Joana Catarina Henriques Moreira

AGENTES FITOQUÍMICOS DA *PERSEA AMERICANA* MILL. E SEU POTENCIAL CONTRIBUTO NA DERMOCOSMÉTICA

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Joana Catarina Henriques Moreira

AGENTES FITOQUÍMICOS DA *PERSEA AMERICANA* MILL. E SEU POTENCIAL CONTRIBUTO NA DERMOCOSMÉTICA

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Trabalhos desenvolvidos durante a execução prática desta dissertação:

Moreira, J., Costa, A., Vinha, A.F. 2012. Estudo da composição fitoquímica e atividade farmacológica das frações polares e apolares dos compostos bioativos presentes na *Persea americana* Mill. no contributo alimentar e potencial aplicação em cosméticos. *Revista Egitania Sciencia* (submetido para publicação).

Vinha, A.F., **Moreira, J.**, Abrunhosa, F., Soares, M.O., Oliveira, M.B.P.P. 2012. Health promotion: dependence of chemical composition, phenolic content and antioxidant activity of Portuguese avocado (*Persea americana*). *Book of Abstracts of IPLeiria's Health International Congress*, 1: 61. ISBN: 978-972-8793-46-3

Joana Catarina Henriques Moreira

AGENTES FITOQUÍMICOS DA *PERSEA AMERICANA* MILL. E SEU POTENCIAL CONTRIBUTO NA DERMOCOSMÉTICA

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

A sustentabilidade é um conceito complexo que se pode resumir na noção de desenvolvimento económico e social, sem provocar grandes danos ao ambiente e aos recursos naturais. Há, atualmente, inúmeros casos de aproveitamento e valorização de materiais que no passado eram rejeitados pelas indústrias agroalimentares e que devem servir de exemplo para todos os processos de produção alimentar, potenciando outras indústrias, como a indústria farmacêutica, nomeadamente na área da tecnologia de desenvolvimento de produtos dermocosméticos. Portugal apresenta condições edafo-climatéricas favoráveis para o cultivo da *Persea americana* Mill., concretamente na zona sul de Portugal continental e no arquipélago da Madeira. Este fruto, embora não seja reconhecido como um alimento inserido na dieta mediterrânica, apresenta propriedades benéficas para a saúde. A polpa do fruto abacate é uma fonte rica em energia, fornecendo elevado teor de ácido gordos insaturados, proteínas, vitaminas e minerais. No entanto, tal como noutros frutos, a pele e a semente não são comestíveis, podendo ser reutilizadas noutras indústrias devido à sua riqueza em compostos fitoquímicos.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo e caracterização química dos compostos extratáveis das diferentes partes do fruto abacate, nomeadamente, polpa, pele e semente, variedade "Hass".

Foi realizada a caracterização físico-química do fruto nos seus principais tecidos: polpa, pele e semente, através dos teores de humidade, acidez titulável, sólidos solúveis totais, proteínas totais, cinzas e gordura. Para a quantificação dos fitoquímicos com propriedades bioativas, foram estudados a vitamina C, vitamina E, carotenoides totais, fenólicos totais, flavonóides e compostos antociânicos. A eficácia da atividade antioxidante dos compostos bioativos depende das suas estruturas químicas e concentrações distribuídas amplamente pelo fruto. A partir dos extratos aquosos estudou-se a atividade antioxidante, por espectrofotometria usando o radical DPPH, de forma a atestar as propriedades apontadas a este fruto.

A caracterização físico-química e antioxidante apresentaram um perfil qualitativo idêntico nos diferentes constituintes do fruto analisados, mas foram encontrados teores médios significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Os resultados obtidos indicam, por meio de uma abordagem fitoquímica *in vitro*, a presença de diferentes metabolitos secundários com propriedades bioativas nos diferentes constituintes do fruto (polpa, pele e semente), visando o seu interesse na sua produção não só na vertente alimentar como potenciais recursos à indústria cosmética na elaboração de produtos naturais com atividade farmacológica e terapêutica.

Palavras-Chave: *Persea americana* Mill., Compostos bioativos, Atividade antioxidante, Sub-produtos alimentares, Dermocosmética.

Abstract

Sustainability is a complex concept that can be explained as the economic and social development without causing damages to the environment and the natural resources. Currently there are many cases of use and valorization of materials that were before rejected by the food industries and this should be an example for all food producing processes, enhancing other industries such as pharmaceuticals, particularly in the area of technology for development new cosmetic products. Portugal presents edaphoclimateric conditions favorable to the culture of *Persea americana* Mill., particularly in the south of Portugal and archipelago of Madeira. This fruit, although not recognized as a food included in the traditional Mediterranean diet, presents beneficial properties for health promotion. The fruit pulp is recognized as a rich source of energy, providing a high content of unsaturated fatty acids, proteins and minerals. However, like other fruit, skin and seeds of avocado fruits are not edible and can be reused due to its wealth of phytochemical compounds.

The aim of the present work was the study and chemical characterization of extractable substances presented of the different parts of avocado fruit, in particular, pulp, skin and seeds of Hass variety.

We performed the physicochemical characterization of the avocado fruit in its main tissues: pulp, skin and seed, through the moisture content, acidity, total soluble solids, protein content, ash and fat content. For quantification of some phytochemicals with bioactive properties it were studied the contents of vitamin C, vitamin E, carotenoids total phenolics, flavonoids and anthocyanin compounds. The effectiveness of antioxidant activity of bioactive components depends on their chemical structure and concentration widely distributed in fruit tissues. From aqueous extracts it was studied the antioxidant activity by spectrophotometry, using the DPPH radical, in order to testify the properties described for this fruit.

The physico-chemical characterization and antioxidant profile showed a qualitatively identical in all different constituents analyzed in the fruit, but average levels were found significantly different ($p < 0.05$).

The results indicate, by means of a phytochemical *in vitro* approach, the presence of different secondary metabolites with bioactive properties in the various constituents of avocado fruit (pulp, skin and seed), to their interest in its production not only in the food

industry, also, as a potential resources to the cosmetics industry in the development of natural products with pharmacological and therapeutic activities.

Keywords: *Persea americana* Mill., Bioactive compounds, Antioxidant activity, Food byproducts, Dermocosmetic.

Agradecimentos

Acabada mais uma etapa da minha vida, tenho que agradecer a todos os que me ajudaram ao longo deste meu percurso académico, sem eles estes cinco anos teriam sido muito mais difíceis e é com orgulho que aqui fica um pequeno testemunho da importância que tiveram.

Um trabalho de investigação não traduz o esforço isolado de uma pessoa, antes constitui o resultado de várias contribuições que, no seu conjunto, dão corpo às ideias expressas e que permitem a sua apresentação final.

À minha orientadora Prof. Doutora Ana Cristina Vinha por todo apoio, esforço, dedicação e dinamismo demonstrados ao longo deste trabalho. Sem as suas competências e rigor, este trabalho ter-se-ia tornado um desafio bem mais complicado. Agradeço-lhe também o voto de confiança que em mim depositou ao inserir-me num trabalho de investigação, com o qual só tenho a ganhar neste meu futuro profissional prestes a começar.

À minha mãe Teresa, ao meu pai Carlos e ao meu irmão Tiago por me terem apoiado nos momentos menos bons e pelo orgulho que demonstraram em tudo o que fui realizando. Ficar-vos-ei sempre grata pelo amor, vida e amparo.

Ao João, pela força que me deu, pelo apoio inesgotável, por acreditar sempre em mim e por todo o carinho e afeto.

À Irene pela amizade, pelo carinho e por ter-se mostrado sempre disponível para me acolher, poupando-me algumas horas que despenderia noutras tarefas, aproveitando-as como tempo de estudo e, também, para a realização deste projeto.

Aos meus amigos que estiveram sempre presentes.

Sem vocês teria sido impossível, a todos o meu muito obrigada!

Índice

Resumo……...i

Abstract……...…….……...…...……..iii

Agradecimentos…….....v

Índice de figuras……viii

Índice de tabeles……...……x

Capítulo I. Introdução……...…….…...……1

Capítulo II. Revisão Bibliográfica……4

2.1. O ABACATE (*PERSEA AMERICANA* MILL.)...…….……...….……...…...4

2.1.1. História e origem……...…....5

2.1.2. O abacate em Portugal…….……...……6

2.2. RADICAIS LIVRES…….……..….….....7

2.2.1. Compostos bioativos com propriedades antioxidantes…….……..9

2.3. BENÍFICIOS NA SAÚDE…….……10

2.3.1. Carcinogénese……...11

2.3.2. Doenças cardiovasculares…….……...……...……..12

2.3.3. Osteoartrite……...……....13

2.4. ANTIOXIDANTES NATURAIS…….…….…….……....13

2.4.1. Compostos insaponificáveis……...……..14

2.4.1.1. Esteróis Vegetais……...……14

2.4.1.2. Carotenóides……...……....16

2.4.1.3. Vitamina E……...…...17

2.4.2. Hidratos de Carbono…...…….…18

2.4.3.Compostos Fenólicos……...……19

2.4.3.1. Ácidos Fenólicos……...……..20

2.4.3.2. Flavonóides…….……...……21

2.5. O ABACATE NA FITOCOSMÉTICA E DERMOCOSMÉTICA…….…22

2.5.1. O óleo de abacate…….……..24

2.5.2. Relação entre os compostos bioativos e a dermocosmética…….....25

Capítulo III. Objetivos……..……...29

3.1. OBJETIVO GERAL……..……..29

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS……...……...29

3.2.1. Estudo e caracterização do abacate, variedade "Hass" *in vitro*…….30

Capítulo IV. Materiais e Métodos……...31

4.1. MATERIAL……31

4.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS……..32

4.2.1. Humidade……..32

4.2.2. Acidez titulável……..32

4.2.3. Sólidos solúveis totais……...32

4.2.4. Determinação do teor de cinzas…….33

4.2.5. Determinação do teor em proteínas……...33

4.2.6. Determinação do teor em gordura total…….33

4.3. ANÁLISE DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES….……..34

4.3.1. Ácido ascórbico…….34

4.3.2. Carotenoides totais……35

4.3.3. Fenólicos totais…….35

4.3.4. Flavonoides totais…….36

4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE……..….36

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA……..……...37

Capítulo V. Resultados e discussão…….……...…….38

Capítulo VI. Conclusão……...……47

Capítulo VIII. Referências bibliográficas……...…….49

Capítulo IX. Anexos……59

Índice de Figuras

Figura 1. Morfologia do fruto do abacateiro…….4

Figura 2. Produção de abacate em Portugal……..7

Figura 3. Formação de espécies reativas, por sequenciação química, catalisada pela enzima citocromo oxidase…….8

Figura 4. Estrutura química dos fitosteróis predominantes em frutos…….15

Figura 5. Estruturas químicas dos carotenoides, nas suas formas químicas *trans*……..16

Figura 6. Estrutura química da vitamina E……...……...18

Figura 7. Estrutura dos ácidos hidroxibenzóicos…….....20

Figura 8. Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos…….20

Figura 9. Estrutura geral dos flavonoides……21

Figura 10. Diferentes classes dos flavonóides…….22

Figura 11. Riqueza do abacate em óleo……...24

Figura 12. Estrutura química de alguns dos antioxidantes cutâneos sintetizados *in vivo*……..26

Figura 13. Imagem representativa do fruto abacate e das amostras separadas para análise experimental. (1 – Polpa; 2 – Pele; 3 – Semente)……31

Figura 14. Representação gráfica das médias obtidas para os teores em gordura, proteína, cinzas e humidade encontrados nos diferentes constituintes estudados (polpa, pele e semente) do abacate var. *Hass*……..40

Figura 15. Representação gráfica das médias obtidas para os teores de compostos antioxidantes, concretamente, fenólicos totais, flavonoides e carotenoides em mg/100g encontrados nos diferentes constituintes estudados (polpa, pele e semente) do abacate var. *Hass*……..43

Figura 16. Representação gráfica das médias obtidas para os teores de vitamina C e vitamina E (mg/100g) obtidos nos diferentes constituintes estudados (polpa, pele e semente) do abacate var. Hass……43

Figura 17**.** Atividade antioxidante (% descoloração do radical livre DPPH) dos extratos aquosos da polpa, pele e semente, do abacate português com concentrações de 0.1 e 0.2 mg/mL……..……..45

Índice de Tabelas

Tabela 1. Resultados obtidos nos diferentes constituintes do fruto abacate, variedade Hass. Os parâmetros de humidade, proteínas totais, cinzas e gordura total estão expressos em percentagem. Os sólidos solúveis totais estão representados em º Brix e a acidez em mg/100g (equivalentes em ácido málico)……...38

Tabela 2. Quantificação dos compostos antioxidantes (mg/100g) obtidos nas distintas partes que constituem o fruto: polpa, pele e semente, respetivamente……42

Capítulo I. Introdução

Os ecossistemas humanos, incluindo as comunidades construídas, são subconjuntos de um ecossistema maior que é o planeta Terra. A sustentabilidade é um processo que tenta conciliar as necessidades reais e os desejos do Homem. O conhecimento do Homem acerca da sustentabilidade e do futuro da humanidade depende, em grande parte, da compreensão do passado. A sustentabilidade não foge à regra e, para compreender a fundo este conceito, devem conhecer-se as fontes do problema e a sua evolução, para que se possa trabalhar em possíveis soluções.

Prevê-se que até 2050, as necessidades alimentares mundiais venham a aumentar significativamente, devido não só ao aumento da população (mais de nove biliões) mas também devido à melhor e maior ingestão alimentar. Para além da necessidade de tornar a agricultura mais produtiva, é necessário torná-la mais sustentável. Atualmente, o progresso tem sido retardado pela falta de conhecimento e compreensão de como ultrapassar o problema da sustentabilidade e, consequentemente, verifica-se a estagnação da implementação de políticas e leis que vão de encontro às necessidades futuras (Spiertz, 2010).

Nas últimas décadas, a procura por produtos naturais tem envolvido não só os naturalistas, mas também investigadores e todos aqueles que procuram estudar e divulgar os benefícios desses produtos. Esses, a cada dia, apresentam um maior emprego, sendo utilizados na alimentação, na indústria farmacêutica e alimentar, cosmética, entre outros.

As espécies do género *Persea*, como é o caso do abacate, são utilizadas, tradicionalmente, para diversos fins, desde medicinais a culinários, aplicações na dermocosmética, entre outros (Nayak et al., 2008; Anaka et al., 2009; Kosińska et al., 2012). Na medicina tradicional, os abacates são usados como hipotensores, hipoglicémicos, e antivíricos e são aplicados para o tratamento de úlceras, doenças cardíacas e dermatológicas (Anita et al., 2005; Raharjo et al., 2008). A estes frutos, é também atribuído um efeito analgésico e anti-inflamatório (Adeyemi et al., 2002).

Todos estes fins, utilidades e benefícios devem-se aos vários agentes fitoquímicos presentes no fruto, quer nas partes edíveis como nas não edíveis. Muitos dos trabalhos efetuados até à data, sobre as espécies de *Persea*, visaram o estudo dos óleos essenciais, como o efetuado por Chia e Dykes (2010), onde os autores verificaram atividade antimicrobiana na pele e semente de 3 variedades diferentes de abacate (Hass, Fuerte e Shepard). Estudos sobre extratos hidroetanólicos da pele e da semente do fruto abacate foram também realizados, nas caracterizações da componente fenólica e atividade antioxidante. Estes estudos revelaram uma predominância de compostos bioativos pertencentes ao grupo dos flavonóis, proantocianidinas, e ácidos hidrocinâmicos (Kosińska et al., 2012). Rodrígez-Carpena e colaboradores (2011) demonstraram uma elevada atividade antioxidante em diversos ensaios *in vitro*, atividade atribuída aos compostos fenólicos.

Relativamente à área da dermocosmética, também nesta a procura por produtos naturais tem aumentado e, sendo os frutos de *P. americana* descritos como sendo utilizados na preparação de emulsões para tratamentos de pele seca, agentes contra a radiação ultravioleta, compostos antioxidantes e anti envelhecimento, cicatrizantes, entre outros, sendo compreensível a mais-valia que o abacate pode trazer neste sentido.

