

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Atividade antioxidante da casca da pêra abacate (*Persea americana*) e identificação dos seus compostos

Ana Catarina Mendonça Assunção

Mestrado em Química
Química

Dissertação orientada por:
Doutora Rita Pacheco
Professora Doutora Maria Helena Florêncio

2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às minhas orientadoras Rita Pacheco e Maria Helena Florêncio, por terem aceite orientar-me, tendo-se mostrado disponíveis desde o instante inicial.

À professora Luísa Serralheiro, por todo o apoio demonstrado desde o primeiro dia e por me ter aberto as portas do seu Laboratório, permitindo que todo o meu trabalho laboratorial fosse aí desenvolvido.

No decorrer do ano 2015/2016 tive a sorte de poder conhecer e privar com o a Elsa, o André, a Joana, a Laura, o Luís e o Camacho. Obrigada a todos por terem feito com que este ano fosse repleto de alegria e companheirismo. Aprendi muito com cada um de vós, OBRIGADA. Obrigada ainda à Joana Peres pela ajuda inicial no laboratório.

Desde o início desta minha aventura académica existe uma pessoa que se tornou uma irmã, pois esteve sempre presente, tanto nos momentos bons como nos menos bons, nunca decepcionando, OBRIGADA pipoquinha (Filipa) por estes anos e pelos que ainda hão de vir, agora é para a vida. Não poderia deixar de salientar mais três pessoas incríveis que conheci na FCUL e que passaram de colegas de trabalho a Amigos, Ana Rita Jesus, Patrícia Serra e Vasco Cachatra. Obrigada “Jeitosos”!!!

Existe uma pessoa, que eu conheci no Secundário, foi minha madrinha académica e atualmente tornou-se imprescindível na minha vida, é a Vanessa. Obrigada Nessa, por estares sempre disponível, por me ouvires, por teres a palavra certa, podendo por vezes não ser a mais fácil de ouvir, mas é assim que os verdadeiros amigos são, e tu já deixaste há muito de ser amiga para seres família. Outra amiga que se tornou família, é a Claudete, obrigada pelos cafezitos, pelas conversas sobre tudo e por vezes sobre nada, obrigada pela tua amizade e por, apesar de não acreditares, seres uma pessoa muito bondosa, amiga do amigo e muito preocupada com os outros. Não posso deixar de agradecer a outros três amigos/família, à J.P., à Rita Vidal Palmiro e ao Bruno Palmiro. Obrigada Amigalhaços pela amizade, já longa, pelo apoio e compreensão, e desculpem a minha falta de disponibilidade ao longo deste ano.

Por último, e não menos importante, gostaria de agradecer à minha família, em particular aos meus pais pelo apoio e sacrifícios que têm feito, para que o meu percurso académico fosse possível, e pela educação e valores basilares transmitidos. Ao meu irmão, por ser o meu porto de abrigo, por nunca deixar de acreditar em mim e de me apoiar e por ser um exemplo de bondade e de perseverança. Obrigada à minha cunhada, ao primo Pedro, à Susana e claro aos piolhos Leonor e Afonso, com toda a sua alegria contagiante.

Resumo

A fruta e os legumes são essenciais na alimentação humana, uma vez que contêm muitos dos nutrientes essenciais à nutrição humana.

A pêra abacate (*Persea americana*) é muito consumida devido ao seu elevado valor nutricional e também por apresentar benefícios para a saúde, nomeadamente, a atividade anticancerígena, antioxidante *in vivo* e inibição da oxidação de lípidos e proteínas, o que aumenta o interesse científico na determinação da sua composição. Devido às propriedades demonstradas por este fruto e, sendo a casca da pêra abacate um importante resíduo das indústrias de processamento deste fruto, o principal objetivo deste trabalho foi a valorização destes resíduos, com vista à recuperação dos compostos de elevado valor acrescentado, nomeadamente, compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos da sua casca.

Tendo em conta que a pêra abacate foi descrita como uma mistura complexa de proteínas, açúcares, vitaminas, taninos, ácidos gordos, aminoácidos, compostos fenólicos, entre outros, as várias espécies apresentam entre si diferenças ao nível nutricional e na composição.

Neste trabalho fez-se uma decocção da casca da pêra abacate do tipo Hass e testaram-se vários métodos de purificação dos compostos fenólicos presentes no extrato. Os processos de purificação foram a diálise a pH ácido, a digestão com pepsina seguida de diálise e o método de precipitação em etanol. Este último foi o que revelou melhores resultados, permitindo obter no sobrenadante recuperado $69,28 \pm 0,71 \mu\text{g de fenóis/mg de extrato}$ e $36,96 \pm 2,79 \times 10^{-3} \mu\text{g de taninos/mg de extrato}$, valores significativamente superiores a resultados já descritos por outros processos mais complicados de extração de compostos fenólicos e com maior impacto ambiental.

Para o sobrenadante recuperado por este processo de purificação foi analisada a sua atividades antioxidante na capacidade de extinção do radical DPPH $Ec_{50} = 51,45 \pm 1,09 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, na capacidade de inibição da peroxidação lipídica TBARS = $451,3 \pm 0,041 \mu\text{g/mL}$, na capacidade de eliminação do óxido nítrico $NO = 110,49 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ e na atividade inibitória da *acetilcolinesterase* $IC_{50} = 2602,01 \pm 2,62 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$. Foi também feito o estudo da citotoxicidade, em linhas celulares humanas do cancro do fígado, HepG-2, do extrato, do sobrenadante e do precipitado, tendo-se considerado que estes não eram tóxicos.

A identificação dos compostos bioativos presentes no extrato da casca da pêra abacate foi feita com recurso a LC-MS e HPLC-DAD. Os compostos fenólicos identificados foram: o ácido quínico, a epicatequina, o ácido glucónico, a procianidina B, a procianidina C, o dímero da etil-epicatequina, a quercetina di-hexose e a quercetina – *O*-hexose-*O*-pentose, o 7-Glucosilo-11-metil-oleosido e o ácido 3,4,5-Tri-*O*- galoilquínico, sendo os maioritários presentes o ácido glucónico, o ácido quínico, a procianidina B e a epicatequina.

A quantificação de ácido glucónico e epicatequina presentes no sobrenadante foi efetuado sendo de $673,7 \mu\text{g de ácido glucónico/mg de extracto}$ e $6,50 \mu\text{g de epicatequina/mg de extracto}$, respetivamente. Foi ainda analisada a contribuição dos compostos maioritários presentes no sobrenadante para as atividades biológicas demonstradas. O ácido glucónico contribui para a capacidade de extinção do radical

DPPH do sobrenadante em 0,6 %, 22,1 % para a inibição da peroxidação lipídica pelo método dos TBARS e 7,8% para a eliminação do NO. Quanto à epicatequina a percentagem de contribuição para a capacidade de extinção do radical DPPH é de 5 %, 0,21 % para a inibição da peroxidação lipídica pelo método dos TBARS e 0,4 % para a eliminação do NO.

É possível concluir que foi com este trabalho foi conseguido implementar com sucesso um processo de recuperação dos compostos naturais bioativos da casca da pêra abacate para a valorização de um resíduo. Os compostos fenólicos recuperados revelaram ser poderosos antioxidantes e apresentar uma baixa toxicidade e a sua identificação e quantificação torna-se extremamente importante no sentido de caracterizar quimicamente a mistura de compostos recuperados e perspetivar outras potencialidades de aplicação destes compostos de elevado valor acrescentado.

Palavras chave: pêra abacate, LC-MS, compostos fenólicos, atividade antioxidante, valorização de resíduos.

Abstract

Fruit and vegetables are essential in human nutrition, since it contains numerous essential nutrients for human nutrition.

The avocado (*Persea americana*) is much consumed due to its nutritional value and also because it has health benefits, including anticancer activity, *in vivo* antioxidant and inhibition of lipid and protein oxidation, which increases the scientific interest in determining its composition. Due to the properties evidenced by the avocado and because its peel is an important waste of the processing fruit industry, the main objective of this work was the valorization of such waste for the recovery of compounds of high added value, in particular phenolic compounds present in the aqueous extracts of the peel.

Although the avocado has been described as a complex mixture of proteins, sugars, vitamins, tannins, fatty acids, amino acids, phenolic compounds, among others. Different species of avocado have differences in nutritional value and in chemical composition.

In this work an infusion of type Hass avocados peel was prepared and several methods for purification were applied for the recovery of the phenolic compounds present in the extract. The purification procedures tested were dialysis at acid pH, the digestion with pepsin followed by dialysis and ethanol precipitation method. This latter has showed better results allowing to obtain in the recovered supernatant $69.28 \pm 0.71 \mu\text{g}$ of phenols/ mg of extract and $36.96 \pm 2.79 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ of tannins /mg of extract, these were significantly higher values than the results previously described in the literature using more complicated processes of extraction of phenolic compounds and with more environmental impact.

