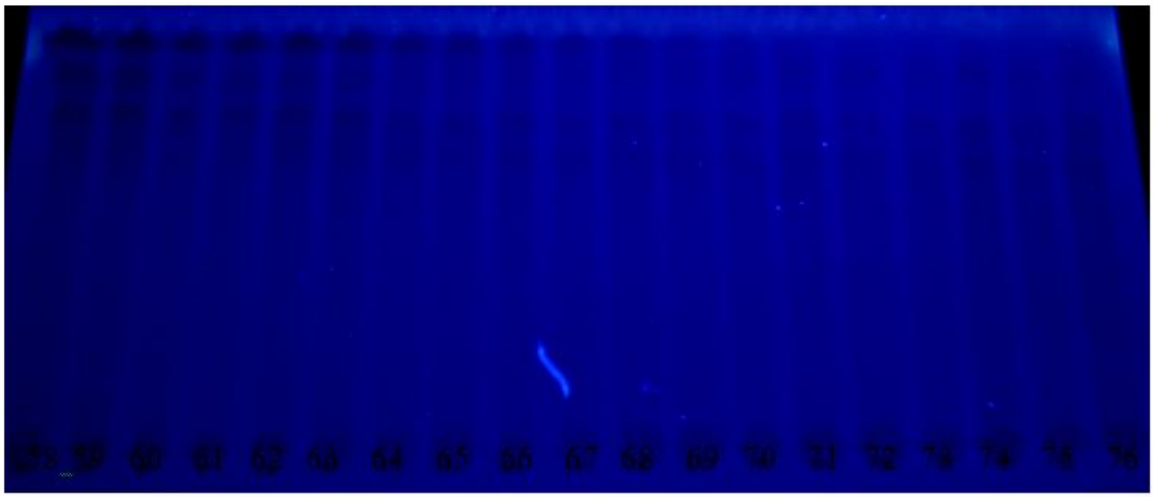


Figura 28 - Cromatografia em camada delgada, irradiada a 365nm, das subfrações 58 a 76 obtidas pela coluna de Sephadex LH-20

Portanto, de acordo com os resultados apresentados, foi possível concluir que o fracionamento primeiramente em resina XAD2 e depois em gel de Sephadex LH-20 foi eficaz na separação de uma grande quantidade de compostos de polaridades distintas.

Na sequência as 76 subfrações foram reagrupadas, para avaliação da atividade antioxidante pelos métodos ORAC, DPPH (EC_{50}) e *on-line* por HPLC-FR-ABTS da seguinte forma: Fração 1 (agrupamento das subfrações 1-19); Fração 2 (agrupamento das subfrações 20 a 28); Fração 3 (agrupamento das subfrações 29 a 31); Fração 4 (agrupamento das subfrações 32 a 41); Fração 5 (agrupamento das subfrações 42 a 57) e Fração 6 (agrupamento das subfrações 58 a 76) (Tabela 19).

Tabela 19 - Atividade antioxidante pelo método ORAC, DPPH e Ec_{50} das subfrações reagrupadas da coluna de gel SEPHADEX LH-20

Fração	ORAC (µmol trolox/mg)	DPPH (µmol trolox/mg)	EC_{50} (mg/ml)
1	n.d	n.d	n.d
2	4,55	2,15	128,2
3	4,59	1,16	126,4
4	14,08	12,05	56,03
5	17,61	13,34	60,52
6	4,34	4,99	122,7

n.d: não detectada

Foi possível verificar que as frações que apresentaram as maiores atividades antioxidante pelo método ORAC, DPPH e EC_{50} foram as 4 e 5, com destaque para a fração 5. Nota-se que essas duas frações, originadas do agrupamento de subfrações da LH-20, apresentam compostos distintos quando reveladas com UV a 254 nm (Figuras 23 e 25) e 365 nm (Figuras 24 e 26).

Na sequência todas as frações ativas (2, 3, 4, 5 e 6) foram também avaliadas quanto à atividade antioxidante *on-line* por HPLC-FR-ABTS.

Pode-se observar que a fração 4 (Figura 31) apresentou apenas um pico e de alta atividade, identificado como ácido cafeoilquínico. Alta atividade também foi encontrada na fração 5 (Figura 32), entretanto esta apresentou 2 picos majoritários, sendo que o de maior absorbância a 280 nm foi também o que apresentou a maior atividade, os quais foram identificados como procianidina B_2 e epicatequina. Nas demais frações (2, 3 e 6) (Figuras 29, 30 e 33) não foram encontrados compostos com atividade antioxidante significativa.

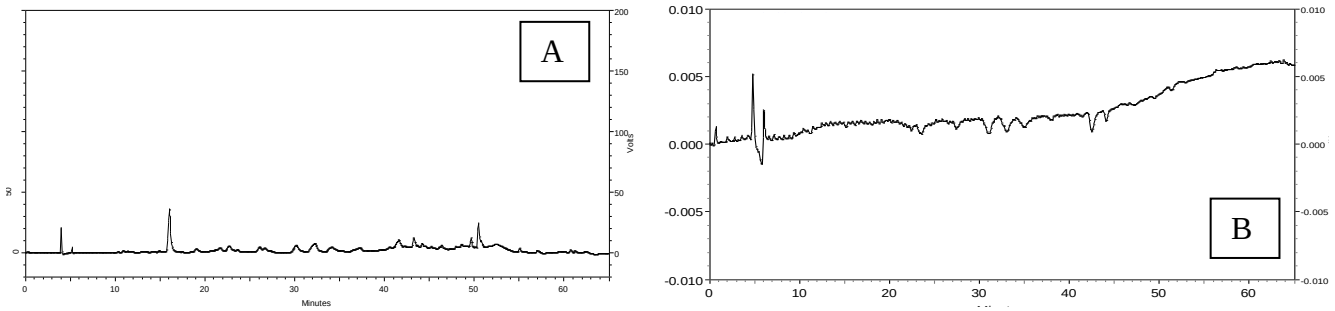


Figura 29 - Cromatogramas da fração 2 detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B)

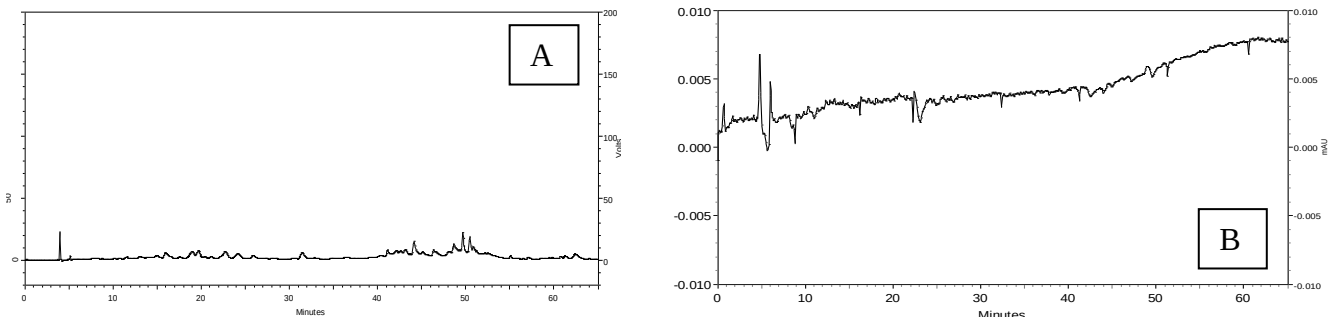


Figura 30 - Cromatogramas da fração 3 detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B)

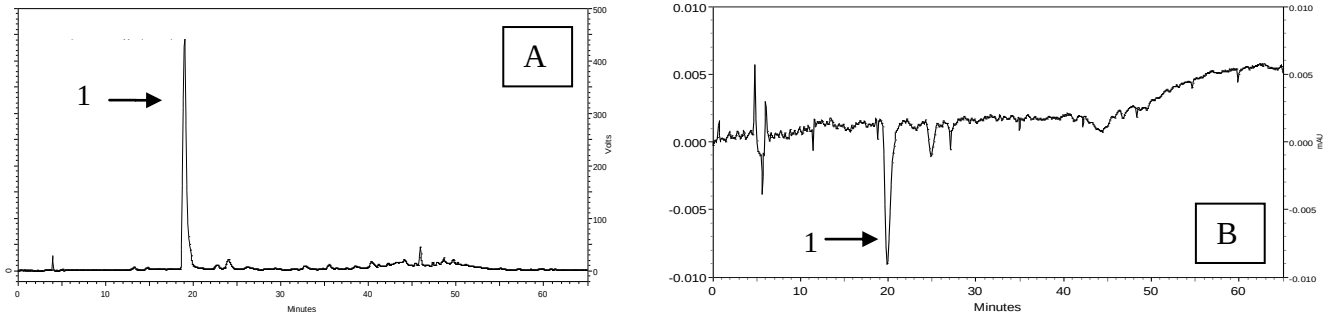


Figura 31- Cromatogramas da fração 4 detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B). Pico 1: Ácido cafeoilquínico

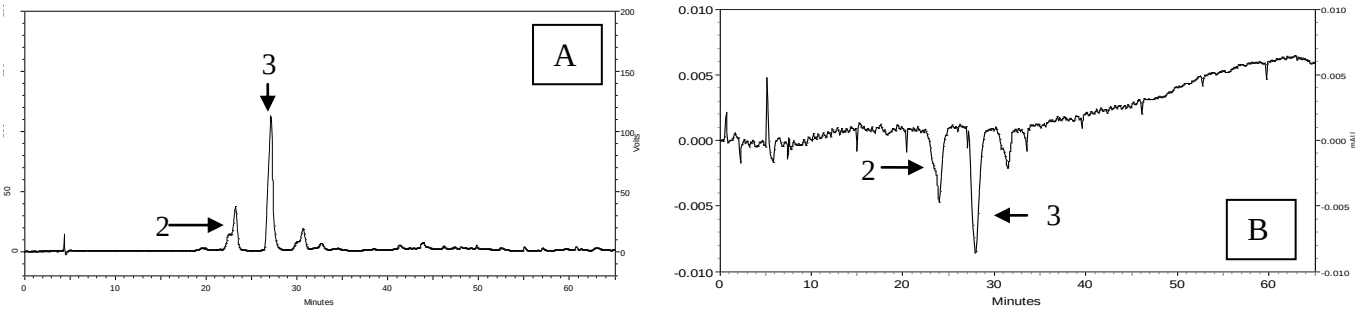


Figura 32- Cromatogramas da fração 5 detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B). Pico 2: Procianidina B_2 e Pico 3: Epicatequina

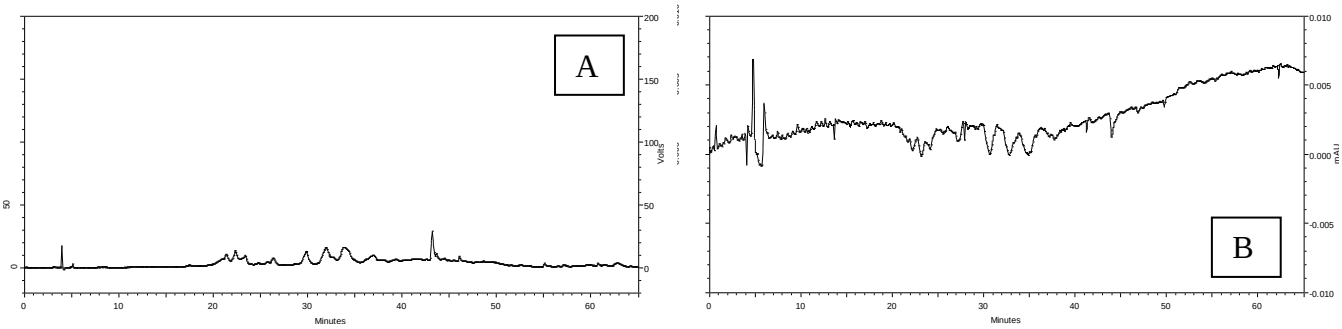


Figura 33- Cromatogramas da fração 6 detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B)

De acordo com os resultados, verifica-se que o fracionamento foi eficaz e de bom rendimento na obtenção de frações parcialmente purificadas. Na figura 34 é mostrado o fluxograma de todo o rendimento durante o processo de purificação.