Por todos os motivos supracitados, o abacate tem ganho um reconhecimento mundial e, consequentemente, um volume económico significativo a nível internacional (Whiley et al., 2002). As qualidades sensoriais, o seu valor nutritivo, bem como, riqueza em compostos antioxidantes justificam o aumento do seu consumo (Tango et al., 2004).

Atualmente, na Europa, já é possível encontrar pomares de abacateiros distribuídos por Espanha, Itália, Grécia e Portugal. No nosso país, estes frutos são cultivados no sul de Portugal continental (Algarve) e no arquipélago da Madeira, onde as condições edafo-climatéricas são mais favoráveis (Leça, 2009).

Deste modo, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e antioxidante do abacate nacional, variedade Hass, produzido no Algarve e comparar o seu teor em fitoquímicos com a mesma variedade de frutos produzida noutros países, considerando que as condições edafo-climatéricas exercem um papel fundamental no

metabolismo vegetal. Por outro lado, este estudo pioneiro permite divulgar a importância nutricional que o abacate possui, sendo uma mais-valia a sua introdução na dieta mediterrânica. A pele e a semente do fruto foram também estudadas de forma a valorizar a sua rentabilidade no impacto económico do país, pelas suas propriedades biológicas e farmacológicas como potenciais substâncias para a indústria farmacêutica e dermocosmética, para além do óleo da polpa do fruto que é já hoje bastante utilizado.

Capítulo II. Revisão bibliográfica

2.1.O ABACATE *(Persea americana* Mill)

O abacateiro pertence à família Lauraceae, género *Persea*. É uma planta originária da América Central, cultivada em quase todas as regiões tropicais e subtropicais e, devido às suas variedades botânicas, classifica-se como uma planta frutífera das mais produtivas por unidade de área cultivada (Teske e Trentini, 1997). O fruto é formado por pericarpo (casca), mesocarpo (polpa), e endocarpo (semente) e a sua forma assemelha-se a uma pera (Figura 1) (Cowan and Wolstenholme, 2003). O fruto do abacateiro é um alimento bastante energético, calórico e de elevado valor nutricional, quando comparado com outros frutos tropicais. Rico em proteínas e vitaminas A e B, medianamente rico em vitaminas D, E e pobre em vitamina C, este fruto merece uma maior atenção uma vez que na sua matriz podem-se identificar algumas vitaminas lipossolúveis, normalmente ausentes na maioria dos frutos (Knight, 2002).

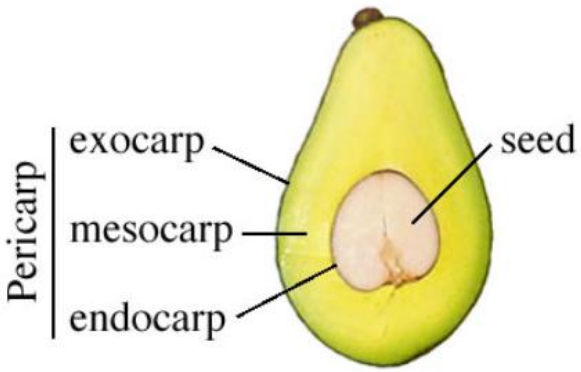


Figura 1. Morfologia do fruto do abacateiro. (Retirado de Storey, 1974)

O fruto, independentemente da variedade, caracteriza-se pela sua riqueza lipídica e a sua quantidade variável de óleo presente na polpa, é utilizada pela indústria farmacêutica e de cosméticos, bem como na obtenção de óleos comerciais substitutos alimentares do óleo de oliva, uma vez que, o óleo é extraído diretamente da polpa dos frutos, bem como, pela similaridade de propriedades físico-químicas, principalmente pela composição em ácidos gordos, predominando em ambos o ácido oleico (Tango et al., 2004).

Além das propriedades supracitadas, o óleo de abacate apresenta outras propriedades importantes para a indústria farmacêutica, tais como, facilidade de absorção cutânea; veículo de substâncias medicinais; poder de absorção de perfumes; e fácil capacidade de formação de emulsões, tornando-o ideal para o fabrico de sabões finos. Essas características sugerem bons prognósticos comerciais para a produção do abacate, não apenas a nível mundial, como a nível nacional.

2.1.1. História e Origem

O abacate (*Persea americana* Mill.), referido como uma das frutas mais nutritivas de sempre (Purseglove, 1968) tem ganho um reconhecimento mundial e, consequentemente, um volume significativo no comércio internacional (Whiley et al., 2002).

Relatos históricos relataram que os navegadores conheceram o abacate nos primórdios do descobrimento da América. Sabe-se que em 1519 e 1529, este fruto era consumido pelos povos nativos da Colômbia e, posteriormente expandiu-se para o México (entre 1532 e 1550). Em relação ao seu nome abacate, em espanhol aguacate/ahuacate, em inglês avocado ou em francês avocat, provém de adaptações da sua palavra originária "ahuacatl" de origem asteca que significa testículo, atribuída esta definição dado à forma do fruto (Osche et al., 1961).

Com espécie nativa da América, o abacate difundiu-se por todo o continente americano, inicialmente no século XVII, citado como avocado na Jamaica. Na europa, o abacate foi citado pela primeira vez em 1601, como planta introduzida no jardim botânico de Valência (Donadio, 1995).

Apesar de nativo da América Central, mais especificamente do sul do México, atualmente, a produção de abacate está localizada desde países da América do Sul e Central (Caraíbas), Estados Unidos, mais especificamente na Califórnia, Austrália, África do Sul e Israel (Feitosa et al., 2007).

Na Europa, os principais pomares de abacateiros encontram-se distribuídos em Espanha, Itália, Grécia e Portugal, sendo que no nosso país, estão localizados essencialmente na Madeira e Algarve, onde as condições edafo-climatéricas são favoráveis (Leça, 2009).

2.1.2. O abacate em Portugal

Como já referido, os principais pomares abacateiros em Portugal localizam-se no Algarve e no arquipélago da Madeira, já que o clima, mais quente e húmido, assim o permite. Como referiu o Engenheiro Agrónomo Leandro Aguiar Câmara no seu relatório de final de curso, "Fruticultura Subtropical da Ilha da Madeira", 1955, citando o Tenente Alberto Sarmento, notável investigador madeirense, a introdução do abacateiro na Madeira deu-se nos meados do século XIX, a partir de um morgado regressado do Brasil que trouxe uma semente da espécie. Nesta altura, a árvore era conhecida pela sombra que proporcionava, em detrimento da sua produção de frutos. Atualmente, os concelhos da ilha que detém a maior produção de abacate são: Santana, Funchal e Calheta (Leça, 2009). Em relação às cultivares mais produzidas a nível mundial, incluindo Portugal, a Hass e a Fuerte dominam o mercado internacional (Rodríguez-Carpena et al., 2011).

Dado ao hábito não enraizado do consumo do fruto na dieta mediterrânica, mais especificamente, na dieta Atlântica, a balança comercial é deficitária, sendo que o escoamento do abacate é feito com alguma dificuldade (Disponível em http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=123).

A partir das Estatísticas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), recolheram-se os dados estatísticos referentes à produção de abacate em Portugal (Figura 2). No início da década de 90, a produção do fruto atinge o máximo de 21300 toneladas, observando-se uma quebra acentuada, com um mínimo de produção registado no ano de 1998 (9903 toneladas). Em 2006, a produção de abacate nacional, sobe até as 15000 toneladas, sendo que, em 2010 atinge as 18000 toneladas.

Respetivamente à cultura de abacateiros no Algarve, a produção do fruto tem vindo a aumentar, constituindo uma das principais alternativas do sector frutícola desta região já

que, para além de ter uma boa relação custo/benefício, apresenta, agora, um escoamento fácil de produções e um mercado nacional e externo em crescimento **(**Vasconcelos, et al., 2010)

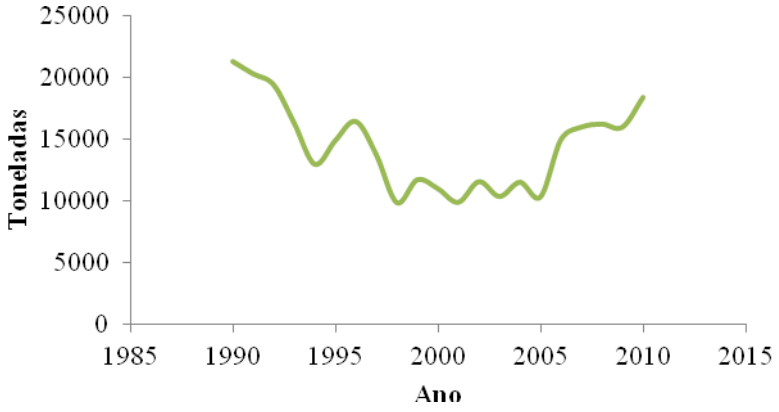


Figura 2. Produção de abacate em Portugal (Segundo os dados recolhidos pela base de dados estatísticos da FAO, 2010).

Em relação às cultivares de abacate produzidas em Portugal, a Pinkerton, Hass, Fuerte, Reed e Bacon, são as variedades que melhor se adaptam às condições de cultivo nacional. Há ainda, uma grande diversidade de cultivares propagadas por semente no decorrer do tempo, consoante o interesse produtivo e comercial. A época de colheita oscila entre Outubro e Julho, de acordo com a cultivar, a altitude, localização e condições climatéricas do local de cultivo (Leça, 2009; Vasconcelos et al., 2010).

2.2 RADICAIS LIVRES

A respiração é um fenómeno intimamente relacionado com a vida aeróbia, no entanto, durante o seu processo ocorre a formação de espécies reativas de oxigénio (EROs) e de radicais livres (Aiyegoro e Okoh, 2010). O termo radical livre é frequentemente utilizado para designar qualquer átomo ou molécula com número ímpar de eletrões, altamente instáveis, que tendem a reagir com uma molécula próxima de carga positiva, assumindo funções de agente oxidante ou redutor. Estas reações ocorrem no citoplasma das mitocôndrias e/ou membranas celulares promovendo danos irreversíveis e que promovem o desenvolvimento de doenças não transmissíveis. As mitocôndrias consomem mais do que 90% do oxigénio disponível no organismo, sendo o principal

local de formação de EROs e de radicais livres. Durante todo o processo metabólico de produção de energia, a enzima citocromo oxidase promove a ligação de quatro eletrões à molécula de oxigénio, reduzindo-o a água, através de quatro reações químicas sequenciais, nas quais são libertadas sucessivas espécies reativas: anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) (Figura 3) (Valko et al., 2006).

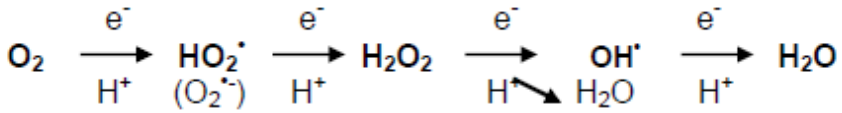


Figura 3. Formação de espécies reativas, por sequenciação química, catalisada pela enzima citocromo oxidase.

Uma outra fonte, do tipo endógeno, para a libertação de radicais livres é a fagocitose que, durante o processo destrutivo de células infetadas por bactérias ou vírus, promovem a libertação de compostos oxidantes (Valko et al., 2006).

O oxigénio é um componente essencial para os seres vivos. A geração de EROs podem causar a oxidação de lípidos e de proteínas, bem como a cadeia de DNA, na modificação nas bases e na modulação de expressão genética (Lee et al., 2004).

Nos últimos anos, têm havido vários estudos científicos devidamente publicados e fundamentados sobre esta matéria no âmbito do reconhecimento e devida compreensão sobre o papel das EROs em inúmeras doenças, entre as quais citam-se: arteriosclerose, cancro, asma, artrite, doenças cardiovasculares, hepatite, dermatites, entre outras.

A condição de stress oxidativo pode ser definida como a acumulação intracelular de níveis tóxicos de espécies reativas de oxigénio por meio de saturação do sistema de defesa antioxidante. Os mecanismos de defesa antioxidante do organismo humano, como as enzimas antioxidantes e os compostos antioxidantes presentes nos frutos estão ligados entre si e causam um equilíbrio nas EROs (Lee et al., 2004).

São muitas as causas exógenas que originam a formação de radicais livres. Nos países designados por industrializados, destacam-se as radiações, os agentes poluentes, pesticidas, fumo. Na verdade, os óxidos de nitrogénio produzidos durante a combustão do cigarro, oxidam as macromoléculas biológicas e diminuem o nível de antioxidantes no organismo o que origina, a longo prazo, o desenvolvimento de certas patologias do foro cardiovascular e cancros (Elsayed, 2001).

Segundo Ortiz et al. (2003), a prevenção da oxidação das biomoléculas pela ação dos radicais livres derivados do oxigénio diminui o desenvolvimento de processos degenerativos, tais como o envelhecimento, as doenças cardiovasculares e o cancro. A relação inversa entre a ingestão de micronutrientes e a incidência de doenças cardiovasculares deve-se ao efeito inibitório da oxidação dos ácidos gordos das lipoproteínas de baixa densidade (LDLs).

Também segundo vários autores, o dano oxidativo nos lípidos existentes nos vasos sanguíneos contribui, significativamente, para o desenvolvimento da aterosclerose; o dano no DNA contribui para o desenvolvimento de cancros e o dano em proteínas está associado a doenças como a artrite reumatoide, formação de cataratas nos olhos e doença de Parkinson, entre outras (Kim et al., 2008).

2.2.1 Compostos bioativos com propriedades antioxidantes

O conteúdo dos compostos bioativos presentes nos frutos pode ser afetado pela variedade, pelas condições edafo-climatéricas (temperatura, luminosidade, irrigação e nutrientes do solo), estado de maturação, colheita e pós-colheita, processamento e armazenamento (Vinha et al., 2012; Cardoso et al., 2009).

Existem evidências de que os frutos conferem proteção ao organismo humano contra doenças crónicas, oculares, neurológicas e certos tipos de cancros, propriedades atribuídas aos seus constituintes antioxidantes. (Dalle-Donne et al., 2006)

Desta forma, os compostos bioativos, de natureza antioxidante, naturalmente presentes nos frutos, têm despertado interesse por parte da comunidade investigadora, devido aos

efeitos positivos sobre a prevenção de doenças e propriedades biológicas importantes à saúde pública.

Segundo Yasir et al. (2010) tanto o fruto como todo o conjunto da família *P. americana*, incluindo folhas e outros materiais vegetais da planta, possuem atividades farmacológicas reconhecidas, tais como atividade vaso-relaxante, anti-inflamatória e analgésica, hipotensiva, anti convulsivante, antiviral, anti ulcerosa, anti hepatotóxica, antioxidante, hipoglicémica, redutora de peso, entre outras.

Na composição do abacate estão descritos variados grupos de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e benéficas ao metabolismo, para além de acrescentarem valor nutricional ao fruto, tais como, constituintes minerais (fósforo, magnésio e potássio), vitaminas hidro e lipossolúveis (vitamina E, B, C e β-caroteno ou pró-vitamina A), compostos fenólicos e flavonóides (USDA, 2011; Honarbakhsh e Schachter, 2009; Knight, 2002).

Os metabolitos secundários estão dispersos por todo o fruto, ou seja, não se concentram apenas na polpa como também já foram quantificados na pele e na semente do fruto (Imafidon e Okunrobo, 2009).

2.3. BENÍFICIOS NA SAÚDE

Ao longo do tempo aumentaram as evidências das vantagens deste fruto na saúde e, por isso mesmo, aumentou também o seu consumo, estimulando, igualmente, a investigação do seu potencial (Lu et al., 2009). Deste modo, em alguns países, tem-se dado destaque a informações sobre o abacate e à sua importância para a saúde. Uma organização independente australiana, “The Heart Foundation”, certificou o fruto como alimento saudável para o coração, de maneira que esta certificação, com o seu apropriado logotipo, é já usada em publicidade. Também a Comissão do Abacate Californiano, tem impulsionado esforços para promover o fruto na área da saúde, incluindo publicações na Associação Dietética Americana, Associação do Coração Americana e, mais recentemente, alguns comunicados de imprensa (Knight, 2002).