The supernatant recovered by this purification process was analyzed and the antioxidant activities determined were the capacity of radical DPPH extinction $Ec_{50} = 51.45 \pm 1.09 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, the capacity of lipid peroxidation inhibition $TBARS = 451.13 \pm 0.041 \mu\text{g/mL}$, the capacity of nitric oxide elimination $NO = 110.49 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ and the acetylcholinesterase inhibitory activity $IC_{50} = 2602.01 \pm 2.62 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$. It was also studied the cytotoxicity against human liver cancer cell line of HepG-2 of the extract, the supernatant and the precipitate obtained in the purification, which revealed not to be toxic.

The identification of bioactive compounds present in the extract of avocado peel was accomplished by LC-MS and HPLC-DAD. The phenolic compounds identified were: quinic acid, epicatechin, gluconic acid, procyanidin B, procyanidin C, epicatechin-ethyl dimer, quercetin dihexose, quercetin-O-hexose-O-pentose, 7-glucosyl-11-methyl-oleosid and 3,4,5-tri-O-galailquinic acid, the major compounds presents were gluconic acid, quinic acid, procyanidin B and epicatechin.

Quantification of gluconic acid and epicatechin in the supernatant was performed and $673.7 \mu\text{g}$ of gluconic acid/mg of extract and $6.50 \mu\text{g}$ of epicatechin/mg of extract were determined, respectively.

It was also analyzed the contribution of the major compounds present in the supernatant to the exhibited biological activities. The gluconic acid contributes to the capacity of radical DPPH extinction in 0.6%, 22.1% to lipid peroxidation inhibition by the TBARS method and 7.8 % for NO elimination. Concerning epicatechin the percentage of contribution to the DPPH radical

extinction capacity was 5 %, 0.21 % for lipid peroxidation inhibition by TBARS method and 0.4% for NO elimination.

In conclusion, in this work it was successfully implemented a process for the recovery of bioactive natural compounds from avocado peel for this waste valorization. The recovered phenolic compounds revealed to be powerful antioxidants with low toxicity therefore its identification and quantification was extremely important in order to chemically characterize the recovered mixture of compounds and to predict potential applications of these high added value compounds.

Keywords: Avocado, LC-MS, phenolic compounds, antioxidant activity, waste valorization.

Índice de Figuras

Figura 1 - <i>Persea americana</i> - pêra abacate ^[5]	3
Figura 2 – Classificação dos compostos fenólicos	5
Figura 3 - Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos (a) e hidroxibenzóicos (b)	5
Figura 4 - Estrutura dos flavonóides	6
Figura 5 - Estruturas químicas e produtos de consumo contendo as diferentes classes de flavonóides	7
Figura 6 - Estrutura do tanino gálico β -1,2,3,4,6-pentagalhoil- <i>O</i> -D-glucopiranosose (Pentagalhoilglucose, PGG).....	8
Figura 7 – Proantocianidina do tipo B (dímero de catequinas). Pode ser encontrada em cerveja, pêssego e cebola.	9
Figura 8 - Estrutura química do sesamol.....	9
Figura 9 -Estrutura química do Resveratrol	9
Figura 10 – Esquema representativo de algumas das principais reações que envolvem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS). ^[33]	10
Figura 11 - Principais causas e consequências da ação dos radicais livres ^[34]	11
Figura 12 – Esquema do aumento de ACh com IChE ^[37]	12
Figura 13 -Esquema dos componentes do espectrómetro de massa ^[46]	15
Figura 14 - O ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor, em meio alcalino, a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, formando-se também ácido aldônico. ^[56]	23
Figura 15 - Componentes básicos do FTIR	26
Figura 16 – Perfil cromatográfico do extrato 1 (1 mg/mL), obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (<i>Persea americana</i>). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.1. A - $t_r=2,3$; B - $t_r=6,5$; C - $t_r=7,4$; D - $t_r=8,4$	32
Figura 17 - Perfil cromatográfico do extrato 2 (1 mg/mL), obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (<i>Persea americana</i>). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.1 A - $t_r=2,3$; B - $t_r=6,5$; C - $t_r=7,4$; D - $t_r=8,4$	32
Figura 18 - Perfil cromatográfico do extrato 3 (1 mg/mL), obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (<i>Persea americana</i>). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.1. A - $t_r=2,3$; E - $t_r=7$; F - $t_r=7,9$; G - $t_r=8,8$	32
Figura 19 – Espectros UV-Vis dos compostos maioritários do extrato 1. a) $t_r= 2,3$; b) $t_r= 6,5$; c) $t_r= 7,4$; d) $t_r=8,4$	34
Figura 20 - Espectros UV-Vis dos compostos maioritários do extrato 2. a) $t_r= 2,3$; b) $t_r= 6,5$; c) $t_r= 7,4$; d) $t_r=8,4$	34
Figura 21 - Espectros UV-Vis dos compostos maioritários do extrato 3. a) $t_r= 2,3$; b) $t_r= 7$; c) $t_r= 7,9$; d) $t_r=8,8$	34
Figura 22 – a) Comparação dos fenóis presentes nos diferentes extratos. O procedimento para a quantificação dos fenóis é o descrito em 2.2.3.1. b) Comparação dos taninos presentes nos diferentes extratos. O procedimento aplicado para a quantificação dos taninos é o descrito em 2.2.3.2.....	35

Figura 23 – Capacidade de extinção do DPPH para concentrações crescentes dos extratos, pelo método 2.2.4.1. a) Extrato 1; b) Extrato 2; c) Extrato 3.	37
Figura 24 - Correlação entre a % de Taninos presente no cálculo de fenóis totais e a atividade antioxidante (EC_{50}) dos extratos.	38
Figura 25 - Perfil cromatográfico do dialisado do extrato 1 (1 mg/mL), obtido por HPLC. O método usado no HPLC é o descrito em 2.2.6.2.	40
Figura 26 - Perfil cromatográfico do extrato 1 com pepsina (1 mg/mL), obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (<i>Persea americana</i>). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.2	42
Figura 27 - Perfil cromatográfico do dialisado com pepsina (1 mg/mL), obtido por HPLC. O método usado no HPLC é o descrito em 2.2.6.2.	42
Figura 28 - Perfil cromatográfico do sobrenadante do extrato 3 da casca da pêra abacate (1 mg/mL), obtido por HPLC. O método usado no HPLC é o descrito em 2.2.6.2	44
Figura 29 - Perfil cromatográfico do precipitado do extrato 3 da casca da pêra abacate (1 mg/mL), obtido por HPLC. O método usado no HPLC é o descrito em 2.2.6.2	44
Figura 30 - a) Comparação dos fenóis presentes no extrato 3, no precipitado e no sobrenadante. O procedimento para a quantificação dos fenóis é o descrito em 2.2.3.1. b) Comparação dos taninos presentes no extrato 3, no sobrenadante e no precipitado. O procedimento aplicado para a quantificação dos taninos é o descrito em 2.2.3.2.	44
Figura 31 - Capacidade de extinção do DPPH para concentrações crescentes das amostras pelo método 2.2.4.1. a) Extrato 3; b) Sobrenadante.	47
Figura 32 - Capacidade de inibição da peroxidação lipídica para concentrações crescentes das amostras, pelo método 2.2.4.2. a) Extrato 3; b) Sobrenadante..	48
Figura 33 - Capacidade de inibição do NO para concentrações crescentes das amostras, pelo método 2.2.4.3. a) Extrato 3; b) Sobrenadante.	49
Figura 34 - Capacidade de inibição da AChE para concentrações crescentes das amostras, pelo método 2.2.4.4. a) Extrato 3; b) Sobrenadante.	49
Figura 35 - Comparação da capacidade antioxidante das amostras, nos diferentes métodos de cálculo da atividade antioxidante. a) método do DPPH – EC_{50} , descrito em 2.2.4.1; b) método da peroxidação lipídica – TBARS, descrito em 2.2.4.2; c) método da captura do óxido nítrico – NO, descrito em 2.2.4.3; d) método da atividade inibitória da acetilcolinesterase – IC_{50} , descrito em 2.2.4.4.	50
Figura 36 - % de citotoxicidade apresentada pelas amostras, pelo método 2.2.5 a) Extrato 3; b) Sobrenadante; c) Precipitado.	51
Figura 37 – Comparação dos valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para cada uma das amostras.	52
Figura 38 - Tipos de modos vibracionais.	53
Figura 39 – Sobreposição dos espectros de IV das três amostras, obtidos por FTIR. O método usado no FTIR está de acordo com o descrito em 2.2.6.1. a) Extrato 3 b) Sobrenadante c) Precipitado.	54
Figura 40 - Perfil cromatográfico do sobrenadante (1mg/mL) , obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (<i>Persea americana</i>). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.2.	56