Rendimento:

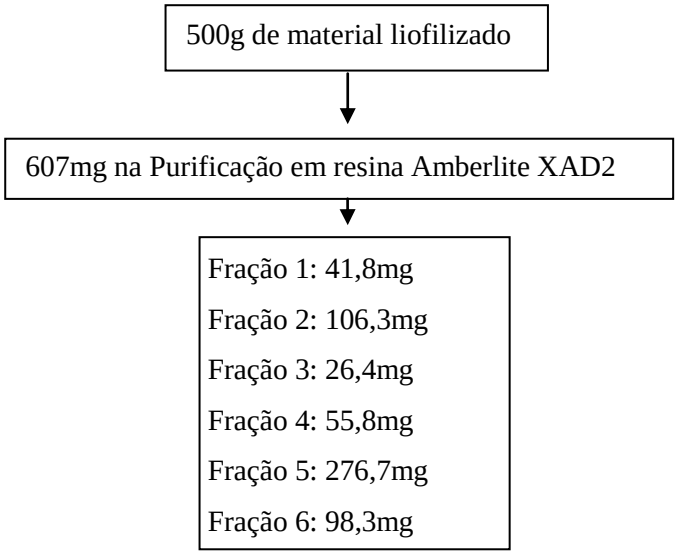


Figura 34- Fluxograma de rendimento durante o processo de purificação.

As frações mais ativas, a 4 (agrupamento das subfrações 32 a 41) e a 5 (agrupamento das subfrações 42 a 57) seguiram para avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do ânion superóxido, ácido hipocloroso e GC/MS, cujos resultados estão mostrados nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20- Capacidade de desativação do ânion superóxido e ácido hipocloroso das subfrações de maior bioatividade, pelo fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 da casca da cultivar Fuerte, dos extratos brutos etanólicos da casca das cultivares Hass e Fuerte e padrões

Fração	Ânion superóxido (EC_{50} mg/mL)	Ácido hipocloroso (EC_{50} mg/mL)
4	0,023 ± 0,003	0,0082 ± 0,0003
5	0,013 ± 0,004	0,0020 ± 0,0001
Amostras		
Casca Hass	0,052 ± 0,004	0,0052 ± 0,0002
Casca Fuerte	0,012 ± 0,002	0,0073 ± 0,0001
Padrões		
Catequina	0,090±0,001	0,00050±0,00005
Epicatequina	0,227±0,009	0,00081±0,00001
Procianidina B1	nd	0,00062±0,0001
Procianidina B2	nd	0,00017±0,00003

Foi possível verificar que as 2 frações apresentaram alta capacidade de sequestro do ânion superóxido e do ácido hipocloroso, com destaque para a fração 5. Também foram feitas as análises nos extratos brutos etanólicos da casca de ambas as cultivares para comparação de dados (Tabela 20). Essas frações também foram avaliadas pela técnica de GC/MS, o que possibilitou a identificação de 18 compostos na fração 4 e 13 compostos na fração 5 (Tabela 21). Os compostos que apresentaram maior abundância foram o hexatrimetillsilil-trans-5-o-cafeoil-d-ácido quínico na fração 4 e a epicatequina na fração 5, com porcentagens de 40,58 e 59,69%, respectivamente.

Tabela 21 - Tempos de retenção, porcentagem de cada componente e íons importantes do espectro de massa dos compostos fenólicos silanizados identificados nas subfrações da casca de abacate, obidos pela técnica de GC/MS

Composto	**TR (min)**	**Fração 4 Intensidade relativa (%)**	**Fração 5 Intensidade relativa (%)**	**Ions (m/z)**
3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecano, 2,2,10,10-tetrametil	5,69	1,23		73(100) 117(57) 116(28) 147(15) 103(12)
3,7-Dioxa-2,8-disilanonano, 2,2,8,8-tetrametil-5-[(trimetilsilil)oxi]	5,92	2,12	1,93	147(100) 73(92) 205(50) 103(36) 117(33)
Ácido butanodióico, bis(trimetilsilil) Ester	6,20	5,57	0,70	147(100) 73(36) 148(15) 247(14) 75(10)
Xilitol, 1,2,3,4,5-pentaquis-o-(trimetilsilil)	8,69	2,23		73(100) 217(57) 147(53) 307(37) 103(37)
Ácido benzenopropanoico, .alfa.-oxo-.beta.,.beta.-bis(trimetilsilil)	8,75	1,92		147(100) 73(37) 293(25) 148(15) 224(13)
D-galactopiranosil brometo, tetraacetato	9,22	3,23		204(100) 73(58) 147(21) 205(18) 206(8)
D-frutose, 1,3,4,5,6-pentakis-o-(trimetilsilil)	9,32	2,35		73(100) 217(65) 193(46) 147(27) 370(25)
Pregnano, silane deriv.	9,59	3,82	0,62	345(100) 73(81) 255(44) 346(32) 147(32)

continuação

				conclusão
Alfa.-d-manopiranose, 1,2,3,4,6-pentakis-o-(trimetilsilil)	9,75	1,36		204(100) 73(75) 191(49) 327(33) 312(25)
1-c-octil-2,3,4,6-tetraquis-o-(trimetilsilil)hexopiranose	9,94	3,65		73(100) 217(62) 147(42) 467(30) 145(28)
Ácido-*p*-cumárico	9,98	0,53		293(100) 73(97) 249(76) 219(76) 308(64)
2,3,4,6-Tetra-o- trimetilsilil-1-[1,7-dicarba-closo-dodecaborano-(12)-1-yl]-d-glucopiranose,alfa/beta-gemisch	10,22	2,75		73(100) 467(50) 129(45) 147(41) 204(31)
Glucopiranose, 1,2,3,4,6-pentaquis-o-(trimetilsilil)	10,43	3,20		204(100) 73(85) 217(30) 147(29) 205(24)
Beta-d-galactofuranose, 1,2,3,5,6-pentaquis-o-(trimetilsilil)	10,77	19,94	3,66	217(100) 73(93) 359(42) 147(39) 539(33)
2-Ácido propenoico, 3-[3,4-bis[(trimetilsilil)oxi]fenil]-, trimetilsilil Ester	11,15	1,09		219(100) 73(72) 396(58) 397(20) 381(18)
(-)-Epicatequina TMS	17,48	4,43	59,69	368(100) 73(49) 355(48) 369(44) 356(16)
hexatrimetillsilil-trans-5-o-cafeoil-d-ácido quínico	20,27	40,58	4,37	345(100) 73(75) 255(62) 307(39) 346(34)
Beta.-l-manofuranose, 6-deoxi-1,2,3,5-tetraquis-o-(trimetilsilil)	8,99		1,38	217(100) 73(95) 147(26) 204(19) 218(19)
9h-purina, 9-(trimetilsilil)-2,6-bis[(trimetilsilil)oxi]	9,45		1,11	73(100) 368(69) 369(22) 249(15) 191(14)
1h-purina-2,6,8(3h)-triona, 4,9-dihidro-1,3,4,9-tetraquis(trimetilsilil)	18,30		2,73	456(100) 73(54) 355(45) 457(43) 458(23)
2-(3,4-Bis[(trimetilsilil)oxi]fenil)-3,5,7-tris[(trimetilsilil)oxi]-4h-cromeno-4-one	20,84 32,40		3,10 0,71	575(100) 576(46) 307(42) 73(36) 577(25)
Ácido tetracosanóico	31,81		1,33	368(100) 73(37) 369(35) 370(14) 617(9)
Tetra-fenilacetato 5TMS	37,80		1,68	560(100) 561(48) 648(39) 73(39) 559(29)
Quercetina	39,47		15,63	648(100) 649(64) 650(37) 559(32) 73(21)

4.2.2 Purificação do extrato bruto da semente em resina Amberlite XAD2

Os extratos etanólicos da semente da cultivar Fuerte também passaram pela etapa de purificação em resina Amberlite XAD2. A fração metanólica obtida pela XAD2 foi utilizada para o fracionamento de compostos pela técnica de cromatografia em camada delgada semi-preparativa em fase normal, como segunda etapa do isolamento de compostos bioativos. Este tipo de cromatografia é rápido e também resulta, em alguns casos, em frações purificadas ou compostos isolados e com alto rendimento.

A eluição da fração da semente da cutivar Fuerte obtida na XAD2 resultou em 4 novas subfrações. Estas subfrações foram avaliadas quanto à atividade antioxidante pelos métodos DPPH (EC_{50}), ORAC, ânion superóxido, ácido hipocloroso (Tabela 22), atividade antioxidante *on-line* por HPLC-FR-ABTS (Figuras 35, 36, 37 e 38) e GC/MS (Tabela 23). Também foram feitas as análises no extrato bruto da semente das cultivares Hass e Fuerte e nos padrões para comparação de dados (Tabela 22).

Tabela 22 - Atividade antioxidante pelo método DPPH, Ec_{50}, ORAC, ânion superóxido e ácido hipocloroso das subfrações da semente da XAD2 da cromatografia em camada delgada em fase normal, do extrato bruto da semente das cultivares Hass e Fuerte e padrões

Subfrações	DPPH (µmol trolox/mg)	EC_{50} (mg/ml)	ORAC (µmol trolox/mg)	Ânion superóxido (EC_{50} mg/mL)	Ácido hipocloroso (EC_{50} mg/mL)
1	3,8±1,6	67,57	19,46±0,7	0,067±0,005	0,0014±0,0001
2	2,8±0,15	62,79	9,86±0,4	0,031±0,003	0,0035±0,003
3	0,3±0,16	nd	1,44±0,21	nd	nd
4	2,03±0,9	nd	4,0±0,6	0,150±0,009	nd
Amostras					
Semente Hass				0,070±0,002	0,0067±0,0001
Semente Fuerte				0,041±0,001	0,0086±0,0004
Padrões					
Catequina	7,9±0,25	nd	24,4±9,6	0,090±0,001	0,00050±0,00005
Epicatequina	10,52±0,6	nd	32,16±1,74	0,227±0,009	0,00081±0,00001
Procianidina B_1	7,0±0,5	nd	29,23±1,05	nd	0,00062±0,0001
Procianidina B_2	12,41±0,4	nd	35,42±1,11	nd	0,00017±0,00003

nd : não detectada

De acordo com os resultados da Tabela 22 foi possível verificar que a subfração 1 foi que apresentou a maior atividade antioxidante quando comparada às demais subfrações para os métodos do DPPH, EC_{50}, ORAC e ácido hipocloroso, apesar de não ser a mais ativa quanto ao sequestro do ânion superóxido. As subfrações 3 e 4 apresentaram atividades pouco significativas em todos os métodos utilizados.

Sequencialmente, todas as subfrações foram analisadas quanto à atividade antioxidante *on-line* por HPLC-FR-ABTS. Pode-se observar que a subfração 1 (Figura 35) apresentou 3 picos, sendo os picos de número 4 e 3 de alta atividade antioxidante, os quais foram identificados como catequina e epicatequina. Para as demais subfrações (2 e 3) (Figuras 36 e 37) a atividade foi antioxidante foi praticamente ausente. Na subfração 4

(Figura 38) pode-se observar que o pico 1 também apresentou atividade antioxidante significativa sendo identificado como ácido cafeoilquínico.