2.3.1 Carcinogénese

Acredita-se que as EROs estão relacionadas com a génese de tumores em diferentes níveis, podendo promover o desenvolvimento de cancro através de diferentes mecanismos: alteração na proliferação celular; diminuição da afinidade da enzima polimerase; inativação de enzimas responsáveis pela degradação de carcinogéneos; união de produtos finais da peroxidação lipídica à molécula de DNA, criando lesões mutagénicas; ataque direto ao DNA (Min e Eleber, 2008). Têm sido encontradas bases de DNA modificadas (p.ex. hidroxitimidina e hidroxiguanina) depois da exposição de células a situações de stress oxidativo. A modificação nas bases do DNA pode ter como resultado final, mutações, deleções ou amplificações do material genético como primeiros passos para a carcinogénese (Kim et al., 2008; Min e Eleber, 2008). Os antioxidantes ingeridos na dieta (como as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos) podem impedir a carcinogénese pela sua atividade sequestrante de radicais livres ou pela sua interferência nos locais de união dos carcinogéneos ao DNA. Vários estudos epidemiológicos e clínicos descrevem o efeito benéfico do consumo de frutas ricas em compostos fenólicos na redução do risco de vários tipos de cancro (Tiwari, 2004; Park et al., 2003). Estudos realizados, *in vitro* e *in vivo,* indicam que o abacate deve ser incluído na dieta alimentar pelos seus benefícios preventivos de cancro. Este fruto contém um elevado número de compostos fitoquímicos, entre os quais, carotenoides, terpenóides, D-manoheptulose, fenóis e glutationa, descritos como compostos com propriedades anticancerígenas (Ding et al., 2009). Os carotenoides primários do abacate, as xantofilas, e outros antioxidantes lipossolúveis do abacate, reduzem a oxidação do LDL-colesterol que, quando oxidado, contribui para a iniciação e progressão de danos vasculares (Howaza et al., 2007). Outro estudo mais prospetivo, sugere que um nível elevado de fitoquímicos, está inversamente relacionado com o aumento da espessura da camada-média da carótida, o que pode proteger contra o aparecimento de aterosclerose (Dwyer et al., 2001).

Certos tipos de cancro, tais como, da laringe, faringe e cavidade oral foram os primeiros a ser investigados. Os níveis de glutationa, potente tripeptideo antioxidante, presentes no abacate encontram-se em maiores concentrações, quando comparados com as matrizes de outros frutos (Flagg et al., 1994). Estudos científicos já provaram que um

aumento do consumo de glutationa promove a diminuição do risco de desenvolvimento destes tipos de cancros (Castillo-Juarez et al., 2009). Por outro lado, sabe-se que a luteína plasmática e o total de xantofilas permitem reduzir os níveis de biomarcadores de stress oxidativo em pacientes numa fase inicial deste cancro, aumentando, assim, o potencial da *P. americana* nas mesmas patologias (Hughes et al., 2009). Outras atividades anticancerígenas já foram identificadas, como por exemplo, a atividade antibacteriana (*Helicobater* pylori), com um potencial efeito sobre úlceras gástricas, associadas ao risco de cancro gástrico (Castillo-Juanez et al., 2009). O potencial anticancerígeno também foi descrito pela presença de flavonoides presentes no abacateiro, nomeadamente nas folhas e na semente, onde as flavonas estão em maior concentração. Alguns destes compostos bioativos, como a quercetina, mostrou exercer efeitos viroestáticos pela capacidade inibitória da formação de sincícios por parte do HIV e do antigénio viral p24 (Ding et al., 2007).

2.3.2 Doenças cardiovasculares

É cada vez mais evidente que um dos mecanismos essenciais para o desenvolvimento da aterosclerose é a oxidação das lipoproteínas do plasma, ricas em colesterol. A oxidação dos lípidos aumenta a sua aterogenicidade, facilitando a sua penetração na parede arterial. A oxidação das lipoproteínas deve-se, principalmente, à reação de peroxidação lipídica iniciada pelos radicais livres (Tiwari, 2004).

Os principais riscos para o aparecimento da aterosclerose são: elevados níveis de colesterol total e de colesterol de baixa densidade, de triglicéridos e de apoliproteínas B e C-III, além de níveis baixos de colesterol de alta densidade e de apoliproteínas A-I. Há muito que se sabe que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) intervêm primordialmente nesse fenómeno. Recentemente, também tem-se verificado que a oxidação das lipoproteínas de alta densidade (HDL), as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e os quilomicrons influenciam o desenvolvimento da doença (Tiwari, 2004). Segundo um estudo feito por Mendez e Hernandez (2007) uma dieta rica em abacate, após 4 semanas, resultou numa redução significativa dos triglicerídeos, mantendo níveis baixos de lípidos no sangue e controlo do índice glicémico.

Dado que o abacate é caracterizado pelo seu elevado teor em ácidos gordos insaturados, a ingestão deste fruto traz benefícios na manutenção da saúde do coração e do sistema circulatório, uma vez que a substituição de gorduras saturadas por insaturadas, promove a redução dos níveis de triglicerídeos, colesterol total e LDL-colesterol e podem, inclusive, aumentar a fração do HDL-colesterol. É, pois, recomendável a introdução do fruto na dieta de pessoas com alterações cardiovasculares ou diabetes (Tango et al., 2004). Foi também referido que a presença do D-manoeptulose permite controlar os níveis séricos da glicose, bem como o controlo de peso (Roth et al., 2009). Como já foi referido antes, o abacate sendo um dos frutos comestíveis com maior nível de xantofilas (Lu et al., 2005), torna-se importante encorajar mais estudos para perceber estes efeitos dos carotenoides do abacate no sistema cardiovascular.

2.3.3. Osteoartrite

A osteoartrite é uma doença caracterizada por uma deterioração progressiva da cartilagem e função das articulações, associada ao envelhecimento precoce principalmente em pessoas com excesso de peso ou obesas (IMC > 30). Esta deterioração pode ser desencadeada por um stress oxidativo e inflamatório que, por sua vez, pode provocar um desequilíbrio entre a biossíntese e degradação da matriz extracelular das articulações, conduzindo à perda da função (Dinubile, 2010).

Um estudo reportou que os frutos ricos em luteína e zeaxantina estão associados à diminuição do risco de defeitos a nível da cartilagem (Wang et al., 2007). Também a presença de compostos insaponificáveis, no abacate e na soja, exercem efeitos sinérgicos, promovendo o potencial antioxidante contra processos inflamatórios (Dinubile, 2010).

2.4. ANTIOXIDANTES NATURAIS

Os compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato. Os antioxidantes não são radicais livres pois doam eletrões o que permite dizer que se encontram estáveis

em ambas as formas. Existem duas categorias de antioxidantes, nomeadamente os de origem natural e os designados sintéticos. Além dos benefícios conhecidos, a vida em condições aeróbias criou alguns problemas devido à alta reatividade do oxigénio e seus derivados face a várias moléculas orgânicas. De modo a ultrapassar esta situação, existe, nas células, um eficiente sistema de defesa antioxidante (Cardoso et al., 2009). Vão ser abordados alguns grupos de compostos antioxidantes com maior representação no fruto do abacateiro.

2.4.1. Compostos Insaponificáveis

O óleo do abacate apresenta um teor elevado de insaponificáveis (1 a 4%), quando comparado com outros óleos vegetais. Os compostos insaponificáveis podem ser definidos como substâncias presentes nos óleos, vegetais ou animais, insolúveis em água e não suscetíveis para modificações quando sujeitos a reações de saponificação. O valor comercial do teor insaponificável do óleo de abacate é muito elevado, devido á suas propriedades farmacológicas e cosméticas (Feitosa et al., 2007).

Entre os principais compostos presentes na fração insaponificável dos óleos e gorduras vegetais encontram-se os esteróis, álcoois alifáticos e terpenos, hidrocarbonetos terpénicos, tocoferóis, carotenos entre outros minoritários (Tango e Turatti, 1992). O componente maioritário presente no abacate é o β-sitosterol, com 80%. Outros esteróis presentes citam-se o campesterol, stigmasterol e colesterol (Rocha, 2008).

2.4.1.1. Esteróis vegetais

Os fitoesteróis, também conhecidos como esteróis vegetais, são substâncias presentes em todo o reino vegetal, encontrando-se em maiores concentrações nos alimentos ricos em gordura. A maioria dos fitoesteróis apresenta na sua estrutura química 28 ou 29 carbonos, com uma ou duas ligações duplas típicas do núcleo esterol. Os fitostanóis (estanóis vegetais), subgrupo saturado dos fitoesteróis, diferenciam-se pelo seu elevado grau de saturação. Estudos recentes indicam que a presença de fitoesteróis e de estanóis potenciam a diminuição do colesterol sanguíneo (Moreau et al., 2002).

Os fitosteróis são componentes chave das membranas celulares vegetais. Estão descritos mais de 40 tipos de fitosteróis, mas poucos são encontrados em frutos. Os mais abundantes são o β-sitosterol, o campesterol e o estigmasterol, que apresentam uma estrutura química semelhante à molécula de colesterol, diferindo apenas nas cadeias laterais (Moreau et al., 2002). Esta similaridade na estrutura explica a capacidade que os fitosteróis apresentam em baixar os níveis séricos do colesterol (Figura 4).

Estes componentes triterpénicos podem ser classificados em três classes: 4-desmetilesteróis, 4-metilesteróis e 4,4'-dimetilesteróis (álcoois triterpénicos). Muitos estudos demonstram que o primeiro grupo referido, ao qual pertencem os fitoesteróis predominantes do abacate, tem benefícios protetores para a saúde, entre os quais, baixar o LDL-colesterol ou apresentarem propriedades anticancerígenas, antioxidantes, hépato-protetores, entre outras (Berasategi et al., 2011).

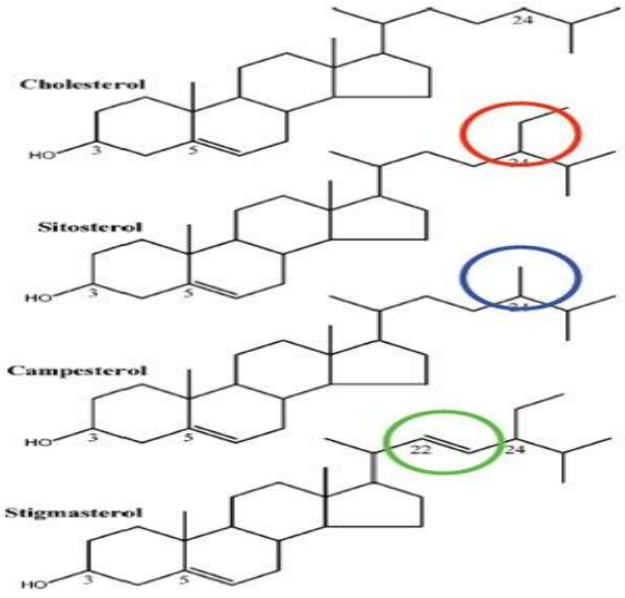


Figura 4. Estrutura química dos fitosteróis predominantes em frutos

2.4.1.2. Carotenóides

Os carotenóides são um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais, devido à sua vasta distribuição, diversidade estrutural e numerosas funcionalidades. Apesar das plantas serem a sua principal fonte, também são encontrados em animais e microrganismos. Os carotenoides são responsáveis pela coloração vermelha, laranja e amarelo das folhas, frutos e flores, assim como das cores de alguns pássaros, insetos, peixes e crustáceos. Estruturalmente, os carotenoides são compostos poliisoprenóides que são sintetizados pela vinculação de duas moléculas de cadeia C_{20} (Figura 5). Todos os carotenoides são sintetizados através de uma variação na estrutura C_{40}. (Tabart et al., 2009).

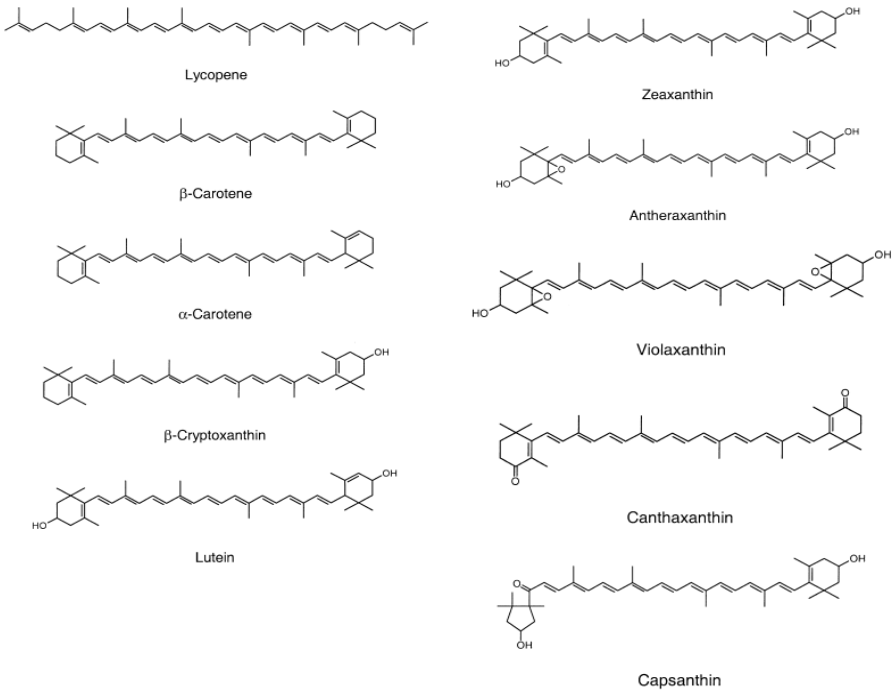


Figura 5. Estruturas químicas dos carotenoides, nas suas formas químicas *trans*.

Nos últimos anos, tem sido dada especial ênfase à obtenção de dados mais precisos sobre os tipos e as concentrações de carotenoides em alimentos para diversas atividades de nutrição e de saúde. A análise de carotenoides é complexa, devido à sua diversidade e à presença de formas isoméricas *cis-trans* deste grupo de compostos. Além disso, uma grande variedade de alimentos de origem vegetal e animal contêm carotenóides. O

sistema conjugado de dupla ligação nos carotenóides produz particular instabilidade, especialmente em condições de luminosidade, calor, oxigénio e ácidos, constituindo os principais problemas na manipulação de carotenóides (Tabart et al., 2009). Os carotenóides são transformados em vitamina A depois de absorvidos pelo organismo. A vitamina A é um componente dos pigmentos visuais responsáveis pela receção de luz na retina dos olhos. É importante para uma pele saudável, no crescimento, desenvolvimento ósseo e para a reprodução. Atualmente, o grande interesse pelos carotenóides de origem vegetal não só se prende com a sua atividade na pro-vitamina A, como também devido à sua ação antioxidante sobre os radicais de oxigénio e à redução do stress oxidativo no organismo (Lam et al., 2007).

Há já muitos estudos que mostram uma forte correlação entre a ingestão de carotenóides e uma diminuição dos riscos de algumas doenças, como cancro, aterogénese, calcificação óssea, degeneração ocular e danos neuronais (Lam et al., 2007). Por exemplo, o β-caroteno, conhecido precursor da vitamina A, é bem conhecido por ter capacidade de evitar graves doenças oftalmológicas, tais como a cegueira noturna (Ashton et al., 2006). O licopeno é um precursor do β-caroteno e um forte antioxidante eficaz para pele, fígado, e outros tipos de cancros. A luteína é descrita como sendo um agente preventivo de diversas doenças oftálmicas (Tabar et al., 2009; Lam et al.,2007).