Figura 41 – Ácido Glucónico	59
Figura 42 – Espectro UV-Vis do ácido glucónico. a) padrão do ácido glucónico; b) ácido glucónico presente no sobrenadante.	59
Figura 43 – Dímero epicatequina-etilo.....	60
Figura 44 – Ácido 3,4,5-Tri-O-galoilquínico.....	61
Figura 45 – Ácido Quínico	61
Figura 46 - Espectro UV-Vis do ácido quínico. a) padrão do ácido quínico; b) ácido quínico presente no sobrenadante.....	62
Figura 47 – a) Procianidina B; b) Procianidina C	63
Figura 48 - 7-Glucosilo-11-metil-oleosido.....	63
Figura 49 - Epicatequina.....	64
Figura 50 - Espectro UV-Vis da epicatequina. a) padrão da epicatequina; b) epicatequina presente no sobrenadante.....	64
Figura 51 – a) Quercetina – <i>O</i> -hexose- <i>O</i> -pentose; b) Quercetina di-hexose.....	65
Figura 52 – a) Espectro UV-Vis da quercetina di-hexose; b) Espectro UV-Vis da quercetina – <i>O</i> -hexose- <i>O</i> -pentose.	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação científica da <i>Persea americana</i> ^[6]	3
Tabela 2 – Fenóis Totais, Taninos e EC_{50} dos extratos de <i>Persea americana</i> Hass (pêra abacate). O método de doseamento dos fenóis totais usado é o descrito no ponto 2.2.4, o dos taninos está de acordo com o descrito em 2.2.5 e o da atividade antioxidante, EC_{50} , está de acordo com o descrito em 2.2.6.	37
Tabela 3 – Proteínas e açúcares presentes nos extratos 2 e 3. O doseamento de proteínas foi feito de acordo com o procedimento descrito em 2.2.3.3 e o doseamento de açúcares com o procedimento apresentado em 2.2.3.4.	38
Tabela 4 - Fenóis totais, taninos e EC_{50} presentes no Extrato 1, no interior da manga de diálise e no dialisado. O método de doseamento dos fenóis totais usado é o descrito no ponto 2.2.3.1, o dos taninos está de acordo com o descrito em 2.2.3.2 e a da atividade antioxidante, EC_{50} , está de acordo com o descrito em 2.2.4.1. O N.D. significa não definido.	39
Tabela 5 - Fenóis totais, taninos e EC_{50} presentes no Extrato 1, no extrato 1 com pepsina, após a diálise com pepsina e no dialisado com pepsina. O método de doseamento dos fenóis totais usado é o descrito no ponto 2.2.3.1, o dos taninos é o apresentado em 2.2.3.2 e o EC_{50} da atividade antioxidante, DPPH, apresentado em 2.2.4.1. N.D. significa não definido.	41
Tabela 6 - Valores obtidos para o cálculo da razão entre a área dos picos existentes no extrato 1 inicial e dos existentes no dialisado e no dialisado com pepsina. N.Q. significa não quantificado.	43
Tabela 7 - Fenóis totais, taninos e EC_{50} presentes no Extrato 3, no precipitado e no sobrenadante. O método de doseamento dos fenóis totais usado é o descrito no ponto 2.2.3.1, o dos taninos é o apresentado em 2.2.3.2 e o EC_{50} da atividade antioxidante, DPPH, apresentado em 2.2.4.1.	43
Tabela 8 - Valores obtidos para o cálculo da razão entre a área dos picos existentes no extrato 3 inicial e dos existentes no sobrenadante e no precipitado. N.Q. significa não quantificado.	46
Tabela 9 – Atividade antioxidante do extrato 3, do precipitado e do sobrenadante. O método utilizado para o cálculo do EC_{50} encontra-se de acordo com o descrito em 2.2.6. O método utilizado no cálculo do IC_{50} está descrito no ponto 2.2.9. O método utilizado no cálculo dos TBARS está de acordo com o descrito em 2.2.10. O método utilizado no cálculo dos NO está descrito no ponto 2.2.11. N.D. significa não definido.	50
Tabela 10 – Citotoxicidade, nas células HepG-2, do extrato 3, do precipitado e do sobrenadante. O método utilizado é o que se encontra descrito no ponto 2.2.14.	52
Tabela 11 – Grupos funcionais presentes nas amostras e o número de onda correspondente.	55
Tabela 12 - Identificação dos compostos presentes no sobrenadante do extrato da casca da pêra abacate (<i>Persea americana</i>), do tipo Hass.	57

Tabela 13 - Atividade antioxidante do padrão do Ácido Glucónico. O método utilizado para o cálculo do EC_{50} está de acordo com o descrito em 2.2.6. O método utilizado no cálculo dos TBARS está de acordo com o descrito em 2.2.10. O método utilizado no cálculo dos NO está descrito no ponto 2.2.11.....	60
Tabela 14 - Atividade antioxidante do padrão do Ácido Quínico. O método utilizado para o cálculo do EC_{50} está de acordo com o descrito em 2.2.6. O método utilizado no cálculo dos TBARS está de acordo com o descrito em 2.2.10. O método utilizado no cálculo dos NO está descrito no ponto 2.2.11.....	62
Tabela 15 – Atividade antioxidante do padrão de epicatequina. O método utilizado para o cálculo do EC_{50} está de acordo com o descrito em 2.2.6. O método utilizado no cálculo dos TBARS está de acordo com o descrito em 2.2.10. O método utilizado no cálculo dos NO está descrito no ponto 2.2.11.....	64
Tabela 16 – Quantidade dos compostos presentes no sobrenadante da <i>Persea americana</i> e a sua contribuição biológica. N.D. significa não definido.	66

Abreviaturas

Abs	Absorvância
AChE	Acetilcolinesterase
ACh	acetilcolina
BHA	butil-hidroxi-anisol
BHT	butil-hidroxi-tolueno
BSA	Albumina do soro bovino
DA	Doença de Alzheimer
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNS	3,5-dinitrosalicilato
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5' – dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
EC	Energia de colisão
EC ₅₀	Concentração eficiente, correspondente a 50% de extinção do radical
FBS	Soro Fetal de Bovino
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
h	horas
HPLC - DAD	<i>High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detetor de Diodo-Array
IACHe	Inibidores da Acetilcolinesterase
IC ₅₀	Concentração inibitória correspondente a 50% de inibição
IV	Infravermelho
LC-MS	<i>Liquid Chromatography with Mass Spectrometry</i> - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa
min	minutos
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difenil-tetrazólio
N.D.	Não definido
N.Q.	Não quantificado
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> – Ressonância Magnética Nuclear
OMS/FAO	Organização Mundial de Saúde/Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
PBS	Tampão Fosfato Salino
Pen-Strep	<i>Penicillin Streptomycin mixture</i>
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SND	Sodium Nitroprusside dihydrate
TBA	Ácido 2-Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tiocloroacético
t _r	Tempo de Retenção

Índice	
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xiii
Abreviaturas.....	xv
I – Introdução.....	1
1.1 <i>Persea americana</i>	3
1.2 Compostos Fenólicos	4
1.2.1 Ácidos Fenólicos.....	5
1.2.2 Flavonóides	6
1.2.3 Taninos.....	7
1.2.3.1 Taninos Hidrolisáveis.....	8
1.2.3.2 Taninos Condensados	8
1.2.4 Outros Compostos Fenólicos	9
1.3 Propriedades Antioxidantes dos Compostos Fenólicos.....	9
1.4 Métodos Cromatográficos para Identificação e Quantificação de Compostos numa Amostra	13
1.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detetor de Diodo-Array - HPLC-DAD	13
1.4.2 Espectrometria de Massa – MS	14
II – Materiais e Métodos	17
2.1 Materiais	19
2.1.1 Reagentes	19
2.1.2 Aparelhos	19
2.2 Métodos.....	20
2.2.1 Preparação dos Extratos da Casca da Pêra Abacate.....	20
2.2.2 Purificação dos Extratos.....	20
2.2.2.1 Diálise a pH Ácido.....	20
2.2.2.2 Digestão Gástrica com Pepsina Seguida de Diálise Ácida	21
2.2.2.3 Precipitação em Etanol	21
2.2.3 Doseamentos	21
2.2.3.1 Doseamento dos Fenóis Totais	21
2.2.3.2 Doseamento de Taninos	22
2.2.3.3 Doseamento de Proteínas.....	22