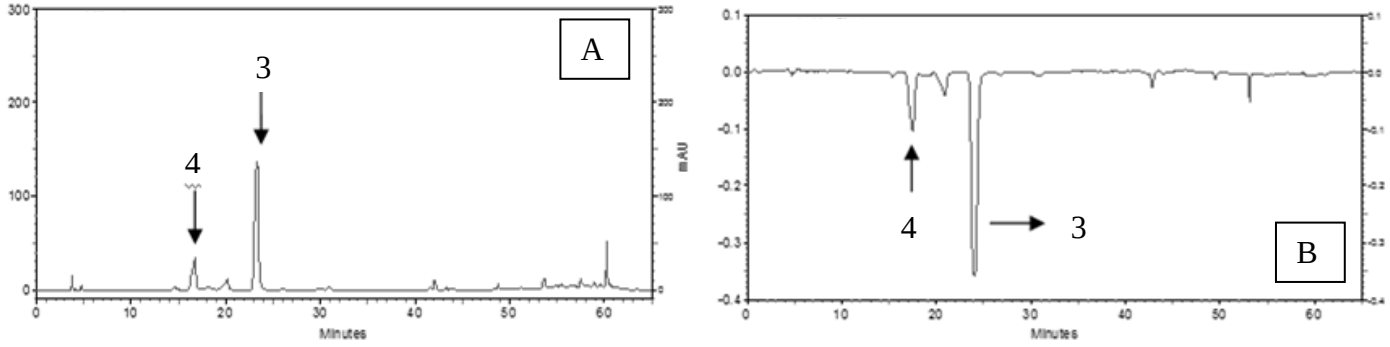


Figura 35 - Cromatogramas da subfração 1 da semente detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B). Pico 4: Catequina e Pico 3: Epicatequina

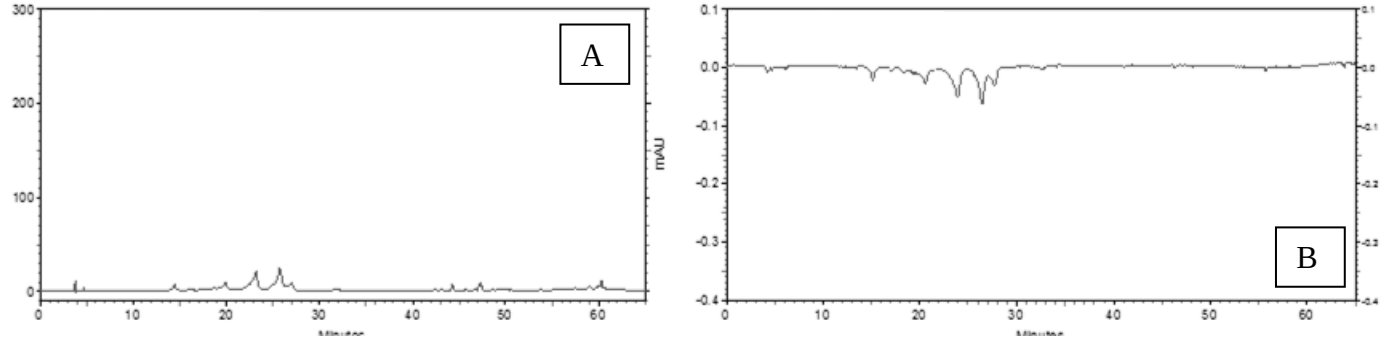


Figura 36 - Cromatogramas da subfração 2 da semente detectado a 280 nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B)

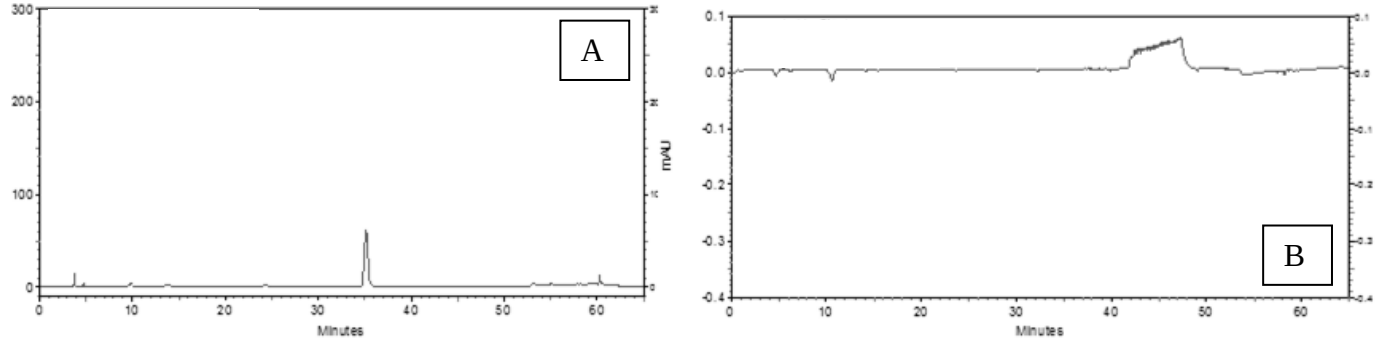


Figura 37 - Cromatogramas da subfração 3 da semente detectado a 280 nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B)

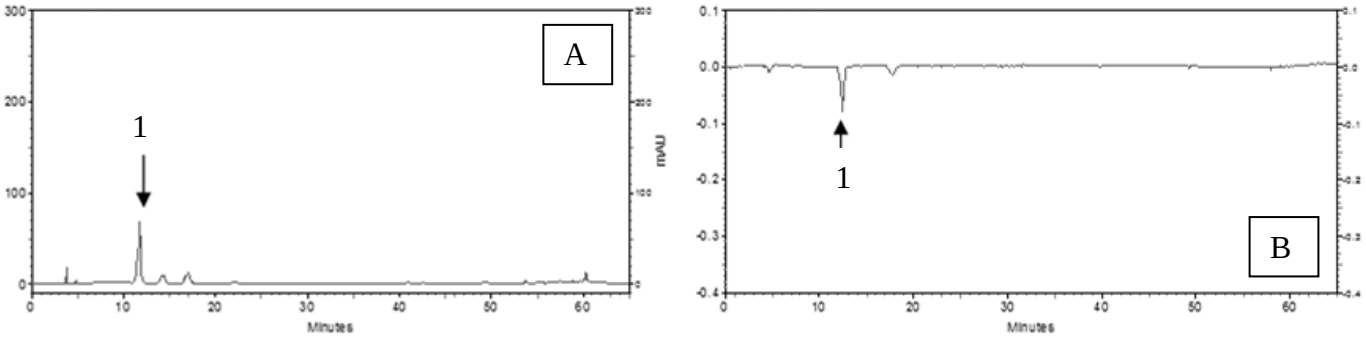


Figura 38- Cromatogramas da subfração 4 da semente detectado a 280 nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B). Pico 1: Ácido cafeoilquínico

As subfrações 1, 2, 3 e 4 também foram avaliadas pela técnica de GC/MS o que possibilitou a identificação de 17 compostos na subfração 1, 3 compostos na subfração 2, 18 compostos na subfração 3 e 5 compostos na subfração 4 (Tabela 23). Os compostos que se apresentaram com maior abundância foi a epicatequina nas frações 1 e 2 (55,54 e 27,85%, respectivamente) e o hexatrimetillsilil-trans-5-o-cafeoil-d-ácido quínico na subfração 4 (74,39%).

Tabela 23- Tempos de retenção, porcentagem de cada componente e íons importantes do espectro de massa dos compostos fenólicos silanizados presentes nas subfrações da semente de abacate, por GC/MS

Composto	TR (min)	Subfração 1 Intensidade relativa (%)	Subfração 2 Intensidade relativa (%)	Subfração 3 Intensidade relativa (%)	Subfração 4 Intensidade relativa (%)	Íons (m/z)
Ácido benzócio trimetilsilil éster	5,79	7,20				179(100) 135(82) 105(80) 77(49) 180(15)
Ácido 2-Pentenedioico	7,09	2,72				147(100) 73(59) 273(31) 109(26) 182(21)
2-Tert-butil-2-fenil-1,3-dioxolano	7,42	1,61				149 (100) 105(2) 77(3) 91(6)
Tetrasiloxanoe, decametil-	7,87	2,96				207(100) 73(49) 147(21) 210(0.6) 133(6)
Ácido Dodecanoico	8,35	0,72				117 (100) 73(79) 257(72) 75(68) 272(3)

continua

				continuação
Trimetilsilil cis,cis-4,7-decen-dienO-1,10-dioato	9,89	0,69		73(100) 147(38) 135(32) 252(29) 417(28)
Ácido palmitico, trimetilsilil Ester	10,50	0,62		117(100) 313(74) 73(66) 75(54) 328(3)
Etil pimara-8(14),15-dieno-18-oato	12,66	0,32		121(100) 73(86) 120(65) 257(28) 374(15)
Ácido octadecenoico (z)-, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propil ester	12,67	1,66		283(100) 73(72) 97(40) 147(27) 397 (2)
Trimetilsilil l abieto-9(11),8(14),12-trieno-18-oato	13,24	2,35		239(100) 240(20) 73(16) 357(13) 372(10)
Trimetilsilil pimara-8(14),15-dieno-18-oato	13,53	1,76		143(100) 73(67)256(43) 121(29) 374(7)
9-Ácido octadecenoico (z)-, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propil Ester	13,61	1,10		201(100) 73(90) 117(75)175(59) 95(53)
Ácido 1,2-Benzenedicarboxilico	14,40	1,19		149(100) 167(39) 57(22) 71(21) 460(2)
3-{[Tert-butil(dimetil)silil]oxi}-17-hidroxipregna-3,5-dien-20-one	14,89	2,13		445(100) 73(76) 446(34) 121(20) 75(18)
Silano, [[(3.beta.)-colest-5-en-3-il]oxi]trimetil	15,42	0,96		73(100) 447(65) 121(41) 81(31) 462(4)
(-)-Epicatequina TMS	17,45	55,54	27,85	368(100) 73(58) 355(43) 369(35) 650(18)
Glicina, n-[(3.alpha.,5.beta.,12.alpha.)-24-oxo-3,12-bis[(trimethylsilyl)oxy]cholan-24-yl]-, methyl Ester	20,16	0,62		143(100) 73(92) 173(41) 175(26) 75(25)
1,2,3,4,6-Penta-o-Tms-.alfa.-d-glicopiranosideo-1-d	16,57		2,92	204(100) 73(86) 193(63) 192(59) 205(20)
Quercetina	39,06		49,44	648(100) 649(63) 73(32) 559(31) 650(30)

continua

				continuação
3,6,9-Trioxo-2,10-disilaundecano, 2,2,10,10-tetrametil	5,70	3,78	9,97	73(100) 117(57) 116(28) 147(15) 103(12)
Hexopiranose, 1,2,3,4,6-pentaquis-o-(trimetilsilil)	10,18	1,76		204(100) 73(82) 191(57) 147(31) 217(22)
D-frutose, 6-o-[2,3,4,6-tetraquis-o-(trimetilsilil)-.alfa.-d-glucopirosil]-1,3,4,5-tetraquis-o-(trimetilsilil)	14,72	3,17		73(100) 204(83) 153(78) 217(60) 362(10)
Maltose 8TMS	14,85	7,14		73(100) 204(99) 131(56) 361(54) 135(25)
Timol-.beta.-d-glucopiranosideo	16,30	3,39		73(100) 361(72) 282(53) 147(10) 217(29)
2,3,4-Tris-o-(trimetilsilil) hexopiranosil 2,3,4,6-tetraquis-o-(trimetilsilil)hexopiranosideo	16,38	2,87		73(100) 217(62) 135(35) 204(32) 103(29)
1,2,3,4,6-Penta-o-TMS-.alfa.-d-glicopiranosideo-1-d	16,56	6,28		204(100) 73(73) 193(64) 192(59) 205(19)
Melibiose 8TMS	17,51	13,86		204(100) 191(94) 73(73) 103(27) 129(26)
D-glicopiranose, 4-o-[2,3,4,6-tetraquis-o-(trimetilsilil)-.beta.-d-galactopiranosil]-1,2,3,6-tetraquis-o-(trimetilsilil)	17,88	19,25		280(100) 204(57) 281(54) 73(52) 282(19)
Treo-2,5-hexodiulose, 1,3,4,6-tetraquis-o-(trimetilsilil)	20,15	9,83		204(100) 73(45)153(37) 205(20) 217(16)
Gulose, 2,3,4,5,6-pentaquis-o-(trimetilsilil)	20,92 21,24	9,7		204(100) 73(31) 137(22) 81(21) 205(19)
Alfa.-l-galactofuranose, 6-deoxi-1,2,3,5-tetraquis-o-(trimetilsilil)-	21,05			73(100) 217(92) 204(82) 363(66) 81(62)
1,2,3,4,6-Penta-o-TMS-.alfa.-d-glucopiranosideo-6,6-d2	21,13	16,20		191(100) 204(80) 73(55) 105(45) 103(23)
				continua

			conclusão
2,3,4,6-Tetraquis-o-(trimetilsilil) hexopiranosil 2,3,4,6-tetraquis-o-(trimetilsilil)hexopiranosideo	21,42	2,77	204(100) 73(70) 363(33) 217(31) 205(22)
Mannose, 6-deoxi-2,3,4,5-tetraquis-o-(trimetillsilil)	17,82	6,74	204(100) 73(52) 205(18) 145(14) 147(12)
Pentatrimetilsilil-trans-3-o-coumaroil-d-ácido quinico	19,50	5,22	219(100) 345(97) 73(94) 255(46) 346(31)
hexatrimetillsilil-trans-5-o-cafeoil-d-ácido quínico	20,83	74,39	307(100) 73(71) 255(44) 324(26) 308(24)
6,7-Dihidroxicumarina di-TMS	22,31	3,68	73(100) 307(45) 624(36) 219(30) 280(29)

Conforme os resultados apresentados na figura 39 pode-se verificar que o fracionamento foi eficaz e de bom rendimento, possibilitando a obtenção de 27,6 e 16,2 mg das subfrações mais ativas, 1e 4, respectivamente.