Os níveis de carotenóides na *P. americana* aumentam significativamente à medida que a época de colheita avança desde Janeiro a Setembro, atingindo níveis compreendidos entre 350-500μg por 30g de polpa e 800-1100μg na sua época ótima de colheita (Lu et al., 2009).

2.4.1.3. Vitamina E

A vitamina E (Figura 6) é um composto lipossolúvel e encontra-se presente na natureza como tocoferóis e tocotrienóis, em quatro formas diferentes (α, β, γ, δ), sendo que o α-tocoferol é a forma antioxidante mais ativa e amplamente distribuída nos tecidos vegetais. A vitamina E pode exercer um elevado efeito antioxidante, agindo diretamente na neutralização dos radicais livres ou participando indiretamente nos sistemas

enzimáticos. De acordo com algumas publicações, a vitamina E exerce ação modeladora na função imunológica e inflamatória (Nazrun et al., 2012).

O fruto abacate é caracterizado pelo seu elevado teor em vitamina E. O tocoferol pode atingir concentrações de 1,97 mg por 100g de fruto, agindo como composto antioxidante (Dreher e Davenport, 2012). No entanto, as suas concentrações máximas são encontradas na pele e na semente do fruto (Bertling et al, 2007).

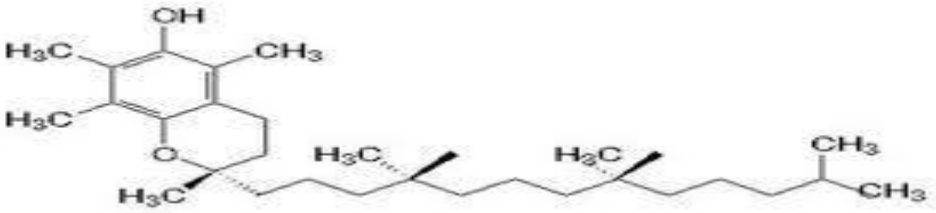


Figura 6. Estrutura química da vitamina E.

2.4.2. Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono presentes no abacate são outro tipo de componentes que potenciam efeitos benéficos. Cerca de 80% do total de açúcares presentes no abacate incluem fibras (70% insolúvel) (Marlett e Cheung, 1997), contribuindo apenas em 101 kcal de energia (Dreher e Davenport, 2012). Quando comparado com outros frutos, o abacate apresenta baixos níveis de hidratos de carbono (USDA, 2011). O açúcar primário encontrado no abacate é o D-manoeptulose, sendo que este, juntamente com a sua forma reduzida, o perseitol, são compostos fitoquímicos do abacate. (Meyer e Terry, 2008). A importância destes açúcares (C7) no abacate ainda está a ser estudada, uma vez que alguns estudos apontam para uma possível relação entre o tecido mesocárpico da polpa do fruto como compostos antioxidantes, pois outros agentes fitoquímicos encontram-se em maior percentagem nos tecidos não edíveis (Bertling et al., 2007). Liu et al. (2002) concluiu que estes hidratos de carbono podem desempenhar um papel importante como inibidores do amadurecimento precoce do fruto e Cowan (2004) sugeriu que os açucares C7 apresentam várias funções importantes, entre as quais, a proteção de determinadas enzimas essenciais para crescimento e desenvolvimento dos

frutos, protegendo-os contra danos causados pelas espécies reativas de oxigénio (EROs). Portanto, os açúcares C7 podem fazer parte de um conjunto de sistemas antioxidantes que não só protegem o fruto contra danos mas também pode levar a benefícios na saúde para o consumidor do fruto e, portanto, podem-se tornar numa importante questão de marketing (Bertling et al., 2007).

2.4.3. Compostos fenólicos

A determinação dos níveis de compostos fenólicos totais em tecidos vegetais é a etapa inicial de qualquer investigação de funcionalidade fisiológica, para posterior estímulo ao consumo, visando a prevenção de doenças crónico-degenerativas. Nos vegetais são numerosas as substâncias de carácter fenólico e, por razões de simplificação do seu estudo, são distribuídas por diferentes classes, conforme o número de átomos de carbono e a sua estrutura. De acordo com Rebelo (2006), os compostos fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: os ácidos fenólicos (ácido cinâmico e derivados) e os flavonóides e seus derivados.

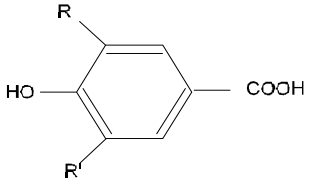
De entre os fenóis, as lenhinas são, provavelmente, o grupo mais representativo mas, atendendo à sua grande distribuição, não apresentam interesse taxonómico. Dada a sua natureza polimérica não são absorvidas a nível intestinal e a sua importância para a saúde humana reside no facto de fazerem parte da fibra alimentar. Para além das lenhinas, os fenóis mais abundantes são os ácidos fenólicos, os taninos e os flavonóides, sendo as cumarinas, as proantocianidinas, as quinonas e as xantonas os grupos com menor representação (Rebelo, 2006).

Na maior parte dos casos, os fenóis estão presentes nas plantas na forma conjugada, principalmente com uma ou mais moléculas de açúcar ligada(s) através de grupos fenólicos (*O*-heterósidos) ou, mais raramente, ao próprio esqueleto carbonado do fenol (*C*-heterósidos); os açúcares mais frequentemente envolvidos são a glucose, a galactose e a ramnose. As substâncias fenólicas podem aparecer livres ou na forma de glicosídios. Poliglucosídios são muito solúveis em água e pouco solúveis em solventes orgânicos apolares. A posição do açúcar na estrutura fenólica influi na solubilidade e em outras propriedades físico-químicas. As agliconas apresentam uma grande variedade de

solubilidade e estabilidade. Estas diferenças podem ser usadas para separá-los, quantificá-los e desenvolver estudos acerca das suas atividades fisiológicas (Vinha, 2005).

2.4.3.1 Ácidos fenólicos

A denominação geral de ácidos fenólicos engloba os ácidos benzóicos com sete átomos de carbono ($C_6 – C_1$) e os ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono ($C_6 – C_3$). Estes compostos estão normalmente hidroxilados, daí se designarem por ácidos hidroxibenzóicos (AHB) (Figura 7) e ácidos hidroxicinâmicos (AHC) (Figura 8), e podem ocorrer na forma livre ou combinada com outras moléculas (Vinha, 2005).



R = R’ = H; Ácido *p*-hidroxibenzóico;
R = OH, R’ = H; Ácido protocatéquico;
R = OCH_3, R’ = H; Ácido vanílico;
R = R’ = OH; Ácido gálhico;
R = R’ = OCH_3; Ácido siríngico

Figura 7. Estrutura dos ácidos hidroxibenzóicos.

R = R’ = H; Ácido *p*-cumárico;
R = OH, R’ = H; Ácido cafeico;
R = OCH_3 ,R’ = H; Ácido ferúlico;
R = R’ = OCH_3; Ácido sinápico.

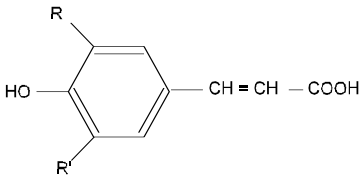


Figura 8. Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos.

Os frutos apresentam, habitualmente, baixos teores de AHB, exceto certos frutos da família Rosaceae. Fatores que podem induzir alterações nos teores de AHB são o estado de maturação do fruto e o tipo de agricultura praticada (Vinha et al., 2012),

Estes compostos bioativos são os principais responsáveis pelas características organoléticas do fruto e pela sua estabilidade oxidativa, exercendo um papel fundamental na atividade antioxidante de proteção do fruto e são, também, componentes das essências, pigmentos, sabores, entre outros. Os efeitos benéficos dos fenóis estão relacionados com a sua atividade antimicrobiana, proteção dos radicais livres de oxigénio e outras espécies reativas (Hurtado-Fernández et al., 2011).

2.4.3.2. Flavonoides

Os flavonoides constituem uma grande família de metabolitos secundários que têm em comum possuírem dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de 3 átomos de carbono, com a estrutura geral C_6-C_3-C_6 que pode, ou não, ser ciclizado formando um terceiro anel (Vinha, 2005). Do ponto de vista biossintético, os flavonoides são formados pela união de duas subunidades, uma proveniente do ácido xiquímico e outra da via do acetato (Figura 9).

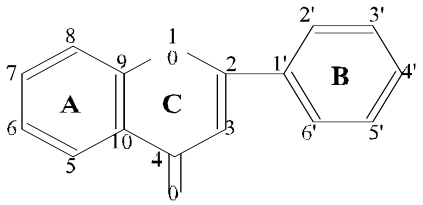
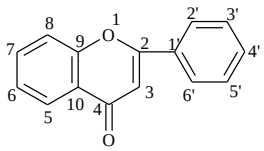


Figura 9. Estrutura geral dos flavonóides.

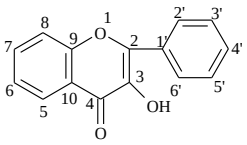
De acordo com o grau de oxidação do heterociclo oxigenado, os flavonoides são agrupados em classes distintas (Figura 10) (Vinha, 2005).

Assim, relativamente aos flavonoides e, mais concretamente, às antocianinas, conjuntamente com outros compostos, como as clorofilas ou os carotenoides, compõem os pigmentos do fruto (Ashton et al., 2006). Os flavonoides predominantes do abacate são as procianidinas, responsáveis por maior parte da atividade antioxidante destes componentes (Rodríguez-Carpena et al., 2011). Para além de suas propriedades biológicas, os flavonóides também são de grande interesse na alimentação, cosméticos,

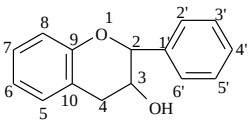
e na indústria farmacêutica, devido ao facto de poderem ser usados como substitutos de antioxidantes sintéticos (Degáspari e Waszczynskyj, 2004)**.**



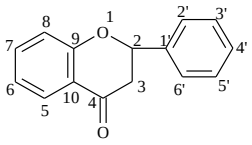
Flavonas



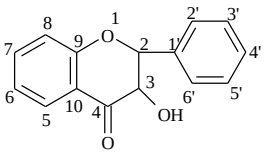
Flavonóis



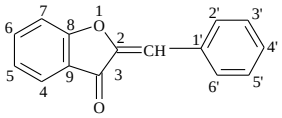
Flavanóis



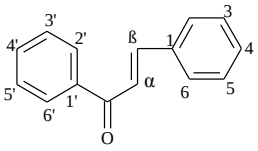
Flavanonas
(Dihidroflavonas)



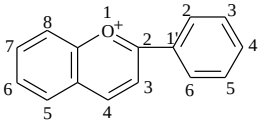
Flavanonóis
(Dihidroflavonóis)



Auronas



Chalconas



Antocianinas

Figura 10. Diferentes classes dos flavonóides.

2.5. O ABACATE NA FITOCOSMÉTICA E DERMOCOSMÉTICA

A cosmetologia, área da indústria farmacêutica, tem como principais funções corrigir, conservar e decorar a pele (Kole et al., 2005). Segundo o Infarmed, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, entende-se por produto cosmético:

Qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as diversas partes superficiais do corpo humano, designadamente epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais

externos, ou com os dentes e as mucosas bucais, com a finalidade de, exclusiva ou principalmente, os limpar, perfumar, modificar o seu aspeto, proteger, manter em bom estado ou de corrigir os odores corporais.

A cosmética é praticada desde os tempos mais primordiais e desde esses tempos que são usados extratos vegetais, sendo ou fazendo parte do produto cosmético final. A pesquisa no mercado mostra uma tendência ascendente para a utilização destes extratos na indústria cosmética, entre as várias razões apontadas como fomento desde fenómeno, tem-se o declínio da credibilidade de produtos sintéticos e a preferência por produtos mais naturais, acreditando que estes são mais inertes (Kole et al., 2005). Portanto, a formulação para obtenção de fitocosméticos significa dar preferência aos derivados vegetais, evitando substâncias sintéticas. No entanto, nem sempre é linear a crença "o que é natural é melhor" e, portanto, é bastante importante fazer um balanço lógico e acertado entre as matérias-primas de origem natural ou sintéticas com o objetivo de otimizar a ação farmacológica e, ao mesmo tempo, alcançar melhores efeitos e menos danos (Pietro et al., 2006).

A diversidade e a complexidade dos extratos vegetais, o seu valor nutricional, que também oferece benefícios ao nível do tecido epitelial, e a composição em agentes fitoquímicos com várias atividades funcionais, nomeadamente, as capacidades antioxidante e antimicrobiana, são razões credíveis para o crescimento do interesse na fitocosmética (Carabela et al., 2010).

Muitas vezes a dermatologia está associada à cosmética, uma vez que a utilização de agentes bioativos na cosmética é frequente. São várias as funções que estes podem assumir, entre elas, atividade anti-inflamatória, anti envelhecimento, cicatrizante, entre outras. Recentemente, surgiu um novo termo, *cosmeceutical*, que identifica esta categoria híbrida de produtos no intervalo entre os medicamentos e os cosméticos. É, pois, utilizado quando um produto cosmético tem um benefício terapêutico farmacológico, mas não é necessariamente um benefício terapêutico biológico num tecido vivo. Entre as várias categorias de *cosmeceuticals* encontram-se os compostos antioxidantes, fatores de crescimento, péptidos, anti-inflamatórios, polissacarídeos, agentes despigmentantes, entre outros (Choi e Berson, 2006).

2.5.1. Óleo de abacate

Os lípidos são amplamente utilizados na indústria dermocosmética, assumindo diferentes papeis, nomeadamente, agentes bioativos, veículos para preparação de várias formulações, suplementos nutricionais e cosméticos, entre outras funções. Os óleos vegetais dão uma grande mais valia a esta indústria. Entre os mais usados, estão o oleo de amendoas doces, óleo de sésamo, óleo de soja, óleo de jojoba, azeite, todos com as mais variadas funções e qualidades (Athar e Nasir, 2005).

Figura 11. Riqueza do abacate em óleo.

Devido há riqueza de óleo na matriz do abacate, o mesmo dá-lhe grande aplicabilidade na indústria farmacêutica, pelo seu poder emoliente e de fácil penetração na pele, sendo mais rapidamente absorvido que outros óleos como o de soja, milho ou amêndoa (Athar e Nasir, 2005). Para além disto, os ácidos gordos aumentam a permeabilidade de substâncias ativas na pele e induzem as propriedades de difusão de preparações lipossolúveis. Assim, o extrato lipofílico do fruto em questão pode ser um veículo de substâncias ativas na formulação de cremes, pomadas e outros produtos para uso dermatológico, sendo muitas vezes recomendado como base para preparação de várias formulações que tratam distúrbios e enfermidades da pele, como a dermatite ou psoríase (Stücker et al., 2001). Outra propriedade realmente interessante é a sua capacidade de absorção de perfumes, grande mais-valia para uso cosmético. Portanto, todas estas propriedades fazem com que seja muito apreciado na cosmética, sendo já utilizado na preparação de cremes hidratantes, batons, protetores solares, esfoliantes e, dado á fácil formação de emulsão, torna-o ideal para produção de sabões finos (Tango et al., 2004).

A sua obtenção pode ser realizada por várias técnicas analíticas. No entanto, a primeira etapa do processo é separar a polpa e desidratá-la. De seguida, procede-se à extração do óleo, recorrendo-se a diferentes técnicas, tais como, extração mecânica, por pressão a frio ou por solvente: extração *Soxhlet* (Lozano et al., 1993; Salgado et al, 2008; Berasategi et al., 2011). Por fim, a última etapa resume-se à refinação do óleo caso este seja para fins alimentícios (Tango et al., 2004).