2.2.3.4 Doseamento de Açúcares	22
2.2.4 Atividade Antioxidante	23
2.2.4.1 Método de Extinção do Radical DPPH ^[57]	23
2.2.4.2 Peroxidação de Lípidos	24
2.2.4.3 Captura do Óxido Nítrico (NO)	24
2.2.4.4 Atividade Inibitória da Acetilcolinesterase - AchE	25
2.2.5 Citotoxicidade nas Células HepG-2 ^[62]	25
2.2.6 Identificação e Quantificação dos Compostos	26
2.2.6.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR... ..	26
2.2.6.2 HPLC - DAD	26
2.2.6.3 LC-MS ⁿ	27
2.3 Análise Estatística.....	27
III – Resultados e Discussão	xx
3.1 Caracterização dos extratos aquosos da pêra abacate.....	31
3.2 Purificação dos extratos.....	39
3.2.1 Diálise a pH Ácido	39
3.2.2 Digestão Gástrica com Pepsina Seguida de Diálise a pH Ácido.	40
3.2.2 Precipitação com Etanol	43
3.3 Atividade antioxidante.....	46
3.4 Citotoxicidade	51
3.5 Identificação dos Compostos.....	53
3.5.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR.....	53
3.5.2 Espetrometria de Massa - MS.....	56
3.5.2.1 Ácido Glucónico	59
3.5.2.2 Dímero epicatequina-etilo	60
3.5.2.3 Ácido 3,4,5-Tri- <i>O</i> -galoilquínico	61
3.5.2.4 Ácido Quínico	61
3.5.2.5 Procianidinas B e C.....	63
3.5.2.6 7-Glucosilo-11-metil-oleosido.....	63
3.5.2.7 Epicatequina.....	64
3.5.2.8 Quercetina di-hexose e Quercetina – <i>O</i> -hexose- <i>O</i> -pentose.....	65
3.5.3 Relevância dos compostos identificados.....	66
IV – Conclusão e Perspetivas Futuras	67
V – Bibliografia	71
VI – Anexos.....	79
A.1 - Curva de calibração dos fenóis	81
A.2 - Curva de calibração dos Taninos	82

A.3 - Curva de calibração das Proteínas	83
A.4 - Curva de calibração dos Açúcares	84
A.5 - Espectros de massa dos compostos identificados e respetiva fragmentação	85

I – Introdução

A sociedade tem demonstrado ao longo dos anos preocupações ao nível do desperdício alimentar, nomeadamente nos grandes centros urbanos, isto deve-se não só a questões ambientais, económicas como também morais, pois não é aceitável que ainda haja pessoas a passar fome, no mundo inteiro, e por outro lado se continue a desperdiçar alimentos.

Outra preocupação prende-se com questões ao nível da saúde, a OMS/FAO (Organização Mundial da Saúde/ Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) lançou uma iniciativa em 2003 que visava promover o consumo de frutas e vegetais devido aos benefícios apresentados para a saúde, uma vez que 1,7 milhões (2,8%) das mortes no mundo são atribuídas ao baixo consumo de fruta e vegetais. Assim sendo, o consumo de fruta e vegetais fazem parte de uma dieta saudável cujo consumo diário apresenta benefícios para a saúde, nomeadamente na prevenção de doenças cardiovasculares e alguns cancros.^[1]

Algumas frutas, por possuírem altos teores de compostos fenólicos e expressiva atividade de captação de radicais livres, ganham importância não somente pelos benefícios proporcionados à saúde, mas também pelo potencial de utilização em alimentos,^[2] sendo que têm sido muito utilizadas nas indústrias processadoras de alimentos, cosmética^[3] e na indústria farmacêutica^[4].

Os resíduos do processamento das frutas são um problema ambiental e por serem ricos neste tipo de compostos^[4] tornam-se um alvo interessante no sentido da valorização destes resíduos para extração destes compostos de elevado valor acrescentado.

1.1 *Persea americana*

A pêra abacate (*Persea americana*) é um fruto tropical com diversas variedades, a mais comum é a Hass.^[2] A sua classificação científica é a seguinte:

Tabela 1 - Classificação científica da *Persea americana*^[6]

Reino	Plantae
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem	<i>Laurales</i>
Família	<i>Lauraceae</i>
Género	<i>Persea</i>
Espécie	<i>P. americana</i>
Nome binominal	<i>Persea americana</i>



Figura 1- *Persea americana* - pêra abacate^[5]

O consumo da pêra abacate na sua maioria dá-se como fruta fresca, contudo nos últimos anos tem-se feito grandes esforços para expandir a oferta e variedade dos produtos provenientes deste fruto.

A pêra abacate, é um fruto rico em ácidos gordos insaturados, fibras, vitaminas B e E, e outros nutrientes.^[2] dadas as suas propriedades, estudos demonstram o seu potencial anti

cancerígeno, devido à presença de carotenoides^[6] e também que esta fruta é uma fonte de antioxidantes naturais, podendo eliminar os radicais livres.^[7]

A casca e sementes, são dois dos produtos da pêra abacate que não têm uso comercial, contudo existem alguns estudos que verificaram a presença de compostos fenólicos e uma elevada capacidade antioxidante.^[6] A casca contém um elevado número de procianidinas do tipo B e do tipo A, em menor número.^[6] Outro estudo demonstrou a presença de compostos fenólicos na casca, as catequinas e outros flavonoides, os ácidos hidrobenczoicos, ácidos hidrocinâmicos, flavenoides e procianidinas, este ultimo é o mais abundante.^[10]

1.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são uma grande família de metabolitos secundários sintetizados pelas plantas e, conseqüentemente, estão presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal. Estes compostos são sintetizados pelas plantas de forma a protegerem-se de agentes patogênicos e predadores^[9]. Os polifenóis são responsáveis pelas características organolépticas, nomeadamente o sabor, cor, odor, estabilidade oxidativa.^[10] e ainda pelas características sensoriais das plantas e frutas.^[11]

Atualmente, já foram identificados milhares de polifenóis naturais, apesar de só alguns estarem presentes em níveis significativos na dieta alimentar.^[12] O interesse nos polifenóis presentes na fruta, legumes e nas bebidas derivadas das plantas (cerveja, vinho e chá) tem vindo a aumentar nos últimos anos. Este aumento, deve-se aos diferentes estudos biológicos que têm sido feitos aos polifenóis, tendo-lhes sido atribuídas várias propriedades biológicas benéficas como a ação anti-cancerígena,^[13] anti-oxidante,^[14] anti-alérgica^[15] e anti-bacteriana.^[16]

De uma forma geral, estes podem proteger os constituintes celulares da sua oxidação e assim limitar o risco de várias doenças associadas à degeneração por oxidação.^[17]

Os compostos fenólicos podem ser classificados pela sua estrutura de origem, pela sua função biológica e pela sua natureza química. Quimicamente, os polifenóis que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo apresentando assim uma diversidade estrutural, podendo ser desde moléculas fenólicas simples a polímeros de elevado peso molecular, englobando assim uma vasta gama de substâncias, entre elas os ácidos fenólicos, os quais, devido à sua composição química, possuem propriedades antioxidantes.^[18]

Os compostos fenólicos podem ser divididos em classes de acordo com o número de anéis fenólicos que possuem e das estruturas que ligam estes anéis entre si. Deste modo, tal como representado na figura 2, estes podem ser classificados em diferentes subgrupos.^[19]