Rendimento:

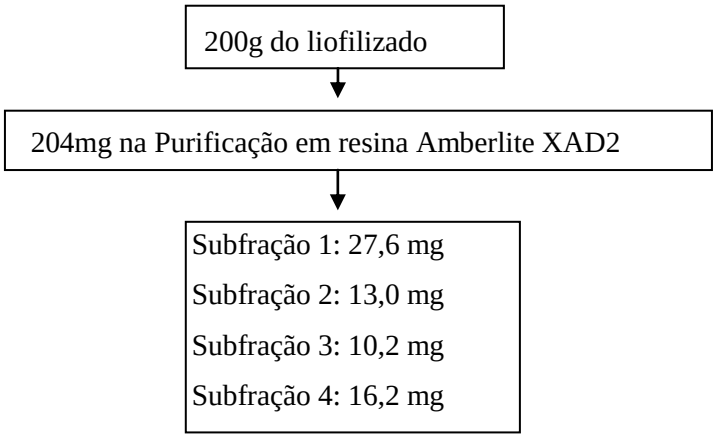


Figura 39- Fluxograma do rendimento durante o processo de purificação.

4.3 Quantificação dos compostos bioativos por HPLC-DAD-FR *on line* na polpa, casca e semente de abacate das cultivares Hass e Fuerte

O método de atividade antioxidante *on line* é um método que visa à separação de compostos e sua atividade antioxidante simultaneamente. Muitas vezes pode ocorrer perda de atividade durante o procedimento de isolamento, sendo, portanto este método essencial para o

monitoramento da atividade antioxidante durante a separação dos compostos (HE et al., 2010).

Os cromatogramas da polpa, casca e semente de abacate das cultivares Hass e Fuerte e sua respectiva atividade antioxidante, analisados por HPLC-DAD-UV, encontram-se nas Figuras 40, 41, 42, 43, 44 e 45.

Por meio das técnicas de determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* (HPLC-DAD-UV) foi possível a identificação e a quantificação, de acordo com o tempo de retenção; espectros do padrão e co-cromatografia, de 5 compostos fenólicos pertencentes a três classes distintas: catequina, epicatequina (flavan-3-ols), procianidinas B_1 e B_2 (proantocianidinas) e ácido cafeoilquínico (ácido fenólico) , em cascas e sementes de abacate das cultivares Hass e Fuerte. Na polpa foram observados muitos picos nos cromatogramas, entretanto nenhum deles foram identificados de acordo com os padrões disponíveis.

Os compostos quantificados na casca das cultivares Hass e Fuerte foram o ácido cafeoilquínico (2,80 e 3,09 μg/mg, respectivamente), procianidina B_2 (48,38 e 28,34 μg/mg respectivamente) e epicatequina (40,31 e 20,40 μg/mg, respectivamente) (Tabela 24). De acordo com a técnica de determinação simultânea de compostos com atividade antioxidante (HPLC-DAD-UV), pode-se verificar que o ácido cafeoilquínico apresentou atividade antioxidante de 40,3 e 53,1 μmol/g, procianidina B_2 de 176,4 e 75,3 μmol/g e a epicatequina de 188,9 e 131,1 μmol/g em equivalente de Trolox nas cascas das cultivares Hass e Fuerte, respectivamente (Tabela 25). Assim, fica demonstrado que estes compostos possuem um papel importante na atividade antioxidante na casca destas cultivares. Os resultados deste estudo corroboram com Wang, Bostic e Gu (2010) e Rodríguez-Carpena et al. (2011) que encontraram procianidinas predominante em cascas de abacate de diferentes cultivares, em concentrações variando de 4,9 a 38,9 mg/g e de 41,8 a 134,8 mg/g. Entretanto, catequina foi o composto em maior concentração encontrado por Kosinska et al. (2012) seguido da procianidina e do ácido 5-*O*-cafeoilquínico, em concentrações de 148,8; de 26,8 a 135,4 e 81,8 μg/g, em casca de abacate da cultivar Hass. Outros estudos também identificaram catequina e epicatequina em cascas de abacate (TERASAWA; SAKAKIBAR; MURATA, 2006).

Rodríguez-Carpena et al. (2011) estudando o perfil dos compostos fenólicos em casca de abacate das cultivares Hass e Fuerte, demonstram que a cultivar Fuerte apresentou maiores

quantidades de compostos quando comparada à cultivar Hass. Segundo os autores, os resultados obtidos mostram a grande variabilidade na composição química entre as cultivares.

Nas amostras de semente das duas cultivares foram encontrados o ácido cafeoilquínico, procianidina B_1, catequina e epicatequina. Para as sementes, tanto da cultivar Hass quanto Fuerte, a epicatequina foi o composto encontrado em maior concentração (10,27 e 11,06 μg/mg) (Tabela 24). Porém, há que se destacar que o ácido cafeoilquínico, catequina e procianidina B_1 são também importantes para a atividade antioxidante nas sementes de ambas as cultivares. Na cultivar Hass, a epicatequina foi o composto que apresentou maior atividade antioxidante (28,07 μmol/g), seguido do ácido cafeoilquínico (22,76 μmol/g), entretanto, na cultivar Fuerte, o ácido cafeoilquínico (84,95 μmol/g) apresentou maior atividade seguido da catequina (40,42 μmol/g) (Tabela 25). Os resultados deste estudo corroboram com Rodriguez-Carpena et al. (2011) que encontraram em sementes de abacate das cultivares Hass e Fuerte, os compostos catequina/epicatequina (237,8 e 96,7 mg/100g, respectivamente para Hass e Fuerte) e procianidinas, incluindo dímeros, oligômeros e polímeros (4.592 e 876,9mg/100g, respectivamente para Hass e Fuerte) e com Kosinska et al. (2012) que encontraram além destes, o ácido 3-*O*-cafeoilquínico nas cultivares Hass e Shepard (57,5 e 53,5μg/g, respectivamente).

Outros estudos também identificaram catequina, epicatequina (GEISSMAN; DITTMAR, 1965; MATSUSAKA; KAWABATA; KASAI, 2003; WANG; BOSTIC; GU, 2010) e procianidinas (WANG; BOSTIC; GU, 2010) em sementes de abacate de diferentes cultivares. Estes compostos têm demonstrado alta capacidade antioxidante e inibição da proliferação celular (FARIA et al., 2006; MITJANS et al., 2004) e são constituintes de cascas e sementes (MEYER et al., 1997). As procianidinas pertencem ao grupo dos flavanois e são um dos principais compostos fenólicos nos alimentos (PRIOR; GU, 2005).

Os resíduos de abacate atualmente não possuem valor comercial, entretanto diversos estudos mostram alta capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos nestes subprodutos quando comparados à polpa (SOONG; BARLOW, 2004; WANG; BOSTIC; GU, 2010, KOSINSKA et al., 2012).

Kosinska et al. (2011), em trabalho visando caracterizar o perfil dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos resíduos de abacate com a finalidade de utilizar como aditivos antioxidantes ou alimento funcional, identificaram, além dos compostos citados anteriormente, o ácido 3-*O*-ρ-cumaroilquínico nas sementes e derivados da quercetina nas cascas, compostos não identificados neste estudo. O mesmo também foi observado por

Rodriguez-Carpena et al. (2011), que além deste identificou em cascas e sementes a presença de ácidos hidroxicinâmicos (*p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico) e de ácidos hidroxibenzóicos (*p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, siringico e gálico).

Pahua-Ramos et al. (2012) analisando extrato metanólico de sementes de abacate, encontraram como principal composto fenólico o ácido protocatecuico, seguido por kaempferide e ácido vanílico. Além disso, o ácido clorogênico, ácido siringico, rutina, canferol estavam presentes em pequenas quantidades.

Trabalhos recentes voltadas ao estudo fitoquímico dos extratos de sementes de abacate têm demonstrado, devido à diversidade de compostos fenólicos encontrados, seus efeitos benéfico à saúde no tratamento de diabetes (EDEM, 2009; EDEM; EKANEM; EBONG, 2009), hipertensão (ANAKA; OZOLUA; OKPO, 2009; IMAFIDON; AMAECHINA, 2010; KATE; LUCKY, 2009) e câncer (LEE et al., 2008), melhora nos níveis de hipercolesterolemia (PAHUA-RAMOS et al., 2012; ASAOLU et al., 2010; NWAOGUIKPE; BRAIDE, 2011), além de possuírem ação anti-inflamatória (ROSENBLAT et al., 2011), inseticida (LEITE et al., 2009; ABE et al., 2005), fungicida (LEITE et al., 2009) e antimicrobiana (NAGARAJ et al., 2010; RAYMOND; CHIA; DYKES, 2010).

Os compostos identificados nas subfrações bioativas da casca e da semente foram confirmados pela técnica de LC-MS/MS (Tabela 26).

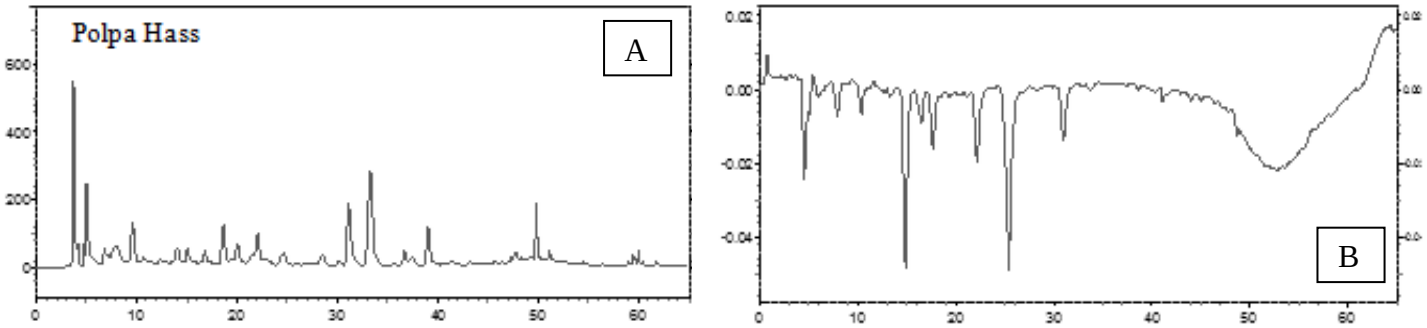


Figura 40- Cromatogramas do extrato da polpa de abacate Hass detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B)