2.5.2. Relação entre os compostos bioativos e a dermocosmética

O abacate e os seus extratos tornam-se uma mais-valia devido a todas as propriedades supracitadas, mas também muito devido aos seus vários componentes bioativos, entre os quais, os ácidos gordos monoinsaturados, os insaponificáveis que compreendem, fitoesteróis, tocoferóis, esqualeno e lípidos furanos; sendo que estão, ainda, presentes outros agentes bioativos, entre os quais as vitaminas A, C e E, os carotenoides e os agentes fenólicos. Assim, todo este conjunto potencia a utilização deste fruto na dermocosmética como *cosmeticaceuticals* (Nayak et al., 2008).

O autor Goetz (2005) afirmou que o fruto abacate pode exercer uma atividade positiva no combate ao envelhecimento precoce da pele. O autor supracitado, no seu relato sobre a fitoterapia e o envelhecimento cutâneo, refere que os princípios de tratamento externo deste problema médico e cosmético, baseiam-se na redução da desidratação, através de uma reidratação de forma a prevenir o desgaste no tecido conjuntivo. Admite-se, portanto, que o abacate pode ser benéfico em duas vertentes dermocosméticas: o seu óleo como hidratante e emoliente; e pela quantidade considerável de compostos insaponificáveis, no combate aos agentes de senescência, favorecendo a troficidade da pele.

Os fitoesteróis são agentes bioativos importantes para a dermocosmética, por serem componentes concentrados e pelos seus benefícios a nível cutâneo. Tango et al. (2004) afirmou que os fitoesteróis têm, por exemplo, propriedades regenerativas sobre a epiderme. Também juntamente com os álcoois gordos polihidroxilados, outros agentes fitoquímicos presentes na semente e polpa do fruto, têm propriedades foto-protetoras ao protegerem as células dos danos causados pela radiação ulta-violeta (UV),

nomeadamente, radiação UVB, já que inibem a resposta pro-inflamatória causada por esta (Joseph e Koukouras, 2002; Rosenblat et al., 2011).

Até à data, já foram reconhecidos os efeitos adversos da radiação UV, incluindo o eritema, hiperplasias, imunossupressão, envelhecimento prematuro ou, em casos mais graves, cancro da pele. Como a radiação UVB por ser mais curta (290-320nm) é a mais absorvida pela epiderme, esta torna-se bastante perigosa, sendo responsável pelas queimaduras solares e pelo cancro da pele. A exposição prolongada à mesma, desencadeia vários fenómenos como o stress oxidativo ou as cascatas inflamatórias (Krutmann e Gilchrest, 2006). Vários estudos provaram que os antioxidantes endógenos, representados na figura 12, estão em menores teores aquando a exposição solar (Guaratini et al., 2007**)** Assim, Gruel et al. (2002) conclui que a adição de antioxidantes, como o β-caroteno, α-tocoferol, o ácido ascórbico e as procianidinas, inseridos na formulação química de protetores solares podem ajudar na diminuição do risco de queimaduras, eritema, lesões cancerígenas e fotoenvelhecimento.

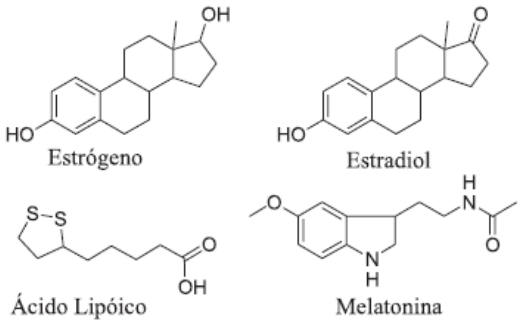


Figura 12. Estrutura química de alguns dos antioxidantes cutâneos sintetizados *in vivo* **(**Retirado de Guaratini et al., 2007)

Por outro lado, tem-se verificado que os protetores solares não conseguem por si só proteger a pele destes danos, portanto, seria uma mais valia usar determinados agentes bioativos que coadjuvassem neste combate contra os danos causados pela exposição solar (Rosenblat et al., 2011).

Num estudo realizado a uma loção rica em fitoesteróis de abacate, verificou-se uma inibição na produção de algumas prostaglandinas e de interleucina-8 (IL-8), um potente

mediador químico que ativa a migração das células ao local da inflamação produzido por vários tipos de células incluindo as células epiteliais evidenciando-se, uma vez mais, as vantagens do óleo de abacate em determinadas condições dermatológicas crónicas de origem inflamatória, como por exemplo, na dermatite atópica ou psoríase (Joseph e Koukouras, 2002). Relativamente aos álcoois gordos poli-hidroxilados (PFA) presentes na *P. americana*, Rosenblat et al. (2011) investigou a sua ação em culturas de queratinócitos e explantes celulares humanos. Esta investigação provou que os PFA têm, igualmente, propriedades de proteção contra a citotoxicidade da radiação UVB através de vários fenómenos: aumentam viabilidade das células; diminuem o número De células queimadas pelo sol nos explantes; induzem a reparação de DNA; e diminuem a secreção de mediadores inflamatórios como é o caso da interleucina-6 e da prostaglandina E_2, o que, por sua vez, permite que estes agentes fitoquímicos atuem contra possíveis reações inflamatórias causadas por outros agentes inflamatórios (Rosenblat et al., 2011).

Outra propriedade identificada no extrato de abacate é a sua capacidade de cicatrização (Dreher e Davenport, 2012). Segundo Nayak et al. (2008) os efeitos do extrato do fruto, quer por tratamento tópico ou oral, nesta atividade cicatrizante em ratos, mostraram que o extrato de abacate aumenta significativamente o ritmo de cicatrização e epitelização das feridas, pelas suas atividades antioxidantes, antimicrobianas. Do ponto de vista do autor, os agentes bioativos podem contribuir para esse efeito, sendo que os ácidos gordos monoinsaturados presentes no extrato aumentam a absorção destes componentes na corrente sanguínea. Por exemplo, os fosfolípidos são cofatores essenciais na cascata de coagulação e na ativação de plaquetas. Estes podem facilitar a fase inicial da reparação cutânea ao iniciar o processo de homeostasia e no desenvolvimento de uma matriz provisória para a migração das células no local lesado. Também os álcoois gordos auxiliam neste processo, uma vez que estimulam a reparação e o crescimento de granulações, um tipo de tecido das fases de cicatrização. Os carotenóides e os ácidos gordos monoinsaturados são apontados como principais responsáveis pelo aumento da velocidade de epitelização no local da ferida.

Os péptidos presentes no abacate também apresentam alguma importância na área da dermatologia ou dermocosmética, patenteados pelas suas propriedades antipruriginosas.

O prurido é conhecido como uma sensação desagradável que provoca a vontade de coçar. A origem deste fenómeno está nos mastócitos dérmicos, sendo que mediadores destas células, como a histamina ou a triptase, estimulam os terminais dos neurónios C induzindo, assim, a sensação de prurido. Para além disto, apesar desta associação ainda não estar completamente esclarecida, sabe-se que o prurido está relacionado com a pele seca. Assim, os péptidos do abacate são capazes de atenuarem essa sensação por vários processos: devido à sua capacidade de inibirem a libertação de histamina e triptase, pelos mastócitos, em cerca de 53% e 30% respetivamente; diminuem a expressão genética a nível da epiderme do recetor envolvido na libertação destes mediadores do prurido; afetam positivamente as ceramidas na epiderme e a síntese de ácidos gordos, importantes para o equilíbrio epidérmico; e, por fim, aumentam significativamente a produção de ácido hialurónico e de glicosaminoglicanos pelos queranócitos, essenciais para a formação das várias camadas da pele e para formação do filme hidrolipídico (Bredif et al., 2010).

Por fim, mas igualmente importante, salientam-se as propriedades indutoras das defesas cutâneas dos açucares presentes no abacate. Os açúcares predominantes no fruto abacate são o D-mano-heptulose e o perseitol. Estes compostos influenciam diferentes funções protetoras da pele, incluindo a barreira antimicrobiana, a organização estrutural da epiderme e a resposta inflamatória. Os efeitos dos açúcares C-7 permitem o aumento da proliferação e diferenciação dos queratinócitos, induzem a produção de colagénio VII e desmogleínas (proteínas responsáveis pela adesão intercelular), diminuem alguns mediadores inflamatórios e permitem o aumento de proteínas responsáveis pela proteção antimicrobiana, como a β-Defensina-2 (Bredif et al., 2007; Boto et al., 2010).

Capítulo III. Objetivos

O abacate constitui uma fonte natural rica em compostos bioativos com propriedades farmacológicas. A presença elevada de compostos antioxidantes na sua matriz, reforça o aumento das investigações, proporcionando uma via alternativa para a sua aplicação, não só na indústria alimentar, mas na vertente das ciências farmacêuticas. A insistente procura de antioxidantes naturais em detrimento dos vulgares antioxidantes sintéticos assume, na atualidade, um papel fundamental para a promoção da saúde pública.

3.1. OBJETIVO GERAL

Deste modo, o principal objetivo do presente trabalho foi estudar uma cultivar de abacate Hass, produzida em Portugal, através da sua caracterização físico-química, quantificação dos compostos bioativos distribuídos nos diferentes constituintes do fruto (polpa, pele e semente) e avaliação do seu potencial antioxidante.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar, nutricionalmente, o conteúdo de fitoquímicos do fruto abacate (*Persea americana* Mill.), no seu estado *in natura*, produzido sob as mesmas condições agrícolas e edafo-climatéricas, adotadas por um produtor agrícola nacional.

Avaliar e quantificar os teores dos compostos bioativos presentes na polpa, pele e semente do fruto e estudar a sua atividade antioxidante e seus possíveis efeitos benéficos para a incrementação do seu uso alimentar como numa vertente de reaproveitamento dos subprodutos do fruto na indústria farmacêutica, concretamente, na área da dermocosmética.

3.2.1. Estudo e caracterização do abacate, variedade Hass, *in vitro*

Avaliação centesimal do fruto, pela determinação dos teores de humidade, sólidos solúveis totais, acidez titulável, proteína total, cinzas e gordura, nos diferentes constituintes do fruto: polpa, pele e semente.

Avaliação dos teores de fitoquímicos reconhecidos pelas suas propriedades bioativas, nomeadamente, fenólicos totais, carotenoides totais, flavonoides totais, compostos antociânicos, ácido ascórbico e vitamina E.

Avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos da polpa, pele e semente do abacate, pelo método analítico do radical livre DPPH.

Comparação dos resultados experimentais obtidos com outros estudos previamente realizados, de forma, a avaliar a influência das condições edafo-climatéricas de Portugal continental, na composição dos agentes fitoquímicos da *Persea americana* Mill. e seu potencial contributo para a dermocosmética.

Capítulo IV. Materiais e métodos

4.1. MATERIAL

Durante a seleção da amostra do fruto em estudo, teve-se o cuidado de manter controlados diversos fatores, tais como, cultivar em estudo, região de produção, época de plantio, e grau de maturação característico da cultivar, exposição à humidade, calor e luminosidade. Foram analisados frutos de abacate (*Persea americana*) cultivar Hass, colhidos antes do seu índice de maturação máximo e produzidas por sistema agrícola convencional, destinados ao consumo de mesa, isto é, *in natura*. Os frutos foram adquiridos numa grande superfície, escolhidos aleatoriamente e provenientes de um agricultor do Algarve, cidade de Faro.

As amostras foram preparadas vinte e quatro horas após a sua aquisição, no laboratório de Bromatologia. Todos os frutos foram lavados com água corrente e água destilada, posteriormente, secos com toalhas de papel. Em seguida, foram separados 3 lotes distintos de amostras: amostra 1- polpa de abacate; amostra 2 – pele do fruto e amostra 3 – sementes (Figura 13).

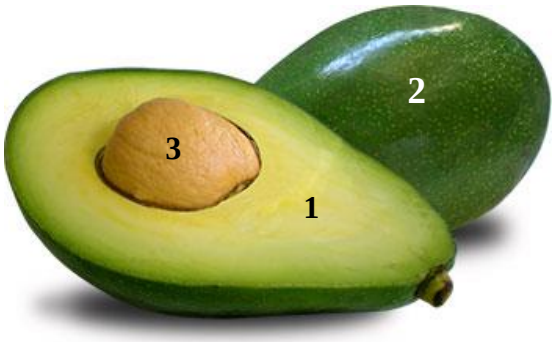


Figura 13. Imagem representativa do fruto abacate e das amostras separadas para análise experimental. (1 – Polpa; 2 – Pele; 3 – Semente)

4.2. ANÁLISES FISÍCO-QUÍMICAS

Os parâmetros de qualidade do abacate foram avaliados a partir das análises físico-químicas realizadas experimentalmente.

4.2.1. Humidade

A determinação da humidade é uma das determinações mais importantes e utilizadas em alimentos, nomeadamente em frutos. A humidade de um alimento está diretamente relacionada com a sua estabilidade, qualidade e composição química, podendo interferir negativamente nas características do fruto.
A determinação da humidade foi feita por gravimetria, através de secagem em estufa (WTC binder TUTTLINGEN, Germany) a 105ºC±1ºC, até peso constante, para os três tipos de amostra estudados, polpa, pele e semente. As determinações foram realizadas em triplicado para cada constituinte do fruto abacate.

4.2.2. Acidez titulável

A acidez titulável foi obtida pelo método de titulação direta com base titulante forte (NaOH = 0.1 M), conforme metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1998). Assim, 10g de cada amostra, trituradas e dissolvidas em 90 mL de água destilada, foram agitadas durante 30 minutos e tituladas com hidróxido de sódio (NaOH, 1 M) padronizado, até atingir uma coloração rosa, tendo como indicador a fenolftaleína 1%. Os resultados foram expressos em gramas de ácido málico/100g de amostra.

4.2.3. Sólidos solúveis totais

Após filtrar cada amostra com papel de filtro, o teor de sólidos solúveis foi obtido por leitura direta num refratómetro digital tipo ABBE com escala de variação compreendida entre 0 e 65 °Brix, de acordo com metodologia descrita pela AOAC (1998). Foram registadas seis leituras e o resultado expresso em valor médio em °Brix.

4.2.4. Determinação do teor de cinzas

Na determinação do teor de cinzas seguiu-se o método oficial da AOAC (1998), de incineração por via seca. Pesaram-se, de forma rigorosa, cerca de 5 g de amostra para uma cápsula previamente tarada. Colocou-se a cápsula numa mufla (Thermolyne, 48000 Furnace) com aumento gradual da temperatura até os 550ºC. As cápsulas foram pesadas posteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicado para cada amostra.

4.2.5. Determinação do teor em proteínas

A determinação do teor em azoto proteico total foi efetuada segundo o método oficial da AOAC 928.08 (1998), método de Kjeldahl. Pesaram-se, rigorosamente, cerca de 1,5 g de amostra em papel vegetal (material isento de azoto). A amostra, embrulhada no papel vegetal, foi introduzida num tubo de Kjeldahl, procedendo-se à digestão por hidrólise da mesma com 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (96%), com 2 pastilhas de catalisador ("Kjeldahl tablets": Na2S2O8/CuSO4) e por aquecimento numa manta elétrica própria, convertendo-se, deste modo, o azoto orgânico em sulfato de amónio. Já com o tubo de Kjeldahl colocado num destilador automático procedeu-se à alcalinização do meio por adição de hidróxido de sódio a 32% (100mL), ocorrendo assim a libertação de amoníaco. De seguida, iniciou-se a destilação e recolheu-se o destilado num matraz com ácido sulfúrico (0,2N) e indicador (vermelho de metilo). Por último, titulou-se a solução contendo o destilado com hidróxido de sódio (0,2N), sendo o valor do volume gasto usado para o cálculo da massa de azoto proteico total na amostra. É de referir que para os cálculos efetuados foi utilizado o fator 6,25 para conversão do azoto total em azoto proteico.