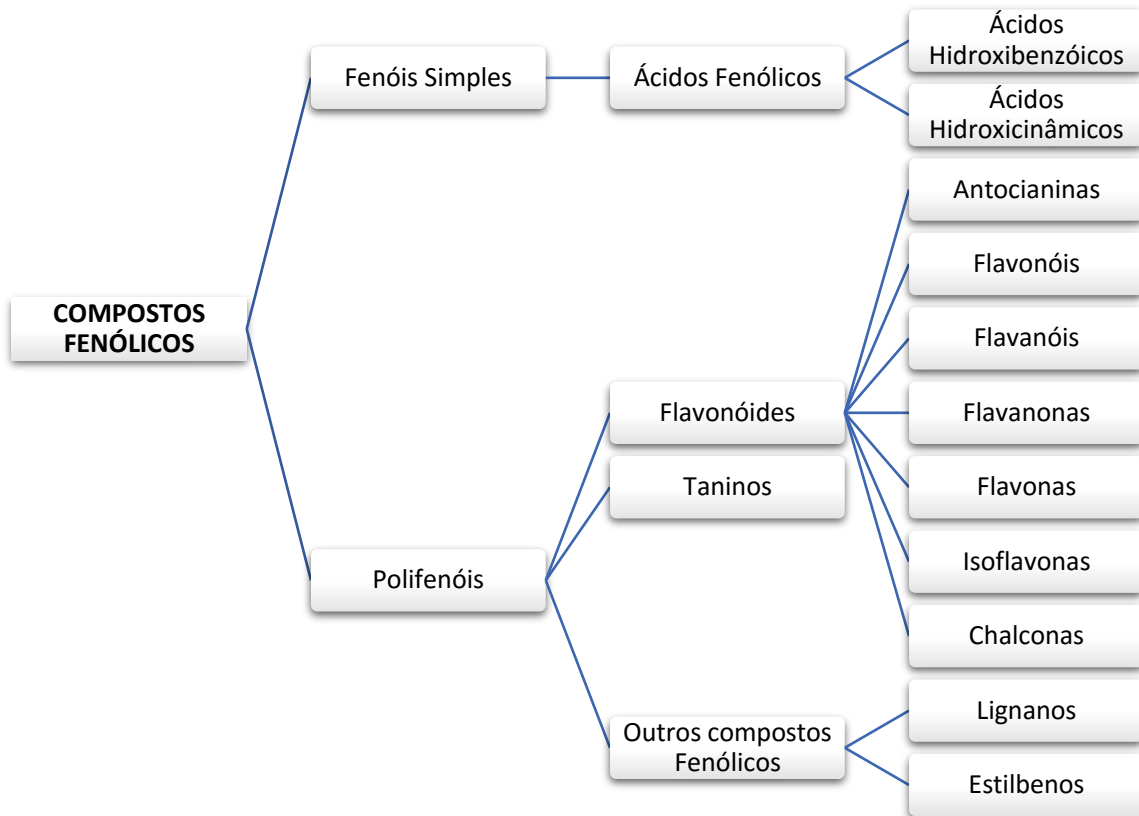


Figura 2 – Classificação dos compostos fenólicos

1.2.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são caracterizados por terem um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metóxilo. Este grupo pode ainda ser dividido em dois: os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. Embora o esqueleto básico seja o mesmo, os números e posições dos hidroxilos no anel aromático favorecem a variedade dos compostos.

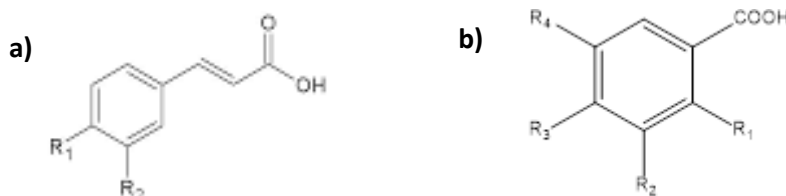


Figura 3 - Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos (a) e hidroxibenzóicos (b).

$R_1 = \text{OH}$ Ácido *p*-cumárico
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$ Ácido caféico
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3$ Ácido ferúlico

$R_1 = \text{OH}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ Ácido salicílico
 $R_1 = R_4 = \text{H}; R_3 = R_2 = \text{OH}$ Ácido protocatequínico
 $R_1 = \text{H}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$ Ácido gálico

O ácido caféico é o mais abundante dos ácidos fenólicos, cerca de 75 a 100% do teor total de ácidos hidroxicinâmicos em frutas. Encontra-se maioritariamente na fruta, podendo, no entanto, estar presente noutras partes da planta.^[20] Diversos estudos reportam que as cascas da fruta contêm muitos ácidos fenólicos livres.^{[6], [7]}

1.2.2 Flavonóides

Os flavonóides são os polifenóis mais relevantes nos alimentos, sendo também os mais diversificados estruturalmente. Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular, constituídos por quinze átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆. A estrutura destes compostos compreende dois anéis aromáticos, anel A e B, que são unidos por três carbonos formando um anel heterocíclico pirano, o anel C (Figura 4).

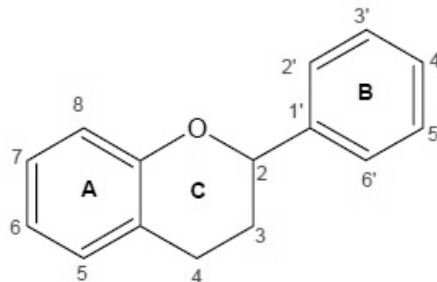


Figura 4 – Esqueleto base da estrutura dos flavonóides

Os flavonóides constituem a família de polifenóis mais abundante nos alimentos. As diferentes classes de flavonóides diferem entre si no grau de oxidação e no padrão de substituição do anel C, contudo em cada classe, os compostos também diferem entre si no número e posição de grupos hidroxilo, metoxilo e glicosilo. (Figura 5)

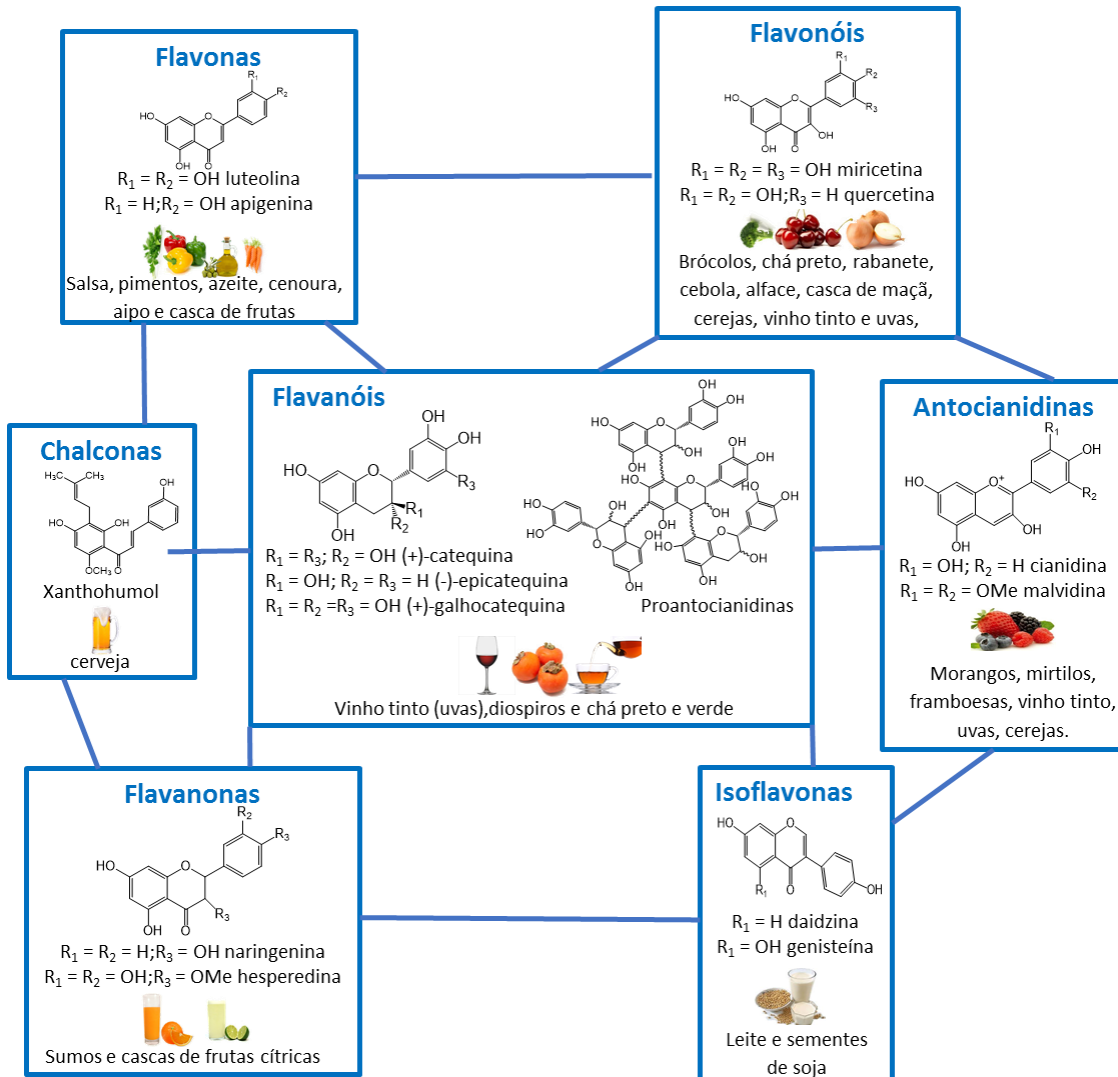


Figura 5 - Estruturas químicas e produtos de consumo contendo as diferentes classes de flavonóides

Os flavonóides são bastante conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes. As suas propriedades químicas que determinam o seu potencial de neutralizar os radicais livres e/ou a sua capacidade antioxidante, foram pela primeira vez descritos por Bors, *et al*, 1990 [21]

1.2.3 Taninos

A definição fitoquímica de tanino foi proposta por Bate-Smith, EC e Swain, T., 1962: “*todos os compostos fenólicos solúveis em água, com um peso molecular situado entre 500 e 3000 Da, cujas principais propriedades (para além das reacções características dos compostos fenólicos) são a de formarem complexos insolúveis com os alcalóides, gelatina e outras proteínas*”. [22]

Os taninos são encontrados em muitas frutas, uma das suas principais características é o elevado peso molecular. [18] Desde 1962, tem-se descoberto taninos com elevado peso molecular, na ordem das dezenas de milhares de Dalton. [23]

Os taninos são divididos em dois grandes grupos: os taninos condensados (proantocianidinas), que são oligómeros de catequinas ligados por ligações C-C; e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres de monossacáridos com ácido gálico ou oligómeros de ácido gálico/elágico.