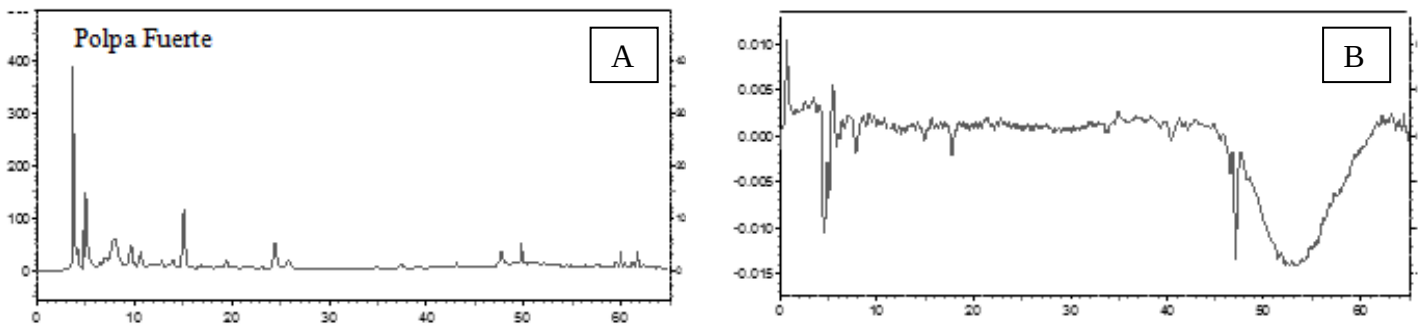


Figura 41- Cromatogramas do extrato da polpa de abacate Fuerte detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade a 734nm antioxidante (pico negativo) (B)

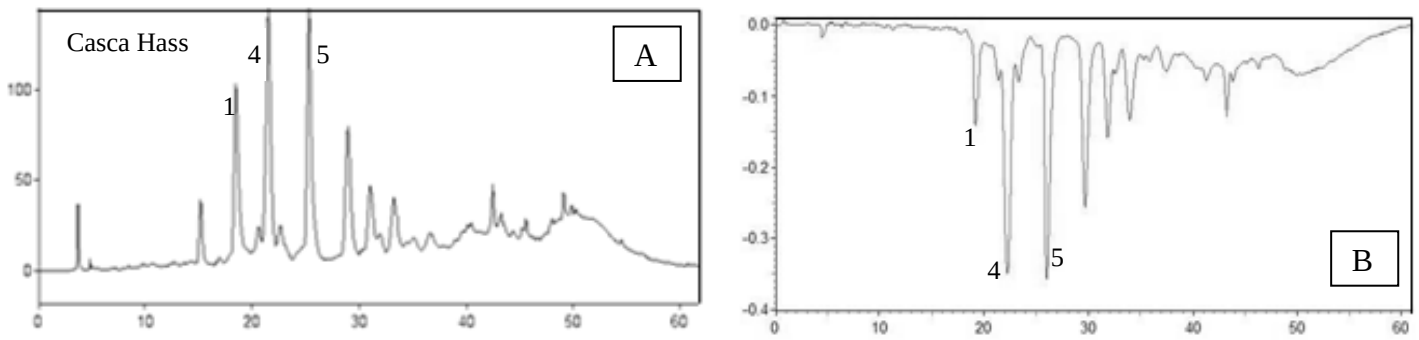


Figura 42- Cromatogramas do extrato da casca de abacate Hass detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B). Pico 1: Ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico; Pico 4: Procianidina B_2 e Pico 5: Epicatequina

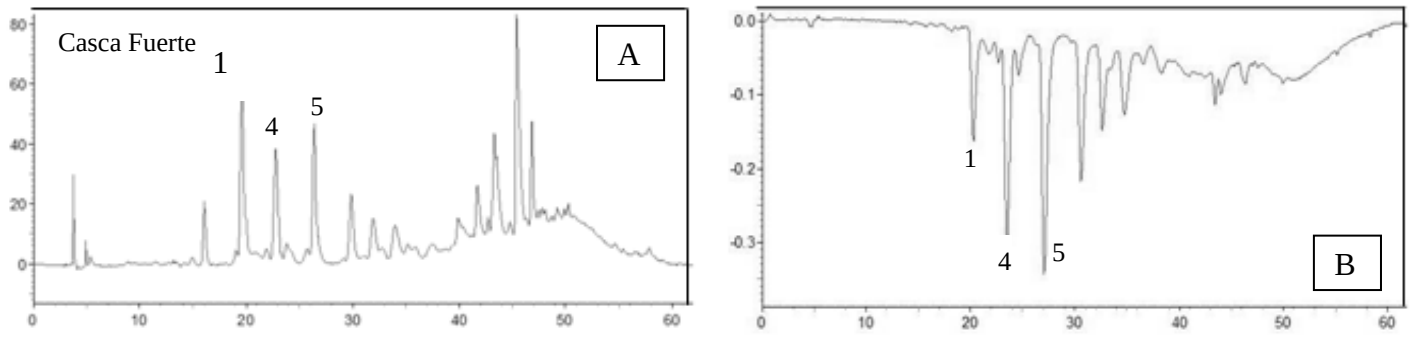


Figura 43- Cromatogramas do extrato da casca de abacate Fuerte detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B). Pico 1: Ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico; Pico 4: Procianidina B_2 e Pico 5: Epicatequina

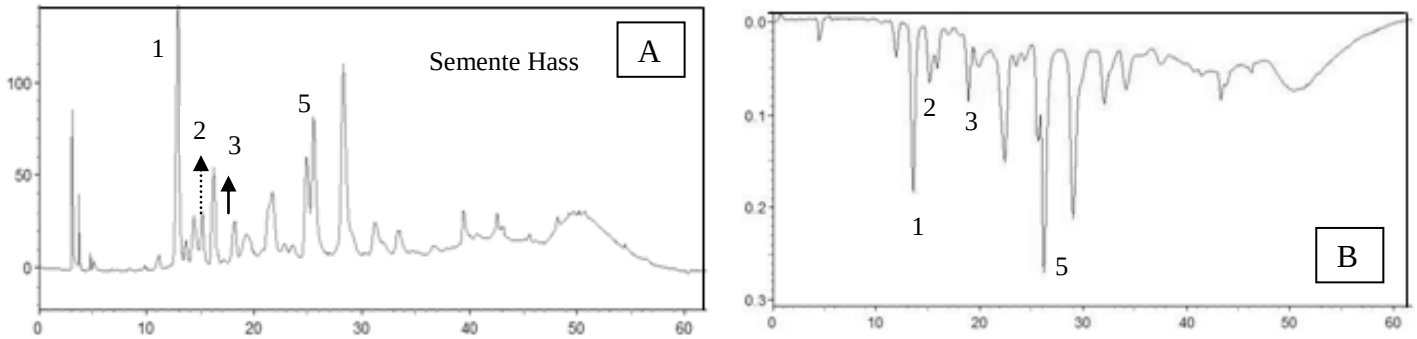


Figura 44- Cromatogramas do extrato de semente Hass detectado a 280nm (A) e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo) (B). Pico 1: Ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico; Pico 2: Procianidina B_1; Pico 3: Catequina e Pico 5: Epicatequina

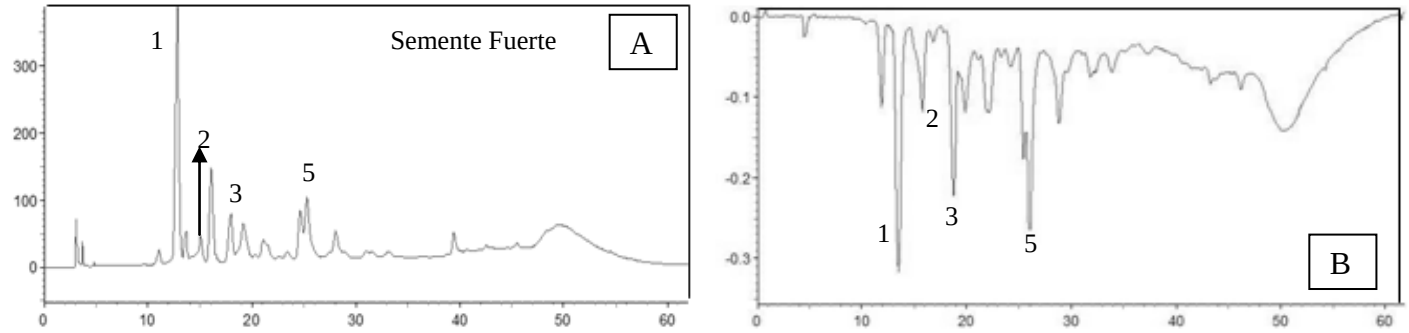


Figura 45- Cromatogramas do extrato da semente de abacate Fuerte detectado a 280nm e sua respectiva atividade antioxidante a 734nm (pico negativo). Pico 1: Ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico; Pico 2: Procianidina B_1; Pico 3: Catequina e Pico 5: Epicatequina

Tabela 24 - Identificação e quantificação dos compostos fenólicos pela técnica HPLC-DAD-UV em casca e semente de abacate das cultivares Hass e Fuerte

Número do pico*	Compostos	TR (min)	Quantificação (μg/mg)			
			Casca Fuerte	Casca Hass	Semente Fuerte	Semente Hass
1	Ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico**	11.69	3,09±0.12	2,80±0.35	5,74±0.25	1,63±0.03
2	Procianidina B_1	15.80	ni	Ni	2,27±0.03	1,52±0.07
3	Catequina	18.70	ni	Ni	8,13±0.38	3,64±0.03
4	Procianidina B_2	23.00	28,34±0.23	48,38±0.04	ni	Ni
5	Epicatequina	26.28	30,40±0.28	40,21±0.24	11,06±0.03	10,27±0.08

*Números referentes aos picos das figuras 39, 40, 41 e 42, ni: não identificado
**Quantificação em equivalentes de ácido cafeico

Tabela 25 - Compostos com atividade antioxidante identificados em casca e semente de abacate das cultivares Hass e Fuerte

Casca Hass		Semente Hass		Casca Fuerte		Semente Fuerte	
*Número do pico	TEAC (μmol/g)	Número do pico	TEAC (μmol/g)	Número do pico	TEAC (μmol/g)	Número do pico	TEAC (μmol/g)
1(ácido caf.)	40,33	1(ácido caf.)	22,76	1(ácido caf.)	53,19	1(ácido caf.)	84,95
4(proc. B_2)	176,48	2(proc. B_1)	5,96	4(proc. B_2)	75,32	2(proc. B_1)	10,69
5(epicateq.)	188,99	3(catequina)	14,09	5(epicateq.)	131,18	3(catequina)	40,42
		5(epicateq.)	28,07			5(epicateq.)	17,88

TEAC: atividade antioxidante equivalente ao Trolox em μmol/g.
*Números referentes aos picos das figuras 39, 40, 41 e 42.

Tabela 26 - Identificação de compostos nas subfrações bioativas da casca e da semente pelas técnicas de LC-MS/MS

Número do Pico	Composto	TR (min)	Ion Molecular $[M-H]^-$	Ions MS/MS
1	Ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico	11.69 18.76	353	191
2	Procianidina B_1	15.80	577	407 425 289
3	Catequina	18.70	289	245 205 179
4	Procianidina B_2	23.00	577	407 425 289
5	Epicatequina	26.28	289	245 205 179

O composto 1 (Tabela 26) foi novamente avaliado haja que a análise por LC-MS/MS não ter sido exclusiva para este composto. A estrutura do composto foi elucidada com base nas análises dos dados espectrais de RMN e por comparação com dados da literatura. Na Tabela 27 e Figura 46 estão descritas as atribuições do composto. De acordo com os dados obtidos por RMN e com a literatura, foi possível identificar o composto como sendo ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico.