4.2.6. Determinação do teor em gordura total

A determinação do teor em gordura total foi efetuada num aparelho de Soxhlet, mais uma vez, segundo o método oficial da AOAC (1998). Pesaram-se, rigorosamente, cerca de 5 g de amostra, adicionou-se sulfato de sódio anidro, misturando-se até a amostra ficar com um aspeto seco. De seguida, transferiu-se a amostra para um cartucho e procedeu-se à sua extração em Soxhlet com éter de petróleo durante cerca de 12h, para

um balão previamente pesado. Finalizada a extração, eliminou-se, por destilação, o solvente contido no balão onde foi recolhida a gordura extraída. Por fim, procedeu-se à secagem em estufa a 100ºC, evaporando-se os vestígios de solvente que ainda existissem, até peso constante.

4.3. ANÁLISE DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

4.3.1. Ácido ascórbico

Foram diluídos 5g de amostra, triturada e homogeneizada, em 90 mL de ácido oxálico (0,4%). Após homogeneização, tomou-se uma alíquota de 2 mL, à qual se adicionou 50 mL de água destilada que na sequência foi titulada com reagente de Tillmans (AOAC, 1998). O método baseia-se na redução do 2,6-diclorofenol (DIP) pelo ácido ascórbico, expresso em mg ácido ascórbico/100g amostra. A quantidade de ácido ascórbico nas amostras foi obtida com base na curva padrão do ácido ascórbico ($y=1.121x – 2.652x10^{-2}$, $r^2=0.99385$).

4.3.2. Vitamina E

A determinação do teor de vitamina E, nos diferentes constituintes do fruto abacate, seguiu o procedimento descrito por Amin (2001) através de uma determinação colorimétrica de acetato de tocoferila. O método é baseado na redução de azul de tetrazólio em meio alcalino, após extração com éter de petróleo a partir de EDTA aquoso e transesterificação. A reação de oxidação-redução ocorre após 10 minutos em banho a 90 ± 2°C formando-se o derivado do formazan. As medidas de absorbância foram realizadas a 526nm em triplicado.

4.3.3. Carotenóides totais

Foram pesadas 5g de amostra, adicionando-se 40mL de acetona pura. Após agitação constante durante 15 minutos ao abrigo da luz, filtrou-se sob vácuo, adicionando-se, posteriormente ao resíduo, 30mL de éter de petróleo, homogeneizando-se por três vezes.

Os pigmentos foram transferidos para uma ampola de decantação, realizando-se uma lavagem exaustiva com água destilada. A quantificação dos carotenóides, previamente separada e medida volumetricamente, foi realizada por espectrofotometria UV/Vis, a um comprimento de onda de 450nm, usando o éter de petróleo como branco, de acordo com a fórmula abaixo representada, onde o coeficiente de extinção para a quantificação dos carotenóides é de 2,592 (Almeida e Penteado, 1988).

$$\mu g \text{ de carotenóides/g amostra} = \frac{\text{Abs x Volume x } 10^6}{100 \text{ x } E1^{\%}_{1\,cm} \text{ x Peso da amostra}}$$

4.3.4. Fenólicos totais

A extração dos compostos fenólicos seguiu o procedimento descrito por Genovese et al., (2003) para a determinação do conteúdo fenólico total nos frutos, usando o reagente Folin-Ciocalteau. Cada amostra (5g) foi homogeneizada com 100mL de metanol/água (80/20), por 1 hora. O sobrenadante obtido foi filtrado, em sistema de vácuo e o volume final corrigido para 100mL com metanol. A determinação dos fenóis totais foi realizada de acordo com Zieliski e Kozowska (2000) com algumas alterações. Do filtrado final de cada amostra, tomaram-se 0,5mL, adicionaram-se 8mL de água destilada e 0,5mL de reagente Folin-Ciocalteau. A solução foi homogeneizada e, após 3 minutos, acrescentou-se 1 mL de solução saturada de $NaCO_3$. As soluções ficaram em repouso durante 1 hora, ao abrigo da luz, para o desenvolvimento da cor, através da redução dos ácidos fosfomolíbdico e fosfotúngstico, em meio alcalino. As leituras das absorvâncias foram a 720 nm por espetrofotometria (Shimadzu UV-2100), utilizando o ácido gálico (GA) como padrão em mg (EAG)/100g de amostra ($y = 0.871x + 0.013$; $r^2 = 0.999$).

4.3.5. Flavonóides totais

A determinação dos flavonóides totais foi realizada segundo a metodologia descrita por Francis (1982). Foram adicionados aproximadamente 4 g de amostra (polpa, pele e semente) a 30mL de uma mistura de etanol (95%) e HCl (1.5 N) na proporção 85:15. Após homogeneização, a solução foi aferida para 25mL, permanecendo em repouso

durante 12 horas a uma temperatura de 4ºC. Após o período de repouso supracitado, procedeu-se a uma filtração da solução em estudo, sendo realizadas as leituras por espetrofotometria (Shimadzu UV-2100), com leituras a 535nm e 374nm, para quantificação das antocianinas e flavonóides, respetivamente. Os resultados foram expressos em mg/100 g de amostra, obtidos por cálculo matemático:

$$\text{Antocianinas totais} = \frac{(\text{Abs x fator de diluição})}{98{,}2}$$

$$\text{Flavonóides amarelos} = \frac{(\text{Abs x fator de diluição})}{6{,}6}$$

4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O método do DPPH$^{\bullet}$ utiliza o radical livre disponível comercialmente DPPH$^{\bullet}$, que é solúvel em metanol (Brand-Williams et al., 1995). O grau de descoloração do radical DPPH$^{\bullet}$ a 517 nm pela ação dos compostos antioxidantes é medido espectrofotometricamente numa solução metanólica até o valor de absorvância permanecer constante e indicar a eficiência do antioxidante adicionado na remoção do radical livre. Alguns autores recomendam a utilização do método do DPPH$^{\bullet}$ por ser uma metodologia analítica fácil e precisa na avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de frutas.

Todas as amostras foram diluídas em metanol nas concentrações de 0,1mg/mL e de 0,2 mg/mL e para o padrão (BHT) as concentrações usadas foram de 0,05 mg/mL e de 0,1 mg/mL. Uma alíquota de 1,5 mL de solução metanólica do radical DPPH$^{\bullet}$ (20 mg/L) foi adicionada a 0,5 mL dos extratos aquosos, com concentrações diferentes, 0,1 e 0,2 mg/mL respetivamente, e a 0,5mL de solução padrão (BHT), previamente dissolvido em metanol (0,05 e 0,1 mg/mL). O metanol (como solvente) foi utilizado como controlo. A leitura das absorvâncias foi realizada num espectrofotómetro SHIMADZU, modelo UV-2100 Series, a um comprimento de onda de 517 nm. A queda na leitura da densidade ótica das amostras e do BHT foi correlacionada com o controlo (solução sem antioxidante), num intervalo de tempo pré-definido (20 minutos) estabelecendo-se a percentagem de descoloração do radical DPPH$^{\bullet}$, conforme a fórmula que se segue:

$$\% = [(\text{Abs}_{\text{controlo}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})/\text{Abs c}_{\text{ontrolo}}] \times 100$$

Para a determinação da ação antioxidante pelo método do radical DPPH$^{\bullet}$ é importante referir que a qualidade das soluções deve ser garantida. Assim, pela razão apresentada, todas as soluções foram preparadas diariamente.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), a partir de ensaios em triplicado para cada determinação, fazendo-se a análise das médias dos resultados para um nível de 5% de significância.

CAPITULO V. Resultados e discussão

As características da qualidade de um fruto dependem do cultivar, das condições de cultivo, estado de maturação, condições de armazenamento e, acima de tudo, das condições edafo-climatéricas de cada região de cultivo (Vinha et al., 2012; Ahmed et al., 2010).

Os resultados obtidos para as determinações físico-químicas, específicas para a caracterização do fruto estudado, nas diferentes partes que o constituem, encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos nos diferentes constituintes do fruto abacate, cultivar Hass. Os parâmetros de humidade, proteínas totais, cinzas e gordura total estão expressos em percentagem. Os sólidos solúveis totais estão representados em º Brix e a acidez em mg/100g (equivalentes em ácido málico).

	Partes constituintes do fruto abacate var. Hass		
Parâmetros**	Polpa*	Pele*	Semente*
Humidade (%)	70.83±3.53[a]	69.13±2.58[b]	54.45±2.33[c]
Sólidos solúveis totais (ºBrix)	6.68±1.02[a]	3.01±2.03[b]	3.54±1.97[b]
Proteínas totais (%)	1.82±0.07[a]	1.91±0.08[a]	2.19±0.16[b]
Cinzas (%)	1.77±0.16[a]	1.50±0.08[b]	1.29±0.03[c]
Gordura (%)	43.5±4.62[a]	2.20±1.65[b]	14.7±0.32[c]
Acidez	0.96±0.02[a]	1.83±0.21[b]	2.39±0.15[c]

*Valores expressos em média ± desvio padrão, para n =3. **Valores com letras iguais na mesma linha, considerando-se cada parâmetro químico analisado nas diferentes partes constituintes do fruto, indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das médias ($p>0.05$).

A humidade, ou teor de água de um fruto constitui um dos mais importantes e avaliados índices em alimentos. Apresenta uma elevada importância económica por refletir o teor de sólidos de um fruto e avaliar o seu grau de perecibilidade. Pelos resultados obtidos verifica-se que a polpa do abacate apresenta maior teor de água (70.83%), seguida da

pele e semente com 69.13% e 54.45%, respetivamente, apresentando diferenças significativas entre eles ($p < 0.05$).

Segundo Hérnandez-Munõz et al. (2006) a determinação da acidez total que determina o teor de ácido orgânicos tende a diminuir ao longo do período de amadurecimento de um fruto. O teor de ácidos orgânicos diminui com a maturação do fruto em decorrência do processo respiratório ou da sua conversão em açúcares. Como no período de maturação de um fruto se regista uma maior atividade metabólica, os ácidos orgânicos constituem, por excelência, uma fonte de reserva energética do fruto, através dos processos oxidativos no ciclo de Krebs. A semente do abacate, com 2.39 mg/100g, apresentou maior acidez do que a pele (1.83 mg/100g) e polpa (0.96 mg/100g), observando-se diferenças significativas entre eles ($p < 0.05$). Estes resultados comprovam que o fruto estudado já se encontrava com o índice de maturação desejável para o seu consumo *in natura*.

Entre os diversos componentes da fruta, os sólidos solúveis totais (ºBrix) desempenham um papel primordial para a sua qualidade, devido à influência nas propriedades termofísicas, químicas e biológicas de um fruto. Pode ser definindo como a percentagem de sólidos que se encontram dissolvidos na matriz do alimento. São registados em ºBrix, para o caso concreto dos frutos, e tendem a exibir maiores concentrações com a evolução da maturação, devido aos processos de biossíntese da planta ou ainda pela degradação dos polissacarídeos. Uma vez mais, a polpa do abate apresentou maior valor em sólidos solúveis totais, com 6.68ºBrix, resultado inversamente proporcional ao da acidez, comprovando, de novo que o fruto já atingira o grau de maturação desejável. Este resultado era o esperado uma vez que o referido parâmetro físico-químico representa uma das melhores formas de avaliação do grau de doçura do fruto, sendo a polpa do fruto a única parte comestível. No entanto, o teor de sólidos solúveis totais da polpa pode ser considerado baixo, o que favorece o seu consumo *in natura*.

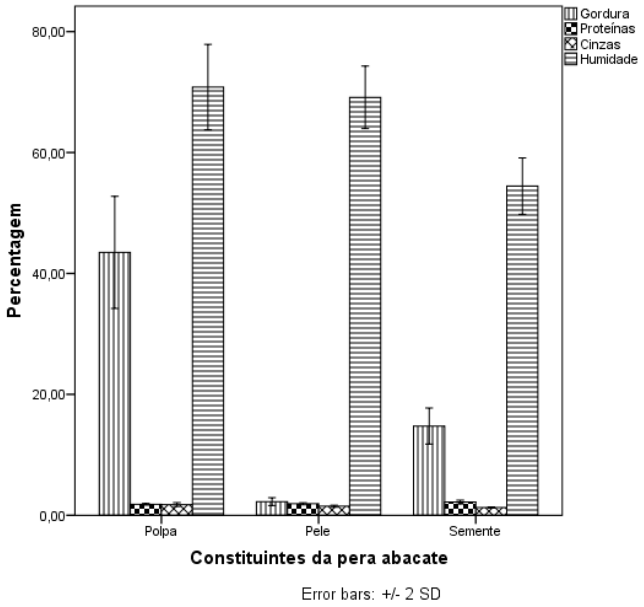


Figura 14. Representação gráfica das médias obtidas para os teores em gordura, proteína, cinzas e humidade encontrados nos diferentes constituintes estudados (polpa, pele e semente) do abacate var. Hass.

A figura 14 apresenta os valores percentuais dos teores de humidade, gordura, proteínas e cinzas. A representação gráfica mostra claramente a riqueza em gordura presente no fruto de origem portuguesa. Os teores de gordura, proteínas e cinzas quantificados na polpa foram de 43.5%, 1.82% e 1.77%, respetivamente. Para a pele foram encontrados teores significativamente inferiores de cinzas e de gordura total (1.50% e 2.20%, respetivamente) e um teor proteico superior (1.91%) aos descritos na polpa, mas sem significância estatística ($p > 0.05$). A semente foi o constituinte do fruto que apresentou maior quantidade de proteínas totais (2.19%) e menor teor em cinzas (1.29%), no entanto, relativamente ao seu teor em gordura, mostrou percentagens superiores ao encontrado na epiderme do fruto (14.7%).

Segundo Tango et al. (2004) num estudo realizado em 24 variedades de abacate, os teores encontrados para humidade e gordura na polpa do fruto variedade Hass foram de 57.3% e de 31.1%, respetivamente, significativamente inferiores aos nossos (70.83% e 43.5%). Relativamente às sementes do fruto, Olaeta e colaboradores (2007) observaram teores superiores em proteínas totais e cinzas, quando comparados com os registados neste trabalho (3.18% e 1.51%, respetivamente). Face ao supracitado, torna-se importante afirmar que as percentagens de humidade nos frutos de abacate diminuem

com a maturação e com os teores de gordura, sendo normalmente influenciados pelas condições climáticas. A variedade Hass Portuguesa desenvolve-se durante o inverno, dado importante para justificar os resultados obtidos e que, possivelmente foram influenciados pelo stress hídrico do nosso fruto. Pelos resultados apresentados e pela consulta exaustiva a publicações científicas semelhantes, conclui-se que o abacate Hass nacional é um fruto rico em gordura, nomeadamente, a polpa, ideal para o seu consumo. As sementes, pela sua riqueza proteica, podem ser sobrevalorizadas e aproveitadas para a indústria alimentar (como subprodutos alimentares), na indústria farmacêutica (suplementos) e direcionados para a dermocosmética pelas características acima referidas.

O amadurecimento de qualquer fruto promove um aumento de compostos bioativos, cujas propriedades benéficas já foram descritas anteriormente. De entre os diferentes metabolitos secundários com essas propriedades, os fenólicos, flavonóides e os carotenóides (pigmentos responsáveis pela coloração dos frutos) são os mais citados. Arancibia-Avila et al. (2008) observaram que os polifenóis totais, flavonóides e antocianinas foram significativamente superiores nos frutos amadurecidos quando comparados com os verdes ou em fase de senescência.

Neste trabalho foram avaliados os teores de fenólicos totais, os flavonóides e os carotenóides totais, todos quantificados por espectrofotometria (tabela 2). Foram também quantificadas as vitaminas C e E. De uma maneira geral, a contribuição da vitamina C para a capacidade antioxidante total dos extratos de alimentos de origem vegetal varia de acordo com o tipo de fruto. Na verdade, a vitamina C não assume um papel de destaque na matriz do abacate, mas devido ao seu carácter hidrofílico, foi estudada, uma vez que as vitaminas de maior representação nesta matriz alimentar são a vitaminas A, D e E, todas de natureza lipossolúvel.

Para melhor visualização e interpretação dos resultados, os teores de compostos antioxidantes foram representados graficamente (Figuras 15 e 16).