1.2.3.1 Taninos Hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são, como o nome indica, passíveis de serem degradados por hidrólise química ou enzimática nas várias unidades estruturais que os compõem. São constituídos normalmente por glucose, mas também por ácido quínico, outros fenóis e outros glicósidos, e por uma parte fenólica (é o caso do ácido gálico) ligados através de uma ligação éster. ^[24]

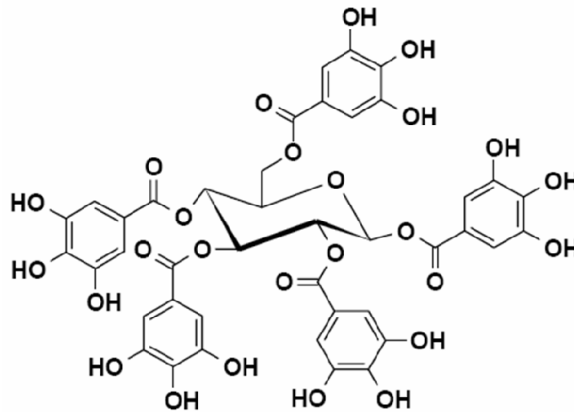


Figura 6 - Estrutura do tanino gálico β -1,2,3,4,6-pentagalhoil-*O*-D-glucopiranoose (Pentagalhoilglucose, PGG)

Os taninos hidrolisáveis estão presentes sobretudo nas partes não comestíveis das plantas, cuja função é de proteção a agentes externos (insetos e alterações climáticas). No entanto, estes compostos podem ser introduzidos na dieta alimentar devido a operações tecnológicas de transformação dos alimentos. ^[18]

1.2.3.2 Taninos Condensados

Os taninos condensados (proantocianidinas), são mais frequentes na alimentação do que os taninos hidrolisáveis uma vez que se encontram em maiores quantidades nos alimentos, como é o caso do chocolate, das frutas (uvas, maçãs, entre outros) e bebidas derivadas. ^[25]

Quimicamente, estes são polímeros constituídos por duas ou mais unidades de flavanóis, que quando aquecidos em meio ácido originam antocianidinas (reação de *Bate-Smith*), daí que também sejam conhecidos por proantocianidinas.

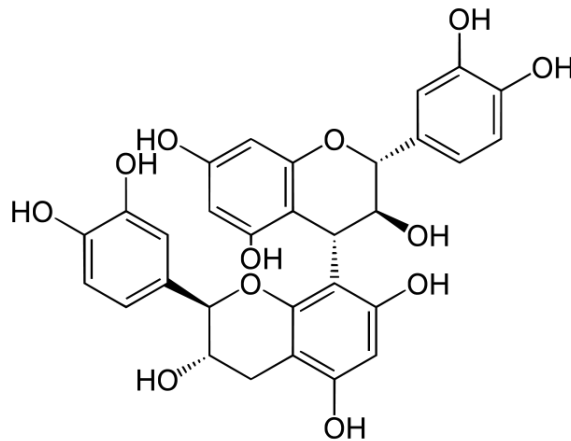


Figura 7 – Proantocianidina do tipo B (dímero de catequinas). Pode ser encontrada em cerveja, pêssego e cebola.

1.2.4 Outros Compostos Fenólicos

Os Lignan são produzidos por dimerização oxidativa de duas unidades de fenilpropano, que estão na sua maioria presentes na natureza sob a forma livre, um dos exemplos é o sesamol.

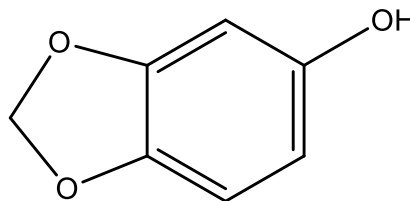


Figura 8 - Estrutura química do sesamol

Os estilbenos encontram-se presentes na dieta humana em pequenas quantidades, sendo o composto fenílico principal o resveratrol. Este composto é produzido pelas plantas em resposta a infecções por agentes patogênicos ou quando sujeitas a diversas situações de stresse.

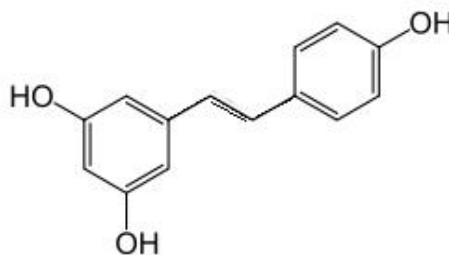


Figura 9 -Estrutura química do Resveratrol

1.3 Propriedades Antioxidantes dos Compostos Fenólicos

Mais de 8000 estruturas fenólicas são atualmente conhecidas e entre elas mais de 4000 flavonoides foram identificados, como sendo fortes antioxidantes. ^[26]

Existe uma relação direta entre a atividade antioxidante dos compostos fenólicos e a sua estrutura química, ^[27] dependendo do arranjo dos grupos funcionais quanto à estrutura nuclear. ^[28]

Os compostos fenólicos provenientes das plantas protegem-nas dos ataques aos seus tecidos, contra a ação de subprodutos provenientes da fotossíntese que possam causar danos,

assim sendo os antioxidantes vão operar por diversos mecanismos de forma atuarem contra o ataque de radicais livres ^[29]. Um radical livre pode ser um átomo ou uma molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados, isto é, tem orbitais com apenas um elétron, ^[30] sob esta forma o composto apresenta elevada reatividade com a maioria das espécies químicas, estando assim suscetível a causar danos oxidativos nas biomoléculas, tais como os lípidos, hidratos de carbono, proteínas, e ácidos nucleicos, podendo provocar morte celular. ^[14]

Os radicais livres derivados de oxigénio são genericamente conhecidos como espécies reativas de oxigénio (ROS) e representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo. ^[31] A peroxidação lipídica iniciada pelas ROS, com a produção de radicais peróxido e lipídicos, são coletivamente designadas por reações de propagação em cadeia e, se não forem travadas, podem provocar danos potencialmente muito superiores aos ROS que iniciaram a reação. ^[32] (Figura 10)

Também é importante salientar que existem radicais que contêm azoto designados espécies reativas de azoto (RNS). O principal RNS é o óxido nítrico (NO). Apesar do NO ser abundante no organismo como molécula de sinalização numa grande variedade de processos fisiológicos, tais como: neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa e regulação da resposta imunitária. ^[34] O NO produz peroxinitrito (ONOO^-) que é um potente oxidante que ataca uma grande variedade de alvos biológicos. (Figura 10) ^[33]

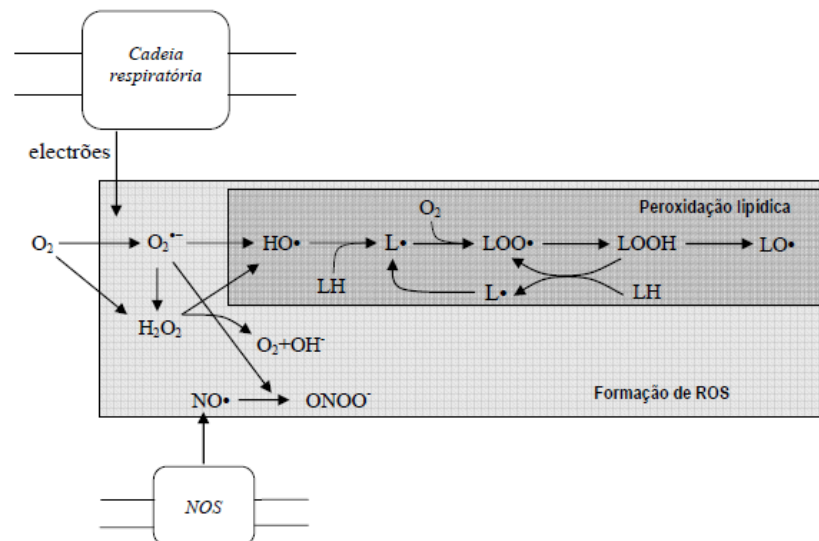


Figura 10 – Esquema representativo de algumas das principais reações que envolvem espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS). ^[33]

O equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é essencial para o funcionamento normal do organismo. Quando o equilíbrio tende para a produção de radicais livres diz-se que o organismo se encontra em *stress* oxidativo. Tal como referido, radicais livres em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, inibindo a sua função normal o que poderá potenciar várias doenças. ^[33]

A exposição dos organismos a radicais livres levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa endógenos para os eliminar. Estas defesas são a resposta da evolução à inevitabilidade da existência de ROS em condições aeróbias. Alguns produtos naturais com atividade antioxidante, podem auxiliar o sistema protetor endógeno. Assim sendo, os antioxidantes

presentes na nossa dieta assumem grande relevância como possíveis agentes protetores, reduzindo os danos oxidativos.^[33]

Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo.^[34] Quando ocorre uma produção excessiva de ROS ou uma deficiência nas defesas antioxidantes, existe um desequilíbrio, que é designado de *stress* oxidativo. Nesta situação, os radicais em excesso podem oxidar e danificar os lípidos celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação e frequentemente à sua inutilização, inibindo a sua função normal.^[33]

O *stress* oxidativo pode ter causas naturais ou não, assim sendo a produção não controlada de radicais livres já foi associada como causa, ou como estando relacionada com mais de uma centena de doenças, como é possível verificar na figura 11.

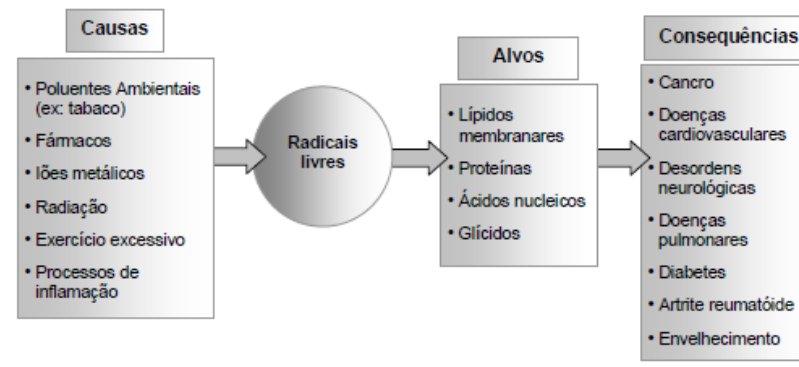


Figura 11 - Principais causas e consequências da ação dos radicais livres^[34]

Atualmente, os antioxidantes são usados no tratamento de doenças neurodegenerativas. Têm sido desenvolvidos múltiplos estudos no sentido de testar e potenciar fármacos que reduzam o *stress* oxidativo o que tem provado ser uma ferramenta eficiente na diminuição dos danos neuronais.^[35]

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor importante no sistema nervoso e cuja ação está frequentemente associada a doenças neurodegenerativas por todo o sistema nervoso. Os neurônios colinérgicos estão relacionados com funções importantes como o controlo motor, a aprendizagem e a memória. Todas as ações exercidas pela ACh são prejudicadas quando há deficiências na secreção desse neurotransmissor.^[36]

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima cuja ação é crucial na propagação do impulso nervoso. A AChE inativa a ação do neurotransmissor acetilcolina hidrolisando-o em acetato e colina. (Figura 12)

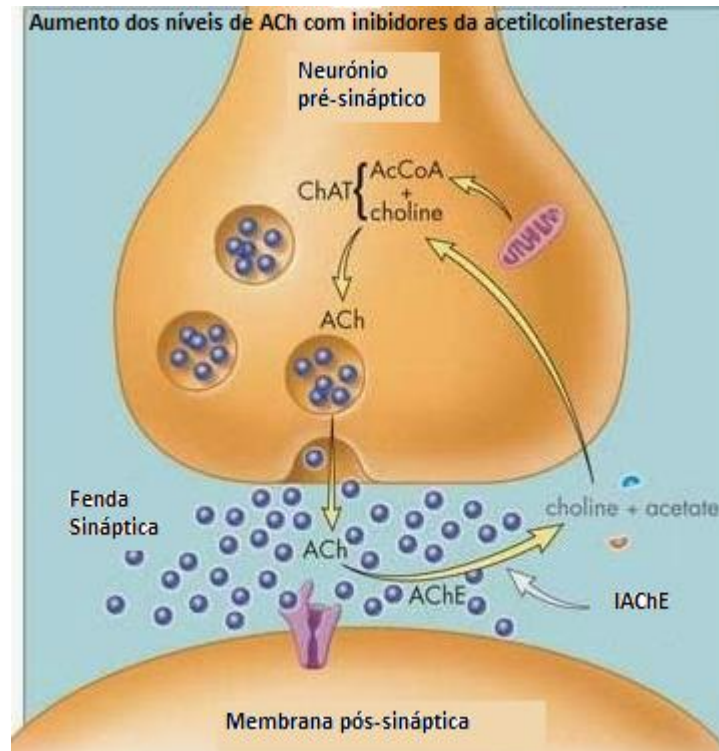


Figura 12 – Esquema do aumento de ACh com IACHe [37]

Uma estratégia terapêutica para aumentar a neurotransmissão colinérgica é aumentar a disponibilidade de ACh através da inibição da AChE.^[37] A utilização de inibidores da acetilcolinesterase (IACHe) tem demonstrado bons resultados na terapêutica de doenças degenerativas, como é o caso da doença de Alzheimer (DA). Os IACHe são utilizados no tratamento da DA, sendo estes a primeira linha de tratamento.^[38]

Compostos organofosforados e carbamatos são alguns dos inibidores químicos utilizados, contudo estes são inibidores irreversíveis, pois ligam-se à enzima por ligações covalentes ou iônicas, apresentando assim um grau de toxicidade muito elevado.^[39] A procura de substâncias com baixo grau de toxicidade, tem-se intensificado cada vez mais, investigando-se plantas utilizadas na medicina tradicional, como fonte de obtenção de compostos inibidores da AChE.^[40] Os inibidores de origem vegetal ligam-se à enzima de uma forma reversível por ligações fracas intermoleculares, permitindo, deste modo, a recuperação do centro ativo da enzima. Os compostos fenólicos têm sido reportados como inibidores da AChE demonstrando também não ser tóxicos.^[28]

Assim sendo, quanto melhor for a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos menor o ser o *stress* oxidativo, logo é extremamente vantajoso obter-se compostos inibidores da AChE de origem natural, como é o caso dos compostos fenólicos.

Os antioxidantes eficientes deverão ter a capacidade de captar os radicais livres, inibir a peroxidação lipídica e inibir o enzima AChE (acetilcolinesterase).^[28]

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria alimentar são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), entre outros, estes apesar de serem muito eficazes, têm despertado preocupação quanto à sua dosagem e à toxicidade.^[41] Os antioxidantes sintéticos para além de apresentarem uma toxicidade elevada, a sua síntese tem um elevado impacto ambiental, daí a procura cada vez maior de antioxidantes que sejam amigos do ambiente e cuja toxicidade seja baixa, como é o caso dos antioxidantes naturais.

Existem três tipos principais de antioxidantes na natureza, estes incluem vitaminas, enzimas e fitoquímicos.^[14] As frutas e vegetais, assim como os produtos provenientes do seu processamento na indústria alimentar, são fontes de antioxidantes naturais.^[41] Logo, as frutas e os seus resíduos têm sido bastante estudados nos últimos anos, como fonte alternativa aos antioxidantes sintéticos.^[42] Na seleção de antioxidantes são desejáveis as seguintes propriedades:

- Eficácia em baixas concentrações (0,001% a 0,01%);
- Ausência de efeitos indesejáveis na cor, odor, sabor noutras características do alimento;
- Compatibilidade com o alimento e fácil aplicação;
- Estabilidade nas condições de processo e armazenamento, e o composto e seus produtos e oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento.

Não existe um método único para a determinação da atividade antioxidante nos alimentos. Logo, os estudos que visam avaliar as propriedades antioxidantes dos extratos vegetais utilizam mais do que uma metodologia, de forma a concluir com mais segurança, se as amostras analisadas apresentam alguma atividade no combate aos radicais livres.^[43] Neste trabalho para ao estudo da atividade antioxidante de uma amostra alimentar recorreu-se ao método de captação do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ao estudo da inibição da peroxidação lipídica (TBARS), à captura do óxido nítrico (NO) e à inibição da acetilcolinesterase.

1.4 Métodos Cromatográficos para Identificação e Quantificação de Compostos numa Amostra

Para a descrição do perfil dos compostos numa mistura, recorre-se habitualmente a metodologias cromatográficas.