Tabela 27 - Dados espectroscópicos do composto 1

No.	**∂_C (ppm)***	**∂_H (ppm) – *J* em Hz**
1	71,0	
2	40,2	1,99-2,24; m
3	73,4	5,30-5,37; m
4	75,3	3,68-3,74; m
5	73,2	4,13-4,18; m
6	40,2	1,99-2,24; m
7	181,3	
8	170,8	
9	117,1	6,26; d (15,8)
10	148,6	7,55; d (15,8)
11	129,0	
12	116,5	7,00; d (2,1)
13	150,0	
14	151,0	
15	117,2	6,76; d (8,2)
16	124,3	6,94; dd (8,2; 2,1)

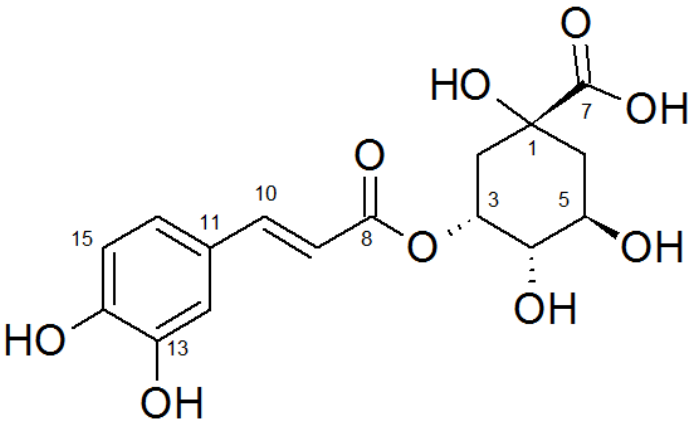


Figura 46 – Estrutura do composto ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico

4.4 Atividade anti-inflamatória

Primeiramente foram examinados os extratos de abacate quanto a citotoxicidade em concentrações de 0,1-100 µg/mL em macrófagos. Os extratos de abacate não foram

citotóxicos até 10 μg/mL, sendo esta concentração utilizada para os ensaios da atividade anti-inflamatória *in vitro.* Uma vez que algumas citocinas e óxido nítrico (NO) podem aliviar a inflamação, foram avaliados o efeito inibitório de amostras de abacate sobre TNF-α (citocina inflamatória) e geração de NO em celular RAW 264.7 após estimulação com LPS. Como mostrado na Figura 47, a casca da semente da cultivar Fuerte (CF) suprimiu estatisticamente a secreção de TNF-α PF e NO.

No geral, as cascas das duas cultivares apresentaram uma maior tendência para a atividade anti-inflamatória quando comparada às sementes. Entretanto para a cultivar Fuerte essa atividade foi estatisticamente significativa, o que pode estar relacionada ao alto teor de compostos fenólicos apresentado pela casca desta cultivar, os quais também são conhecidas com potencial anti-inflamatórias (DABAS et al., 2013). A casca da cultivar Fuerte também apresentou maior atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e sequestro do anion superóxido. Vários trabalhos na literatura sugerem a correlação entre as atividades antioxidante e anti-inflamatória, ou seja, extratos vegetais ativos reduzem inflamações por eliminar superóxidos conhecidos por participarem do recrutamento de células polimorfonucleares presentes em tecidos inflamados (THAMBI et al., 2006).

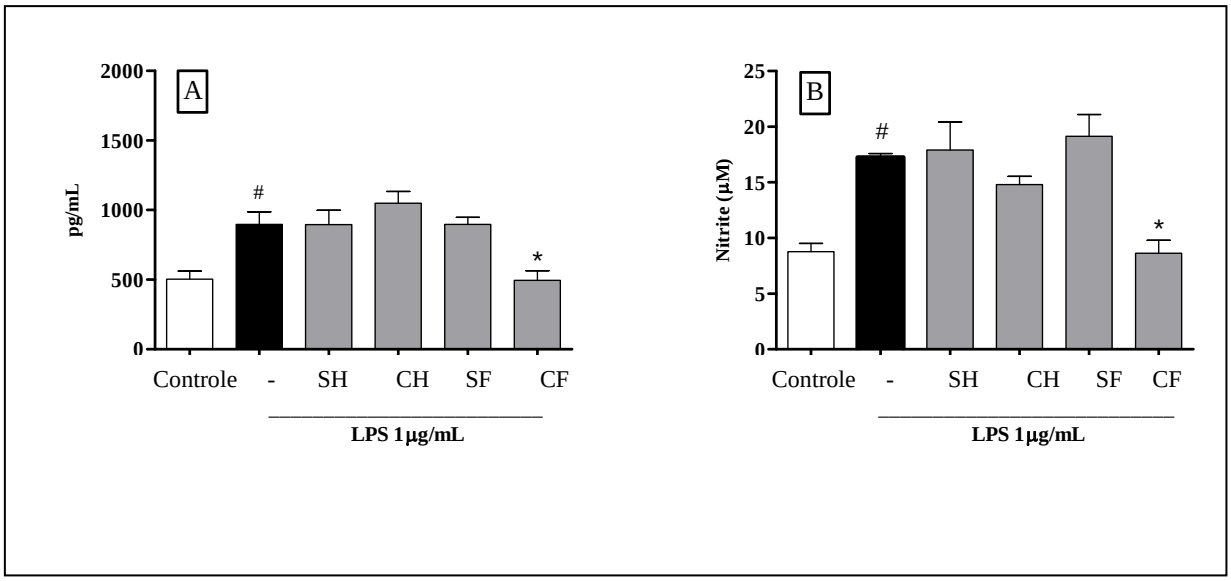


Figura 47- Efeito dos extratos de abacate sobre a produção de TNF-α (A) e de NO (B) por estimulação com LPS. O sobrenadante da cultura foi analisado para TNF-α e produção de nitrito. Como controle, as células foram incubadas somente com o veículo. Os dados representam a média ± SE de valores em duplicata de três determinações de experimentos independentes. * p <0,01 foi calculado a partir de comparações com o LPS-estimulação e os valores das amostras. # p <0,01 foi calculado a partir de comparações com os valores LPS-estimulação e os controles (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). SH: Semente Hass, CH: Casca Hass, SF: Semente Fuerte, CF: Casca Fuerte.

Correlação entre a capacidade antioxidante, radicais sintéticos e espécies reativas

A correlação entre os ensaios de avaliação da capacidade antioxidante que utilizam radicais livres sintéticos (métodos diretos) e os que espécies reativas são geradas durante a reação (métodos indiretos) estão mostrados na Figura 48. Correlação forte e positiva foi verificada entre DPPH x Hipocloroso (0.97), ABTS x FRAP (0.93) e FRAP x Superóxido (0.92). Correlações moderadas foram encontradas para ORAC x Hipocloroso (0.81), ORAC x Superóxido (0.80), ABTS x Superóxido (0.73), DPPH x ORAC (0.70) e baixas para FRAP x ORAC (0.51), Superóxido x Hipocloroso (0.35), ABTS x Hipocloroso (0,29), DPPH x ABTS (0.28), DPPH x Superóxido (0.27), ABTS x ORAC (0.18), DPPH x FRAP (0.06) e FRAP x Hipocloroso (0.01). A correlação entre a capacidade antioxidante de radicais sintéticos e espécies reativas demonstrou ser mais forte entre DPPH x Hipocloroso e ABTS x Superóxido e mais fraca com ABTS x ORAC e FRAP x Hipocloroso.

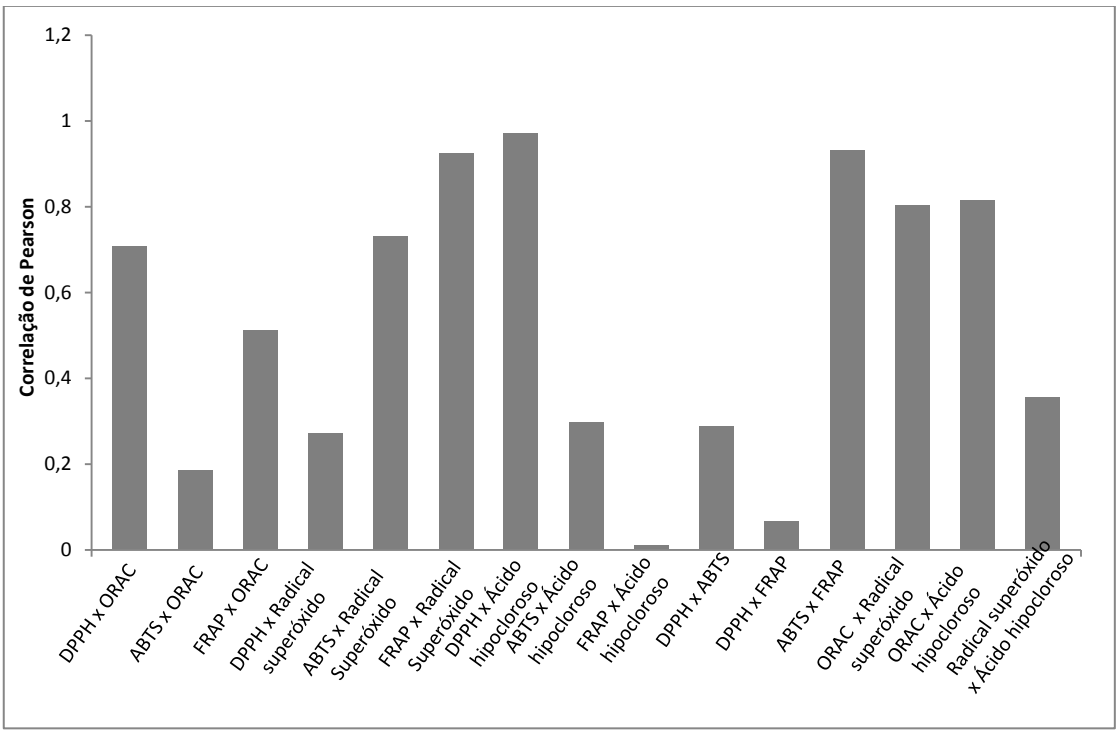


Figura 48 - Correlação de Pearson entre radicais sintéticos e espécies reativas do oxigênio

5 CONCLUSÕES

Os resíduos agroindustriais de abacate possuem compostos fenólicos ativos com capacidade sequestrante de radicais livres e anti-inflamatória, com destaque para as cascas das duas cultivares.

O fracionamento foi essencial para a elucidação dos compostos de expressiva atividade antioxidante presente nos resíduos de abacate.

As técnicas de fracionamento por resina XAD2, seguido por fracionamento cromatográfico em gel de Sephadex LH-20, para o extrato de cascas de abacate, e o fracionamento por resina XAD2 seguido pela técnica de CCD semi-preparativa para o extrato de semente, foram os processos de purificação mais eficientes em termos de rendimento.

Os compostos identificados pela técnica de HPLC-DAD-UV e confirmados por LC-MS/MS e RMN no extrato bruto e na fração purificada da casca de abacate das duas cultivares foram os fenólicos: ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico, procianidina B_2 e epicatequina, enquanto que nas sementes foram os compostos: ácido trans-5-*O*-cafeoil-D-quínico, procianidina B_1, catequina e epicatequina.

De maneira geral, para polpa e resíduos de abacate não há uma correlação direta entre a neutralização dos radicais livres sintéticos e espécies reativas de oxigênio.

De acordo com os resultados obtidos, resíduos do processamento da cadeia de abacate podem ser considerados fontes de compostos bioativos de grande potencial antioxidante e anti-inflamatório, os quais poderiam ser melhor aproveitados por estes segmentos industriais.

REFERÊNCIAS

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKAWA, M.; KINJO, J.; AKAHANE, H.; OGURA, T.; MARTINEZ-ALFARO, M. A.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants-evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 7; p. 1314-1317, 2005.

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira.** São Paulo: FNP Consultoria, 2014. p. 111-115.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 623-628, 2007.

AL-DUAIS, M.; MULLER, L.; BOHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of Cyphostemma digitatum before and after processing: use of different assays**. European Food Research and Technology,** Berlin, v.228, n. 5, 813-821, 2009.

ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALENCAR, S. M.; CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

AL-JUHAIMI, F. Y. Citrus fruits by-products as sources of bioactive compounds with antioxidant potential. **Pakistan Journal of Botany,** Karachi, v. 46, n. 4, p. 1459-1462, 2014.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, n. 3, p. 785-788, 2009.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

AMIN, I.; NORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K. I. E. Antioxidant activity and phenolic contento f raw and blanched *Amaranthus* species. **Food Chemistry.** Barking, v. 94, n.1, p. 47-52, 2006.

ANAKA, O. N.; OZOLUA, R. I.; OKPO, S. O. Effect of the aqueous seed extract of *Persea americana* Mill (Lauraceae) on the blood pressure of sprague-dawley rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Lagos, v. 3, n. 10, p. 485-490, 2009.