É bem sabido que os compostos bioativos não possuem todos a mesma atividade antioxidante, pelo que um aumento de um composto não significa um aumento proporcional da atividade antioxidante (Sanjust et al., 2008). Quando se procede a uma

avaliação de um extrato complexo, é preciso ter em conta os efeitos sinergísticos ou antagonísticos entre os diversos compostos presentes, o que torna não só, a atividade antioxidante dependente da concentração de cada composto, mas também da interação entre os diferentes compostos, antioxidantes ou não. Não se deve excluir, também, a possibilidade de existência de outras moléculas nos extratos estudados, que não compostos antioxidantes, e que possam afetar a sua atividade antioxidante, como por exemplo a presença de compostos terpénicos, alcaloides, cumarinas, entre outros.

Tabela 2. Quantificação dos compostos antioxidantes (mg/100g) obtidos nas distintas partes que constituem o fruto: polpa, pele e semente, respetivamente.

	Partes constituintes do fruto abacate var. Hass*		
Compostos Antioxidantes** (mg/100g)	Polpa	Pele	Semente
Fenólicos	4.10 ± 0.69^{a}	6.79 ± 1.17^{b}	7.03 ± 1.30^{c}
Flavonoides	21.9 ± 0.96^{a}	44.3 ± 3.08^{b}	48.0 ± 2.69^{b}
Antocianinas	n.d.	$5.0E^{-3} \pm 0.03^{b}$	$3.0E^{-3} \pm 0.01^{b}$
Carotenoides	81.5 ± 17.9^{a}	258.5 ± 11.7^{b}	9.66 ± 16.4^{c}
Vitamina C	1.18 ± 0.74^{a}	4.10 ± 2.67^{b}	2.58 ± 1.10^{b}
Vitamina E	5.36 ± 1.77^{a}	2.13 ± 1.03^{a}	4.82 ± 1.42^{b}

*Valores expressos em média ± desvio padrão, para n =3.**Valores com letras iguais na mesma linha, considerando-se o teor de cada composto antioxidante obtido nas diferentes partes constituintes do fruto, indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das médias ($p > 0.05$).

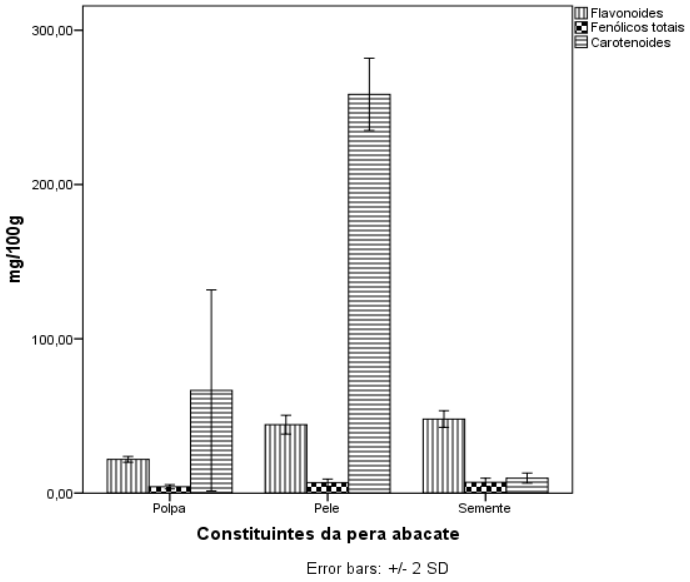


Figura 15. Representação gráfica das médias obtidas para os teores de compostos antioxidantes, concretamente, fenólicos totais, flavonoides e carotenoides em mg/100g encontrados nos diferentes constituintes estudados (polpa, pele e semente) do abacate var. Hass.

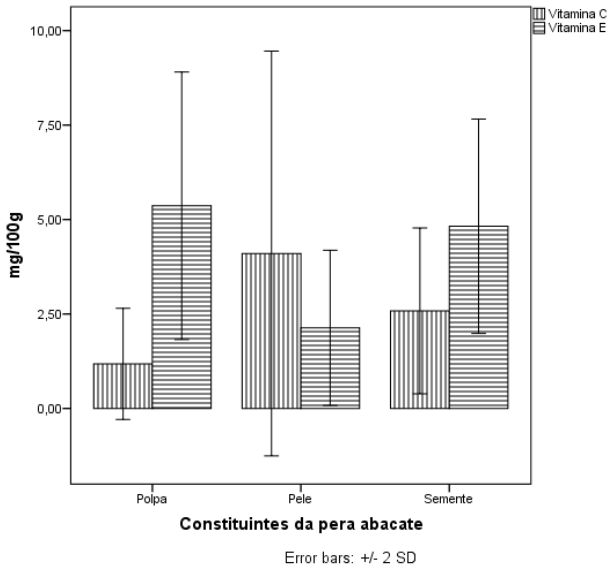


Figura 16. Representação gráfica das médias obtidas para os teores de vitamina C e vitamina E (mg/100g) obtidos nos diferentes constituintes estudados (polpa, pele e semente) do abacate var. Hass.

Os resultados revelam superioridade nos teores de fenólicos totais, flavonóides e vitamina C, na semente do abacate. Comparativamente com a pesquisa feita por Wang *et al.* (2007), a partir de abacates cultivados no México, os resultados mostram-se semelhantes, verificando-se maior conteúdo fenólico total na semente (64%), seguindo-se da pele (23%) e polpa (13%), sendo que as quantidades mostraram-se também semelhantes aos valores obtidos na presente investigação. Curiosamente, o teor de vitamina E foi menor (4.82 mg/100g), apresentando significado estatístico ($p < 0.05$), entre os constituintes estudados.

A pele do fruto apresentou o maior teor em carotenóides (258.5 mg/100g), o que era esperado, já que é na pele que estes fitoquímicos normalmente se concentram. Mais uma vez os resultados obtidos são concordantes com os de Wang et al. (2007), já que os totais de carotenóides encontrados revelaram-se mais elevados na pele do fruto. Em 2009 foi feita uma pesquisa que conclui que a composição em carotenoides é afetada por vários fatores, sendo que aumentam com o grau de maturação. Concluiu-se, ainda, no mesmo estudo, que os níveis de carotenóides na polpa do fruto podem estar associados ao teor de gordura presente na mesma, promovendo um aumento proporcional (Lu et al, 2009). Estes componentes contribuem para que o abacate seja caracterizado como um dos frutos com maior capacidade antioxidante lipofílica (Wu et al., 2004), sendo que as xantofilas, nomeadamente a luteína e a criptoxantina, são os agentes fitoquímicos que predominam neste grupo, contribuindo em cerca de 90% do total de carotenoides. (Lu et al.,2005)

Uma vez mais, este estudo aponta para a reutilização de subprodutos alimentares, como é exemplo a pele do fruto abacate. A sua riqueza em carotenóides e a impossibilidade de ser um produto alimentar deve promover a sua implementação na área da dermocosmética. Se o facto das frutas serem alimentos nutritivos não é suficiente para promover uma mudança na dieta alimentar, é possível que a descoberta de cientistas ingleses funcione: estes alimentos podem deixar as pessoas mais bonitas. Uma experiência feita por investigadores da universidade britânica de St. Andrews mostrou que o aumento do consumo de frutas deixam as pessoas mais atraentes em apenas seis semanas. Para comprovar o facto, o grupo acompanhou uma mudança na dieta alimentar de 35 pessoas inscritas netes estudo e registou as mudanças físicas apresentadas. Conforme o publicado no jornal Daily Mail, as frutas são ricas em carotenóides,

exercendo uma ação protetora contra o dano celular ocasionado pelos raios UV e poluição, para além de prevenirem o risco do desenvolvimento de certas doenças relacionadas com a idade, tais como, o envelhecimento precoce, cancros e problemas cardíacos. O resultado, conforme publicado na revista PLoS ONE, foi uma tonalidade de pele mais atraente em brilho e coloração, resultante do aumento dos níveis de carotenóides ingeridos.

A polpa do abacate nacional apresentou maiores teores de vitamina E (5.36 mg/100g), seguida pela semente e pele (4.82mg/100g; 2.13mg/100g, respetivamente). Os valores encontrados na polpa são semelhantes aos publicados por Salgado et al. (2008) em abacates cultivados no Brasil.

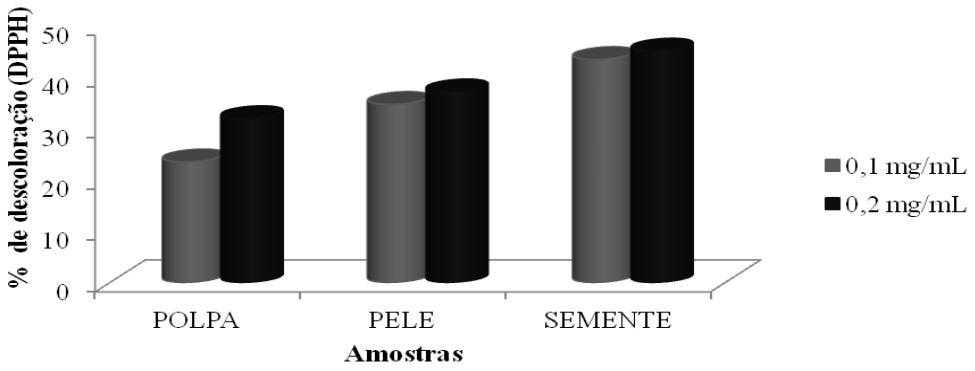


Figura 17. Atividade antioxidante (% descoloração do radical livre DPPH) dos extratos aquosos da polpa, pele e semente, do abacate português com concentrações de 0.1 e 0.2 mg/mL.

A partir dos resultados apresentados na Figura 17, podem-se observar as percentagens de descoloração do DPPH$^{\bullet}$ pelos extratos aquosos obtidos a partir dos três constituintes do fruto abacate nacional. A semente mostrou ser o tecido com maior capacidade antioxidante, seguindo-se a pele e a polpa, respetivamente. Estes resultados são ligeiramente diferentes dos já descritos em literatura, uma vez que tanto a pesquisa de Wang et al. (2007) como a de Rodriguez-Carpena et al. (2011) mostraram que a pele detém uma superioridade nesta atividade, apesar de não serem valores muito discrepantes. De facto verifica-se que tanto a pele como a semente do fruto abacate são

bastante ricos em compostos antioxidantes, sendo que a semente apresenta maiores teores em compostos fenólicos e flavonoides, e a pele, em contrapartida, maior riqueza em carotenóides. Os valores das atividades antioxidantes encontrados na polpa do fruto são concordantes aos descritos pelos autores acima citados, sendo significativamente inferiores aos resultados da pele e da semente, no entanto, não se pode menosprezar esta ação antioxidante, atribuída à presença de certos agentes fitoquímicos, tais como os açúcares e a vitamina E, sendo que os primeiros são maioritariamente responsáveis pela capacidade antioxidante neste tecido. (Bertling et al., 2007).

Capítulo VI. Conclusão

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm provado as potencialidades do abacate nomeadamente a nível da saúde. Este fruto rico em vários nutrientes, assim como agentes fitoquímicos, pode e deve fazer parte de uma dieta saudável e de carácter preventivo em várias doenças. A este nível, o abacate tem uma particularidade que o torna ainda mais interessante. Pela sua riqueza em gorduras monoinsaturadas e compostos bioativos, como os carotenóides, os mesmos são facilmente absorvidos pela corrente sanguínea, apresentando maior ação antioxidante, devido ao facto de se encontrarem com maior biodisponibilidade.

Neste trabalho verificou-se que os compostos bioativos presentes no fruto abacate não se concentram apenas na parte edível como também proliferam na pele e semente do fruto. Muitos estudos provam que certos fitoquímicos, provenientes do metabolismo secundário dos vegetais, encontram-se em elevadas concentrações particularmente nos tecidos que constituem a parte não edível do fruto. Este estudo confirmou que a semente apresenta níveis significativamente superiores de compostos fenólicos e de flavonóides. Na pele do fruto foram encontradas concentrações superiores de carotenóides e a polpa potencia-se pelo elevado teor em vitamina E. Uma das grandes vantagens destes fitoquímicos é o seu poder antioxidante, propriedade cada vez mais valorizada em várias áreas, não só a nível nutricional, como a nível dermatológico e cosmético.

Os resultados sugerem, uma vez mais, o reaproveitamento destes tecidos vegetais, como potenciais fontes de vários nutracêuticos ou *cosmeticaceuticals*, dependendo das indústrias a que podem ser destinados, podendo assim ter vantagens económicas a valorizar.

Sendo a fitocosmética uma área em ascensão e cada vez mais procurada pelos consumidores exigentes, este fruto e os seus subprodutos em particular, tornam-se bastante atrativos devido às vantagens que os seus extratos podem trazer à pele, quer o extrato oleoso, da sua polpa, que é já bastante utilizado, como os extratos obtidos da semente e pele do abacate.

Assim, conclui-se que o abacate produzido em Portugal é rico em compostos fitoquímicos e similar aos frutos produzidos tradicionalmente no México, Brasil ou Estados Unidos.

Este estudo foi pioneiro e abre caminho a novas investigações, na vertente da dermocosmética, de modo a que se constate e identifique os agentes fitoquímicos e as suas potencialidades nesta área. Por outro lado, promove novos estudos na área alimentar e farmacêutica no desenvolvimento de suplementos químicos com ação antioxidante, valorizando-se a economia nacional através da divulgação e caracterização dos compostos bioativos deste fruto.

CAPÍTULO VIII. Referências Bibliográficas

Adeyemi, O.O, Okpo, S.O, Ogunti, O.O (2002). Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana mill* (lauraceae). *Fitoterapia*, 73(5), pp. 375-380.

Ahmed, D.M., Yousef, A.R.M. E Hassan, H.S.A. (2010). Relationship between electrical conductivity, softening and color of Fuerte avocado fruits during ripening. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(5), pp. 878-885.

Aiyegoro, O.A. e Okoh, A.I. (2010). Preliminary phytochemical screening and *In vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *Complementary & Alternative Medicine*, 10, pp. 21-29.

Almeida, L.B. e Penteado, M.V.C. (1988). Carotenoids and pro-vitamin A value of white fleshed Brasilian sweet potatoes (Ipomoea batatas Lam.). *Journal of Composition and Analysis*, 1, pp. 249-258.

Amin, A.S. (2001). Colorimetric determination of tocopheryl acetate (vitamin E) in pure form and in multivitamin capsules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 51, 3, pp. 267-272.

Anaka O.N., Ozolua R.I. e Okpo S.O. (2009). Effect of the aqueous seed extract of *Persea Americana* mill (Lauraceae) on the blood pressure of spraguedawley rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(10), pp. 485-490.

Anita, B.S.; Okokon, J.E. e Okon, P.A. (2005). Hypoglycemic activity of aqueous leaf extract of Persea americana Mill. *Indian Journal Pharmacology*, 37(5), pp. 325-326.

Arancibia-Avila, P. *et al.* (2008). Antioxidant properties of durian fruit as influenced by ripening. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 2118-2125.

Association of Official Analytical Chemists. (1998). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 16ed. Arlington.

Ashton, O.B.O. *et al.* (2006). Pigments in avocado tissue and oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, pp. 10151-10158.

Athar, M. e Nasir, S. M. (2005). Taxonomic perspective of plant species yielding vegetable oils used in cosmetics and skin care products. *African Journal of Biotechnology*, 4, pp. 36-44.

Berasategi, I. *et al.* (2011). Stability of avocado oil during heating: comparative study to olive oil. *Food Chemistry*, 132, pp. 439-446.

Bertling, I., Tesfay, S.Z. e Bower, J.P. (2007). Antioxidants in "Hass" avocado. *South African Avocado Growers Association*, 30, pp. 17-19.

Boto, A.C.F. (2008). Pênfigo vulgar – um caso pediátrico. *Acta Pediatrica Portuguesa*, 39(4), pp. 152-154.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. e Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, 28, pp. 25-30.

Bredif, S. *et al.* (2010). Antiitching properties of patented avocado peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 62(3), p. 54.

Bredif, S. *et al.* (2007). Avocado sugars are effective inducer of cutaneous defensive functions. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(2), p. 84

Carabela, V. *et al.* (2010). New phytocosmetic products that are eficiente for care and beauty. *International Conference BIOATLAS*, pp. 109-113.

Cardoso, R., Barrére, A.P.N. e Trovão, F.C. (2009). Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde. *Einstein – Educação Continuada em Saúde*, 7(2), pp. 106-109.

Castillo-Juarez, I. *et al.* (2009). Anti-*Helicobacteria pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), pp. 402-405.

Chia, T.W.R. e Dykes, G.A. (2010). Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana*) of three cultivars. *Pharmaceutical Biology*; 48(7), pp. 53-756.

Choi, C.M e Berson, D.S. (2006). Cosmeceuticals. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 25, pp. 163-168.

Cowan, A.K. (2004). Metabolic control of avocado fruit growth: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, active oxygen species and the role of C7 sugars. *South African Journal of Botany*, 70(1), pp. 75–82.

Cowan, A.K. e Wolstenholme, B.N. (2003). Avocados. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2, pp. 348-353.

Dalle-Donne, I.R. *et al.* (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52, pp. 601-623.

Degáspari, C. H.; Waszczynskyj, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos**.** *Revista Visão Acadêmica*, 5(1), pp. 33-40.

Ding, H. *et al.* (2009). Selective induction of apoptosis of human oral cancer cell lines by avocado extracts via a ROS-mediated mechanism. *Nutrition and Cancer*, 61(3), pp. 348-356.

Ding, H. *et al.* (2007). Chemopreventive charecteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*, 17, pp. 386-394.

Dinubile, N.A. (2010). A potential role for avocado and soybean based nutritional supplementation in the management of osteoarthritis: a review. *The Physician and Sports Medicine*, 38(2), pp. 71-81.

Donadio. L. C. (1995). *Abacate para exportação: aspectos técnicos da produção*. 2. ed. Brasilia : Frupex.

Dreher, M.I. e Davenport, A.J. (2012). Hass avocado composition and potential health effects. *Food Science and Nutrition.*

Dwyer, J.H. *et al.* (2001). Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclesoris study. *Journal of American Heart Association*, 103, pp. 2922-2927.

Elsayed, N.M. (2001). Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental: nutritional interaction. *Nutrition*, 17, pp.828-834.

Feitosa, G.O., Iensen, E. e Carneiro, P.I.B. (2007). Caracterização do óleo e dos polissacarídeos do fruto *Persea americana* Mill.(Abacate). *Anais do XVI EAIAc.*

Fernandez-Panchon, M.S. *et al.* (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Critical Reviews Food Science Nutrition*, 48, pp. 649-671.

Flagg, E.W. *et al.* (1994). Dietary glutathione intake and risk of oral and pharyngeal cancer. *American Journal of Epidemiology*, 139(5), pp. 453-465.

Food and Agriculture Foundation of United Nations Home page. [Em linha]. Disponível em <http://www.fao.org/index_en.htm> . [Consultado em 21/01/2012]

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

Genovese, M.I., Santos, R.J., Hassimoto, N.M.A e Lajolo, F.M. (2003). Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Revista Ciências Farmacêuticas*, 39, pp. 167-169.

Goetz, P. (2005). Élements du traitement par phytothérapie du vieillissement de la peau et du conjoctif. *Phytothérapie Clinique*, 2, 72-76.

Gruel, A.K. *et al*. (2002) Photoprotection of UV-irradiated human skin: An antioxidative combination of vitamins E and C, carotenoids, selenium and proanthocyanidins. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15, pp. 307–315

Guaratini, T., Medeiros, M.H.G. e Colepicolo, P. (2007). Antioxidantes na manutenção do equilibro redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, 30(1), pp. 206-213.

Hérnandez-Muñoz, P, Almenar, E., Ocio, M.J., Gavara, R. (2006). Effect of calcium dips and chitosan coating on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology*, 39, pp. 247-253.

Honarbakhsh, S. e Schachter, M.W. (2009). Vitamins and cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*, 101, pp. 1113-1131.

Howaza, A. *et al.* (2007). Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: the coronary artery risk development in young adults (cardia)/young adult longitudinal trends in antioxidants (yalta) study. *Clinical Chemistry*, 53(3), pp. 447-455.

Hughes, K.J. *et al.* (2009). Plasma carotenoids and biomarkers of oxidative stress in patients with prior head and neck cancer. *Biomarker Insights*, 4, pp. 17-26.

Hurtado-Fernandéz, E., Carrasco-Pancorbo, A. e Fernandéz-Gutiérrez, A. (2011). Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS method for the determination of phenolic metabolites from avocado (*Persea americana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp. 2255-267.

Imafidon, E.K. e Okunrobo, O.L. (2009). Biochemical evaluation of the tradomedicinal uses of the seeds of *Persea americana* Mill.,(Familiy:Lauraceae). *World Journal of Medicinal Sciences*, 4(2), pp. 143-146.

INFARMED. (2010). Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal (PCHC). [Em linha]. Disponível em <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/COSMETICOS>. [Consultado em 07/07/2012].

Joseph, L.B e Koukouras, K. (2002). *Persea gratíssima* (avocado) sterols decrease UVB induced proinflammatory mediators. *Journal of Cosmetic Science*, 53(5), pp. 309-311.

Kim, K.W. *et al.* (2008). Effects of *Cervus Korean* temminck var. mantchuricus *Swinoe* on protease activities, antioxidant and free radical damages in rheumatis arthritis rats. *Toxicology in vitro*, 22, pp.80-86.

Knight, J.R. (2002). History, Distribution and Uses. *In:* Whiley, A.W., Schaffer, B., Wolstenholme, B.N. (Eds.). *Avocado: Botany, Production and Uses.* Wallingford, Cabi International, pp. 1-14

Krutmann, J. e Gilchrest, B.A. (2006). Photoaging of skin. *In*: Gilchrest, B.A., Krutmann, J. (Eds). *Skin aging*. Nova Iorque, Springer, pp. 33-44.

Kole, P. I. *et al.* (2005). Cosmetics potential of herbal extracts. *Indian Journal of Natural Products and Resources,* 4(4), pp. 315-321.

Kosińska, A. *et al.* (2012). Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60* (18), pp. 4613–4619.

Lam, R., Woo, A.Y.H., Leung, P.S. e Cheng, C.H.K. (2007). Antioxidant Actions of Phenolic Compounds Found in Dietary Plants on Low-Density Lipoprotein and Erythrocytes in Vitro. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(3), pp. 233–242.

Leça, J. (2009) Agricultando: O Abacate. *Revista Mais* (Março), p.1

Lee, J., Koo, N. e Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging and antioxidantive nutraceuticals. *Comprehensive Reviews* in *Food Science and Food Safety*, 3, pp. 21-33.

Lozano, Y.F. *et al.* (1993). Unsaponificable matter, total sterol and tocopherol contents of avocado oil varieties. *American Oil Chemists' Society,* 70(6), pp. 561-565.

Liu, X. *et al.* (2002) Postulated physiological roles of the seven-carbon sugars, mannoheptulose, and perseitol in avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(1), pp. 108-114.

Lu, Q. *et al.* (2009). California Hass avocado: profiling of carotenoids, tocopherol, fatty acid, and fat contet during maturation and from different growing areas. *Journal of Food and Agriculture Chemistry*, 57(21), pp. 10408-10413.

Lu, Q. *et al.* (2005). Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, pp. 23-30.

Marllet, J.S. e Cheung, T-F. (2007). Database and quick methods of assessing typical dietary fiber intakes using data for 228 commonly consumed foods. *The Journal of the American Dental Association*, 97(10), pp. 1139-1148.

Mendez, P.O. e Hernandez, G.L. (2007). HDL-C sizeand compositon are modified in the rat by diet supplementation with "Hass" avocado. *Archivos de Cardíologia de Mexico*, 77(1), pp. 17-24.

Meyer, M.D. e Terry, L.A. (2008). Development of a rapid method for the sequential extraction and subsequent quantification of fatty acids and surgar from avocado mesocarp tissue. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, pp. 7439-7445.

Min, K., Eleber, S.E. (2008). Flavonoid affects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp. 96-104.

Moreau, R.A., Whitaker, B.D. e Hicks, K.B. (2002). Phytosterols, phytostanols and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), pp. 457-500.

Nayak, B.S., Raju, S.S. e Chalapathi-Rao, A.V. (2008). Wound healing activity of Persea americana (avocado) fruit: a preclinical study on rats. *Journal of Wound Care*, 17(3), pp. 123-126.

Nazrun, A.S., Norazlina, M. e Nirwana, S. I. (2012). The anti-inflammatory role of vitamin E in prevention of osteoporosis. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2012, pp. 1-7.

Observatório de Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares. [Em linha]. Disponível em <http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=123>. [Consultado em 26/11/2012]

Osche, J.J., Soule, M.J., Jr, Dijkman, M.J. e Wehlburg, C. (1961) *Tropical and Subtropical Agriculture*, Nova Iorque, p. 760.

Olaeta, J.A., Undurraga, P. e Espinosa, G. (2007). Evolución del contenido de aceite y compuestos no saponificables en paltas (Persea americana Mill.) CVS. Hass, Fuerte e Isabel. *Actas VI Congreso Mundial del Aguacate*, pp. 12-16.

Ortiz, H.N. *et al.* (2003). Efecto antioxidante del tomate (Lycopersicum esculentum Mill) en la lipoproteína de alta densidad (HDL) y en los microsomas hepático de la rata. *Archivos Venezolanos de Farmacología Y Terapéutica*, 1, pp.1-12.

Park, Y.K. *et al*. (2003). Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutation Research*, 529, pp. 77-86.

Pietro, R.C.L.R. *et al.* (2006). Efficacy evaluation of preservatives associated to *Achillea millefolium* extract against *B. subtilis. Brazilian Journal of Microbiology*, 37, pp. 75-77.

Purseglove, J.W. (1968) *Tropical Crops: Dicotyledons.* Londres, I. Longmans, pp. 192–198.

Raharjo, S.H.T. *et al.* (2008). Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, 44(4), pp. 254-262.

Rebelo, E. (2006). Quality of fruits and vegetables. *Food Technology*, 1(6), pp. 99-106.

Rocha, T.E. (2008). *Composição de Ácidos Graxos e de Fitoesteróis em Frutos de Quatro Variedades de Abacate*. Brasília: Universidade de Brasília - Faculdade de Ciências da Saúde, pp. 26-31

Rodréguez-Carpena, J. *et al*. (2011). 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*, 59, pp- 5625-5635.

Rosenblat, G. *et al.* (2011). Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Archives of Dermatology Research*, 303, pp. 239-246.

Roth, G. *et al.* (2009). Mannoheptulose glycolytic inhibitor and novel calorie restriction mimetic. *The FASEB Journal*, 23.

Salgado, J.M. *et al*. (2008). The avocado oil (*Persea americana* Mill) as a raw material for the food industry. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, pp. 20-26.

Sanjust E, Mocci G, Zucca P e Rescigno A. (2008). Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. *Natural Product Research*, 22, pp. 689-708.

Spiertz H. (2010). Food Production, Crops and Sustainability: Restoring Confidence in Science and technology. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2, pp. 439-443.

Storey, W.B. (1974) What kind of fruit is the avocado?. *California Avocado Society Yearbook*, 57, pp. 70-71.

Stücker, M. *et al.* (2001). Vitamin B_{12} cream containing avocado oil in the therapy of plaque psoriasis. *Pharmacology and Treatment*, 203, pp. 141-147.

Tabart, J., Kevers, C., Pincemail J. e Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), pp. 1226-1233.

Tango, J.S., Carvalho, C.R. e Limonta, S.N.B. (2004). Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(1), pp. 17-23.

Tango, J.S. e Turatti, J.M. (1992). Óleo de abacate. *In*: Teixeira, C.G. *et al*. (Ed.) *Abacate: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos económicos*. 2.ed. Campinas, ITAL, p. 250

Tesk, M. e Trentini, A.M.M. (1997) *Compendio de fitoterapia*. 3.ed. Curitiba: Harbarium.

Tiwari, A.K. (2004). Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current Science*, 86(8), pp. 1092-1102.

USDA (United States Department of Agriculture). (2011). Fresh California Avocados. [Em linha]. Disponível em <http://fnic.nal.usda.gov/food-composition/food-fyi/avocado> . [Consultado em 01/07/2012].

Valko, M. *et al*. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal Biochemistry & Cell Biology*, 32(2), pp.3-41.

Vasconcelos, P.J., Calouro, F. e Cavaco, M. (2010). Produção integrada da cultura do abacateiro. [Em linha]. Disponível em <http://docweb.min-agricultura.pt/docbweb/>. [Consultado em 20/01/2012].

Vinha, A.F. *et al*. (2012). Chemical composition and antioxidant activity in Portuguese diospyrus kaki fruit by geographical origins. *Journal Agricultural Science*, 4(2), pp.281-289.

Vinha, A.F. (2005) Provas de Estudos Avançados (DEA). "*Importância dos compostos fenólicos como agentes antioxidantes*". Faculdade de Ciências da Universidade de Vigo, Espanha.

Wang, W. *et al.* (2007). Effect of dietary lutein and zeaxanthin on plasma carotenoids and their transport in lipoproteins in age-related macular degeneration. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, pp. 762-769.

Wu, X. *et al.* (2004). Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal Food Composition and Analysis*, 17, pp. 407-422.

Whiley, A.W., Schaffer, B., Wolstenholme, B.N. (2002) *Avocado: Botany, Production and Uses.* Wallingford, Cabi International.

Yasir, M., Das, S. e Kharya, M.D. (2010). The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. *Pharmacognosy Revie*, 4(7), pp-77-84.

Zieliski, H. e Kozowska, H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 2008-2016.

CAPÍTULO IX. Anexos

Participação no Congresso Internacional de Saúde do IPLeiria

© 2012
ISBN: 978-972-8793-46-3

FICHA TÉCNICA

Organização e Edição
Unidade de Investigação em Saúde (UIS)
Escola Superior de Saúde de Leiria (ESSLei)

Design e Composição
Unidade de Ensino a Distância (UED)

Produção e Propriedade Intelectual
Instituto Politécnico de Leiria (IPL)

Health promotion: dependence of chemical composition, phenolic content and antioxidant activity of Portuguese avocado (Persea Americana)

Autores: Ana F. Vinha; Joana Moreira; Filipa Abrunhosa; Marta O. Soares; M. Beatriz Oliveira

Antioxidants have been extensively employed in food industry, mainly as preservatives. Crude extracts of fruits, as well as derived products, are particularly rich in phenolic compounds and carotenoids, so they have been a focus of attention by industry and pharmaceutical area (chemical and cosmetics), because they can retard oxidative degradation of lipids and thereby improve quality and nutritional value of lipid-containing foods. Antioxidant compounds have been commonly found in both edible and non-edible plants, in which they exhibit a multiplicity of biological effects, including anti-inflammatory capacity, cholesterol regulation, and vascular problem healing and also antioxidant activity. The aim of the present work was to analyze chemical characterization and different solvents extracts (aqueous, 80% acetone, and 80% methanol) of peel, pulp, and seed from two Portuguese avocado (Persea americana) varieties, namely, 'Hass' and 'Fuerte', for their phenolic composition and, also, the antioxidant activity using the ORAC, DPPH, and ABTS assays. Their antimicrobial potential was also studied. Peels and seeds had higher amounts of phenolics and a more intense in vitro antioxidant potential than the pulp. Total phenolic content and antioxidant activity of avocado phenolics was affected by the extracting solvent, extracting time and avocado variety. The avocado materials also displayed moderate antimicrobial effects against Gram-positive bacteria. Avocado extracts protected meat lipids and proteins against oxidation with the effect on lipids being dependent on the avocado variety. Although Portugal is known as a small producer of avocado fruits, it is necessary to highlight their importance in food industry and pharmaceutical industry and also in dermocosmetics area to increase its economic potential and health quality of Portuguese population.