ANDREASEN, M. F.; LANDBO, A.-K.; CHRISTENSEN, L. P.; HANSEN, A.; MEYER, A. S. Antioxidant Effects of Phenolic Rye (*Secale cereale* L.) Extracts, Monomeric Hydroxycinnamates, and Ferulic Acid Dehydrodimers on Human Low-Density Lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 49, n. 8, p. 4090−4096, 2001.

ANWAR, F.; BHANGER, M. I.; KAZI, T. G. Relationship between Rancimat and Active Oxygen Method values at varying temperatures for several oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** Champaign, v. 80, n.2, p.151–155, 2003.

ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga**. Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 161-165, 2013.

ASAOLU, M.; ASAOLU, S. S.; OYEYEMI, S. O.; ALUKO, B. T. Hypolipemic effects of methanolic extract of *Persea Americana* seeds in hypercholestrolemic rats. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, Ibadan, v. 1, n. 4, p. 126-128, 2010.

AYALA-ZAVALA, J. F.; VEGA-VEJA, V.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International,** Essex, v. 44, n. 7, p. 1866-1874, 2011.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PALIL, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International,** Essex, v. 44, n. 1, p. 391–396, 2011.

BABOLI, Z. M.; KORDI, A. A. S. Characteristics and composition of watermelon seed oil and solvent extraction parameters effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 87, p. 667–671, 2010.

BALASUNDRAM, N.;SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERGH, B. Nutritious value of avocado. **California Avocado Society Annual Yearbook**, San Juan Capistrano, CA, v. 76, p. 123–135, 1992.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BONATTO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATTO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora UNICAMP, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaften und Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews,** New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

CAETANO, A. C. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; ARAUJO, C. R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.

CAMARGO, G. F.; MANCO, J. **Participação no mercado de abacate no ETSP da CEAGESP em 2002**. Jaboticabal: Net, 2004. Disponível em: www.todafruta.com.br. Acesso em: 10 jan. 2015.

CAMPOS, J. S. **Cultura racional do abacateiro**. São Paulo: Ícone 1988. 150 p.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". **Food and Chemical Toxicology,** Oxford, v. 51, p. 15-25, 2013.

CAZARIN, C. B. B.; SILVA, J. K.; COLOMEU, T. C.; ZOLLNER, R. L.; JUNIOR, M. R. M. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 9, p. 1699-1704, 2014.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova,** São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.; BRAGAGNOLO, N. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry,** Barking, v. 127, n. 2, p. 419-426, 2011.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; HUANG, Y. W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, Essex, v. 44, p. 2047–2053, 2011.

CORRAL-AGUAYO, R.; YAHIA, E. M.; CARRILLO-LOPEZ, A.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 56, n. 22, p. 10498–10504, 2008.

COSTA, A. B.; OLIVEIRA, A. M. C.; SILVA, A. M. O.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes do noni (*Morinda citrifolia* linn). **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 345-354, 2013.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2009. 1200 p.

CRIZEL, G. R.; MOURA, R. S.; MENDONÇA, C. R. B.; RAMIS-RAMOS, G. Caracterização de abacates visando o seu potencial para a extração de óleo conforme a variedade. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 2., 2008, Bento Gonçalves. **Debatendo qualidade; anais...** Bento Gonçalves: SBCTA-RS, 2008.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In: CROZIER, A.; CLIFFORD, M.; ASHIHARA, H. (Ed.). **Plant secondary metabolites**: occurrence, structure and role in the human diet. Oxford, UK: Blackwell, 2006. p. 1-24.

DABAS, D.; SHEGOG, R. M.; ZIEGLER, G. R.; LAMBERT, J.D. Avocado (*Persea americana*) Seed as a Source of Bioactive Phytochemials. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 19, n. 34, p. 6133-6140, 2013.

DAIUTO, E. R.; TREMOCOLDI, M. A.; ALENCAR, S. M.; VIEITES, R. L; MINARELLI, P. H. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'Hass'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 2, p. 417-424, 2014.

DAIUTO, E. R.; TREMOCOLDI, M. A.; VIEITES, R. L. Conservação pós-colheita de abacate 'Hass' irradiado. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, México, DF, v. 10, n. 2, p. 94-100, 2010.

DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em abacate da variedade Hass, submetidos ao tratamento térmico. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha,** México, DF, v. 9, n. 2, p. 106-112, 2008.

DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L.; TREMOCOLDI, M. A.; VILEIGAS, D. F. Estabilidade físico-química de um produto de abacate (*Persea American* Mill.) conservado pelo frio. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, p. 97-105, 2010.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, p. 1321–1342, 2007.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DeMARCHI, E.; BALDASSARI, F.; BONONI, A.; WIECKOWSKI, M. R.; PINTON, P. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, 2013. doi: 10.1155/2013/564961.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKNTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.

DENG, G. F.; SHEN, C.; XU, X. R.; KUANG, R. D.; GUO, Y. J.; ZENG, L. S.; GAO, L. L.; LIN, X.; XIE, J. F.; XIA, E. Q.; LI, S.; WU, S.; CHEN, F.; LING, W. H.; LI, H. B. Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n .7, p. 8308-8323, 2012.

DING, H.; CHIN, Y. W.; KINGHORN, A. D.; D'AMBROSIO, S. M. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. **Seminars in Cancer Biology,** Philadelphia, v. 17, n. 5, p. 386–394, 2007.

DONADIO, L. C. **Abacate para exportação:** aspectos técnicos da produção. Brasília, DF: DENACOOP, 1992. 109 p. (Série Publicações Técnicas Frupex, 2).

DONADIO, L. C. **Abacate para exportação:** aspectos técnicos da produção. 2. ed. Brasília: DENACOOP, 1995. 53 p. (Série Publicações Técnicas Frupex, 2).

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUARTE FILHO, J.; LEONEL, S.; CAPRONI, C. M.; GROSSI, R. S. Principais variedades de abacateiros. In: LEONEL, S.; SAMPAIO, A. C. **Abacate**: aspectos técnicos da produção. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, Cultura Acadêmica Editora, 2008. p. 25-36.

EDEM, D.; EKANEM, I.; EBONG, P. Effect of aqueous extracts of alligator pear seed *(Persea americana* mill) on blood glucose and histopathology of pancreas in alloxan-induced diabetic rats. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. Karachi, v. 22, p. 272-276, 2009.

EDEM, D. O. Hypoglycemic effects of ethnaolic extracts of alligator pear seed (*Persea Americana* Mill) in rats. **European Journal of Scientific Research**, Victoria, Mahé, v. 33, p. 669-678, 2009.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of oat (Avena sativa L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 12, p. 4894-4898, 1999.

FARHOOSH, R. The effect of operational parameters of the rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil**.** **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 84, n. 3, p. 205-209, 2007.

FARHOOSH, R.; NIAZMAND, R.; REZAEI, M.; SARABI, M. Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 110, n. 6, p. 587–592, 2008.

FARIA, A.; CALHAU, C.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 6, p. 2392-2397, 2006.

FRANCISCO, V. L. F. S.; BAPTISTELLA. C. S. L. Cultura do abacate no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 27-41, 2005.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity,** Austin, 2012. doi:10.1155/2012/428010.

GEISSMAN, T. A.; DITTMAR, H. F. K. A proanthocyanidin from avocado seed. **Phytochemistry,** Oxford, v. 4, n. 3, p. 359-368, 1965.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova,** São Paulo, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.

GOLAN, A.; KAHN, V.; SADOVSKI, A. Y. Relationship between polyphenols and browning in avocado mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman cultivar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 25, n. 6, p. 1253-1260, 1977.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A. M. S.; SANTOS, C. M. M.; PINTO, D. C. G. A.; CAVALEIRO, J. A. S.; LIMA, J. L. F. C. 2-Styrylchromones: novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 15, n. 18, p. 6027-6036, 2007.

GOLUKCU, M.; OZDEMIR, F. Changes in phenolic composition of avocado cultivars during harvesting time. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 46, n. 1, p. 112-115, 2010.

GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; DE OLIVEIRA, M. R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. **Oxidative medicine and cellular longevity**, Austin, 2012. doi: 10.1155/2012/756132.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compound. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, n. 3, p. 1030–1039, 2010.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNEMBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, G. A.; SOVIK, K. N.; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P. W.; RIECHEL, T. L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 5, p. 1887−1892, 1998.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular diseases: howshould we move forwad?. **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HAMINIUK, C. W; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992**. Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 481–504, 2000.

HASLAM, E. **Practical polyphenolics**: From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

HE, W.; LIU, X.; XU, H.; GONG, Y.; YUAN, F.; GAO, Y. On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, n. 2, p. 521–528, 2010.

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

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, G. C.; CHOW, J. M.; SHEN, S. C.; YANG, L. Y., LIN, C. W., CHEN, Y. C. Wogonin but not Nor-wogonin inhibits lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression and NO production in macrophages. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 7, n. 8, p. 1054–1063, 2007.

HUANG, L.; WANG, B. G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao Coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 52, n. 16, p. 4993-4997, 2004.

HURTADO-FERNÁNDEZ, E.; CARRASCO-PANCORBO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS method for the determination of phenolic metabolites from avocado (*Persea americana*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 6, p. 2255–2267, 2011.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I.; A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables**. Food Chemistry,** Barking, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

IMAFIDON, K. E.; AMAECHINA, F. C. Effects of aqueous seed extract of *Persea americana* Mill. (Avocado) on blood pressure and lipid profile in hypertensive rats. **Advances in Biological Research**, Rennes, v. 4, n. 2, p. 116-121, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 05 jan. 2015.

JIMÉNEZ, C. I. E.; MARTIZÉZ, E. Y. C.; FONSECA, J. G. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. **Revista de la Facultad de Medicina**, México, DF, v. 52 n. 2, p. 73-75, 2009.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J. P.; KALEVI, P.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 10, p. 3954–3962, 1999.

KATE, I. E.; LUCKY, O. O. Biochemical evaluation of the tradomedicinal uses of the seeds of *Persea Americana* Mill., (Family: Lauraceae). **World Journal of Medical Sciences**, Dubai, v. 4, p. 143–146, 2009.

KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.; OREOPOULOU, V. *In vitro* activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** Boca Raton, v. 48, n. 1, p. 78-93, 2008.

KOLEVA, I. I.; NIEDERLANDER, H. A. G.; van BEEK, T. A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v.73, n. 14, p. 3373-3381, 2001.

KOLLER, O. C. **Abacate**: produção de mudas, instalação e manejo de pomares, colheita e pós-colheita. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2002. 149 p.

KONDO, K.; KURIHARA, M.; FUKUHARA, K.; TANAKA, T.; SUZUKI, T.; MIYATA, N. Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: Evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 485–488, 2000.

KOO, H. M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 49, n. 6, p. 3106-3112, 2001.

KOSINSKA, A.; KARAMAC, M.; ESTRELLA, I.; HERNANDEZ, T.; BARTOLOME, B.; DYKES, G. A. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of Persea americana Mill. peels and seeds of two varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 60, n. 18, p. 4613-4619, 2012.

KRISTOTT, J. Fats and oils. In: KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. (Ed.). **The stability and shelf-life of food**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2000. cap. 12, p. 279-309.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicatíon de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

KYNGMI, M. S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 96-104.

LAMPILA, P.; VAN LIESHOUT, M.; GREMMEN, B.; LAHTEENMAKI, L. Consumer attitudes towards enhanced flavonoid content in fruit. **Food Research International**, Essex, v. 42, n. 1, p. 122–129, 2009.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time**. Journal of Food Engineering,** London, v. 71, n. 2, p. 214–222, 2005.

LEE, S. G.; Y. U, M. H.; LEE, S. P.; LEE, I. S. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, Seoul, v. 37, n. 3, p. 269-275, 2008.

LEITE, J. J. G.; BRITO, É. H. S.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M.; ROCHA, M. F.G. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea Americana* (avocado) seed extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** Uberaba, v. 42, n. 2, p. 110-113, 2009.

LEMOS, A. H. **Controle e prevenção de doenças pela medicina natural e ortomolecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. 331 p.

LEONEL, S.; SAMPAIO, A. C. **Abacate**: aspectos técnicos da produção. São Paulo: UNESP, Cultura Acadêmica, 2008. 239 p.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE, M. A.; GUIMARAES, P. L.; BATISTA, L. R.; NELSON, D. L. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 89, n. 3, p. 523-528, 2012.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radicals theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 60, p. 1-4, 2013.

LU, Q.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; WANG, D.; LEE, R.; GAO, K., California “Hass” avocado: Profiling of carotenoids, tocopherol, fatty acid, and fat content during maturation and from different growing areas**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 21, p. 10408−10413, 2009.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. Boletim do Centro de Biologia Reprodução, UFJF, v. 27, n.1, p. 33-39, 2008.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition,** Bethesda, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANDAL, S.; YADAV, S.; YADAV, S.; NEMA, R. K. Antioxidants: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Rajasthan, India, v. 1, n. 1, p. 102-104, 2009.

MARO, L. A. C.; PIO, R.; PENONI, E. S.; OLIVEIRA, M. C.; PRATES, F. C.; LIMA, L. C. O.; CARDOSO, M. G. Caracterização química e perfil de ácidos graxos em cultivares de nogueira-macadâmia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 12, p. 2166-2171, 2012.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura,** São Paulo, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.

MATSUSAKA, Y.; KAWABATA, J.; KASAI, T. Antioxidative constituents in avocado (Persea Americana Mill.) seeds. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, Tsukuba, v. 50, n. 11, p. 550-552, 2003.

MELO, E. A.; ANDRADE, R. A. M. S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. **Alimentos e Nutrição,** Araraquara, v. 21, n. 3, p. 453-457, 2010.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. A. G. L.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M**.** Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural,** Santa Maria, v.41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MERKEN H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review**. Journal of the Agricultural and Food Chemisty**, Easton, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MEYER, A. S.; YI, O.-S.; PEARSON, D. A.; WATERHOUSE, A. L.; FRANKEL, E. N. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolics antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 5, p. 1638-1643, 1997.

MEYER, M. D.; TERRY, L. A. Fatty acid and sugar composition of avocado, cv. Hass, in response to treatment with an ethylene scavenger or 1-methylcyclopropene to extend storage life. **Food Chemistry**, Barking, v. 121, n. 4, p. 1203–1210, 2010.

MILLER, H. E. Simplified method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.

MITJANS, M.; CAMPO, J.; ABAJO, C.; MARTINEZ, V.; SELGA, A.; LOZANO, C.; TORRES, J. L.; VINARDELL, M. Immunomodulatory activity of a new family of antioxidants obtained from grape polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 24, p. 7297-7299, 2004.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Songkla, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

MOOZ, E. D.; GAIANO, N. M.; SHIMANO, M. Y. H.; AMANCIO, R. D.; SPOTO, M. H. F. Physical and chemical characterization of the pulp of different varieties of avocado targeting oil extraction potential. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, p. 274-280, 2012.

MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; MATÍNEZ-TOMÉ, M. Evaluation of the antioxidant properties of mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 12, p. 2037-2046, 2001.

MUZITANO, M. F.; CRUZ, E. A.; ALMEIDA, A. P.; SILVA, S. A. G.; KAISER, C. R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Quercetrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from Kalanchoe pinnata. **Planta Medica**, Sttutgart, v. 72, p. 81-83, 2006.

MYLONA, P. V.; POLIDOROS, A. N. ROS regulation of antioxidant genes. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Boca Raton: Science Publishers, 2011. cap. 6, p. 101-128.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1054, p. 95–111, 2004.

NAGARAJ, M.; SANDHYA, V.; SUPRIYA, G.; MANJU, R.; KUMARI, P.; BOLE, S.; LATITHA, V.; KIRAN, B. Antioxidant and antibacterial activity of avocado (*Persea gratissima* Gaertner) seed extract. **World Applied Science Journal,** Faisalabad, v. 9, n. 6, p. 695-698, 2010.

NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*psidium guajava* l.)**. Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

NÈVE, J.; PARIJ, N.; MOGUILEVSKY, N. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 417, n. 1-2, p. 37-43, 2001.

NWAOGUIKPE, R. N.; BRAIDE, W. The effect of aqueous seed extract of *Persea americana* (avocado pear) on serum lipid and cholesterol levels in rabbits. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology,** Lagos, v. 1, n. 2, p. 26-29, 2011.

OKONOGI, S.; DUANGRAT, C.; ANUCHPREEDA, S.; TACHAKITTIRUNGROD, S.; CHOWWANAPOONPOHN, S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry,** Barking, v. 103, n. 3, p. 839-846, 2007.

OLIVEIRA, M. C.; PIO, R.; RAMOS, J. D.; LIMA, L. C. O.; PASQUAL, M.; SANTOS, V.A. Fenologia e características físico-químicas de frutos de abacateiros visando à extração de óleo. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 43, n. 3, p. 411-418, 2013.

PAHUA-RAMOS, M. E.; ORTIZ-MORENO, A.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, M. D.; GARDUÑO-SICILIANO, L.; NECOECHEA-MONDRAGÓN, H.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, M. Hypolipidemic effect of avocado (*Persea Americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 67, n. 1, p. 10–16, 2012.

PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products,** Pittsburgh, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PRIOR, R. L.; GU, L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. **Phytochemistry,** Oxford, v. 66, n. 18, p. 2264–2280, 2005.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova,** São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMOS, D. P.; SAMPAIO, A. C. Principais variedades de abacateiros. In: LEONEL, S.; SAMPAIO, A. C. **Abacate**: aspectos técnicos da produção. São Paulo: Universidade Estadual Paulista: Cultura Acadêmica Editora, 2008. p. 37-64.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling,** Oxford, v. 24, n. 5, p. 981–990, 2012**.**

RAYMOND CHIA, T. W.; DYKES, G. A. Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana)* of three cultivars. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 48, n. 7, p. 753-756, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds**. Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 152−159, 1997.

ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E. S. S.; GENOVESE, M. I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International,** Essex, v. 44, n. 4, p. 897–901, 2011.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 28, p. 238-244, 2008.

RODRÍGUEZ-CARPENA, J.; MORCUENDE, D.; ANDRADE, M. J.; KYLLI, P.; ESTÉVEZ, M. Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, in vitro antioxidante and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 59, n. 10, p. 5625-5635, 2011.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROSENBLAT, G.; MERETSKI, S.; SEGAL, J.; TARSHIS, M.; SCHROEDER, A.; ZANIN-ZHOROV, A.; LION, G.; INGBER, A.; HOCHBERG, M. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. **Archives of Dermatological Research**, Berlin, v. 303, n. 4, p. 239-246, 2011.

SALGADO, J. M.; DANIELI, F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; FRIAS, A.; MANSI, D. N. O óleo de abacate (***Persea americana*** Mill) como matéria-prima para a indústria alimentícia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 20-26, 2008.

SAMBOGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S.; OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from Theobroma cacao. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione, **Free Radical Biology and Medicine,** New York, v. 30, n. 11, p. 1191–1212, 2001.

SHAHIDI, F.; HO, C. **Antioxidant measurement and applications**: an overview. Washington, DC: American Chemical Society, 2007. 956 p.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry,** Oxford, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ALVES, T. C.; ZAMBON, C. R. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p. 202-209, 2012.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina**: **Ciências Agrárias,** Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

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

SLATER, G. G.; SHANKMAN, S.; SHEPERD, J. S.; ALFIN-SLATER, R. B. Seasonal variation in the composition of California avocados**. Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 23, n. 3, p. 468–474, 1975.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição,** Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOONG, Y.-Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry,** Barking, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology,** Campinas, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica - Ciências Biológicas e da Saúde,** Londrina, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

THAMBI, P. T.; KUZHIVELIL, B.; SABU, M. C.; JOLLY, C. I. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (I) R. Br. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Bombay, v. 68, n. 3, p. 352-355, 2006.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 17-23, 2004.

TEHRANIFAR, A.; SELAHVARZI, Y.; KHARRAZI, M.; BAKHSH, V. J. High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. **Industrial Crops and Products,** Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 1523-1527, 2011.

TEIXEIRA, C. G. **Abacate**: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos. 2. ed. Campinas: ITAL, 1991. 250 p.

TERASAWA, N.; SAKAKIBAR, M.; MURATA, M. Antioxidative activity of avocado epicarp hot water extract. **Food Science and Technology Research**, Basel, v. 12, n. 1, p. 55-58, 2006.

TOMAS-BARBERAN, F. A., FERRERES, F., GIL, M. I. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing**. Studies in Natural Products Chemistry**, Amsterdam, v. 23, p. 739–795, 2000.

TORRES, A. M.; MAU-LASTOVICKA, T.; REZAAIYAN, R. Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 35, n. 6, p. 921-925, 1987.

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

TURKMEN, N.; SARI, F.;VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chemistry,** Barking, v. 99, n. 4, p. 835–841, 2006.

VALDEZ-MORALES, M.; ESPINOSA-ALONSO, L. G.; ESPINOZA-TORRES, L. C.; DELGADO-VARGAS, F.; MEDINA-GODOY, S. Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 62, n. 23, p. 5281−5289, 2014.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova,** São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VIEIRA, F. G. K.; BORGES, G. S. C.; COPETTI, C.; PIETRO, P.F.; NUNES, E. C.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. **Scientia Horticulturae,** Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 261–266, 2011.

VIEITES, r. l.; DAIUTO, E. R.; FUMES, J. G. F. Capacidade antioxidante e qualidade pós-colheita de abacate ‘Fuerte’. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v. 34, n. 2, p. 336-348, 2012.

VINHA, A. F.; MOREIRA, J.; BARREIRA, S. V. P. Physicochemical parameters, phytochemical composition and antioxidant activity of the algarvian avocado (*Persea Americana* Mill.). **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 5, n. 12, p. 100-109, 2013.

VINHA, A. F.; SOARES, M. O.; HERDEIRO, T.; MACHADO, M. Chemical composition and antioxidant activity in portuguese diospyrus kaki fruit by geographical origins. **Journal of Agricultural Science,** Cambridge, v. 4, n. 2, p. 281-289, 2012.

ZULKIFLI, K, S.; ABDULLAH, N.; ABDULLAH, A.; AZIMAN, N.; KAMARUDIN, W. S. S. W. Phytochemical screening and activities of hydrophilic and lipophilic antioxidant of some fruit peels. **The Malaysian Journal of Analytical Sciences,** Kuaka Lumpur, Malaysia, v. 16, n. 3, p. 309-317, 2012.

WANG, M.; ZHENG, Y.; KHUONG, T.; LOVATT, C. J. Effect of harvest date on the nutritional quality and antioxidant capacity in 'Hass' avocado during storage. **Food Chemistry,** Barking, v. 135, n. 2, p. 694-698, 2012.

WANG, W.; BOSTIC, T. R.; GU, L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 122, n. 4, p. 1193–1198, 2010.

WATERHOUSE, A. L. Wine phenolics. **Annals New York Academy of Sciences,** New York, v. 957, p. 21-36, 2002.

WHILEY, A. W.; SCHAFFER, B. A.; WOLSTENHOLME, B. N. The avocado: botany, production, and uses. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002.

WIJNGAARD, H. H.; RÖßLE, C.; BRUNTON, N. A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry,** Barking, v. 116, n. 1, p. 202–207, 2009.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, n. 7, p. 838-849, 2004.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology,** London, v. 4, p. 278-286, 2008.

YAHIA, E. M. The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In: DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G. (Ed.). **Fruit and vegetable phytochemicals**: chemistry, nutritional and stability. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p. 3−52.

YAN, L.-J.; TRABER, M. G.; KOBUCHI, H.; MATSUGO, S.; TRITSCHLER, H. J.; PACKER, L. Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** New York, **v**. 327, n. 2, p. 330-334, 1996.

YUUKO, M.; JUN, K. Evaluation of antioxidant capacity of non-edible parts of some selected tropical fruits. **Food Science and Technology Research,** Basel, v. 16, n. 5, p. 467-472, 2010.