O objetivo da cromatografia é a separação individual dos diversos constituintes de uma mistura, quer se pretenda a identificação, quantificação ou, simplesmente, a obtenção de uma substância pura. Esta separação ocorre por passagem de uma mistura através de uma fase estacionária, tendo como intermediário um fluido que será considerado a fase móvel, sabendo que estas duas serão miscíveis.^[44]

1.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detetor de Diodo-Array - HPLC-DAD

Devido à diversidade de combinações entre estas duas fases, existem diferentes técnicas de cromatografia. De entre todos os tipos de cromatografia, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das mais relevantes. Trata-se de uma técnica de cromatografia em que a fase móvel é líquida e encontra-se sobre pressão, passando através de uma coluna que contém a fase estacionária, sendo um processo bastante eficiente e rápido.^[44]

Para a deteção dos compostos existem diferentes detetores, destacando-se o de díodos (DAD), dentro dos espectrofotométricos. Este permite monitorizar diversos comprimentos de onda simultaneamente, permitindo a seleção do melhor para cada um dos compostos que se pretendem pesquisar, aumentando assim a sensibilidade do sistema. É assim importante referir

que a eficiência do processo de separação cromatográfica é avaliada a partir do número de pratos teóricos, e esta designação corresponde a uma etapa em que ambas as fases estão em equilíbrio. Assim, quanto maior for o número de pratos teóricos, maior vai ser a eficiência, permitindo uma melhor separação dos compostos. A resolução do sistema avalia, a capacidade da coluna na separação de dois componentes. [45]

Através da técnica de cromatografia de fase reversa é possível separar as moléculas com base nas suas diferenças de hidrofobicidade. A fase estacionária apolar é usada para a retenção de compostos apolares, sendo a coluna mais utilizada a C₁₈ (octadecil - sílica), em que a matriz de suporte (sílica) se encontra ligada um *n*-alcano com 18 átomos de carbono. Os eluentes que são usados na coluna, designados por fase móvel, neste caso são polares, vão exercer forças atrativas com os compostos retidos na fase estacionária. A retenção de um composto na fase estacionária é tanto maior quanto menor é a sua solubilidade na fase móvel. [46]

Tendo em conta esta metodologia, quando a amostra é injetada no HPLC, a mesma percorre a fase estacionária ficando retidas, por mais tempo, as moléculas que apresentam uma maior afinidade com a coluna, através de ligações hidrofóbicas. As moléculas que apresentam menor afinidade atravessam a coluna mais rapidamente. Após atravessarem a coluna, os analitos são detetados pelo DAD e quantificados. Cada composto é identificado através do seu tempo de retenção, que depende do modo de interação do mesmo com a fase estacionária. [47]

Com o recurso do HPLC-DAD para o estudo de compostos fenólicos é possível obter-se não só a informação qualitativa para um dado pico (espectro UV-Vis) além de uma simples identificação pelo tempo de retenção, que posteriormente é comparado com os obtidos com padrões puros e quantificado com recurso a curvas de calibração por separação dos padrões nas mesmas condições.

Outra vantagem deste detetor deve-se ao facto de permitir medir a absorvância a vários comprimentos de onda que são seleccionados de forma a corresponder à maior sensibilidade de medição para um dado composto. [46]

A maior dificuldade encontrada na análise de compostos fenólicos por HPLC-DAD deve-se à falta de padrões comerciais dos compostos fenólicos, principalmente os glicosilados, para estabelecer uma comparação correta entre o espectro do composto a que se refere o pico e o do padrão puro. Por observação do espectro UV-Vis é possível estabelecer a família do composto fenólico a que pertence, mas a sua identificação só é possível através de espectrometria de massa. [47]

1.4.2 Espectrometria de Massa – MS

A espectrometria de massa é uma técnica instrumental utilizada para a análise de átomos ou moléculas, em fase gasosa. [46]

O espectrómetro de massa é composto por cinco componentes, estes são: o sistema de introdução da amostra, a fonte de ionização, o analisador de massa, o detetor e o sistema de aquisição de dados. (figura 13) [46]

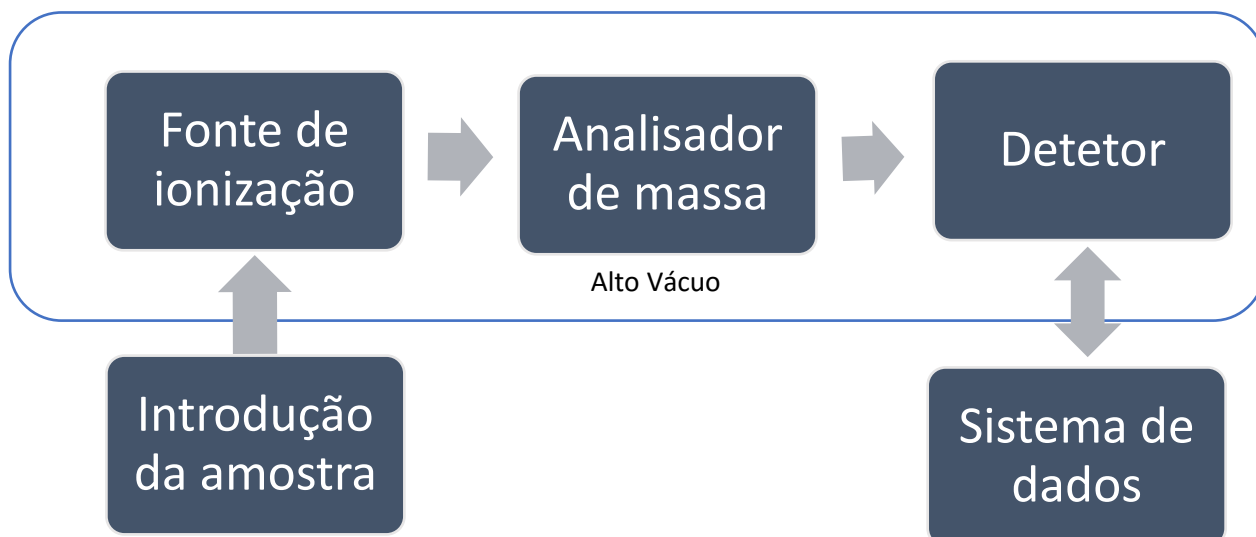


Figura 13 -Esquema dos componentes do espectrômetro de massa [46]

Independentemente do tipo de ionização e do analisador, pode dizer-se que a amostra é introduzida na fonte de ionização, onde o analíto passa a fase gasosa e é ionizado. Seguidamente, os iões vão para o analisador de massa, onde são separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). No detetor, a corrente iónica é multiplicada por aceleração de eletrões na superfície de um elétrodo, sendo originados iões secundários. Como tal, é transmitido um sinal elétrico, que chega ao sistema de aquisição de dados, que por sua vez, o exibe sob a forma de espectro de massa. [46]

Desde a fonte de ionização até ao detetor, o procedimento ocorre a alto vácuo, de forma a evitar colisões entre os iões e o gás de fundo, evitando assim reações ião-molécula.

A análise por espectrometria de massa, de uma amostra, pode ser feita recorrendo a diversas técnicas de ionização e de analisadores de massa, escolha essa que é feita de acordo com as propriedades físico-químicas apresentados pelo analíto volatilidade, estabilidade térmica, entre outras. As técnicas de ionização mais comuns são a ionização eletrónica (EI), ionização química (CI), ionização por desadsorção laser assistida por matriz (MALDI) e a ionização por electrospray (ESI). Por sua vez, os analisadores mais comuns são o quadrupólo, o de sector, o tempo de voo (TOF), a armadilha de iões (ion trap) e o de ressonância ciclotrônica de iões com transformada de Fourier (FTICR). [46]

Neste trabalho a técnica de ionização utilizada foi por electrospray (ESI) que ocorre à pressão atmosférica e à temperatura ambiente. [46]

Assim sendo, a interface LC-MS combina o poder de separação do HPLC para a resolução de uma mistura de compostos, com a capacidade do MS para detetar seletivamente e confirmar a identidade molecular. As suas principais aplicações são a pesquisa farmacêutica, a análise ambiental, a análise de alimentos e a medicina forense. [46]

O objetivo deste trabalho prende-se com a valorização da casca do abacate, *Persea americana*, do tipo Hass, de forma a valorizar um resíduo do processamento das frutas. Para o desenvolvimento deste estudo impõem-se, em primeiro lugar, a implementação de um método de extração dos compostos presentes na casca da pêra abacate, com vista à identificação e

quantificação dos compostos, com recurso á técnica de LC-MS. Simultaneamente, é importante estudar-se a capacidade antioxidante dos compostos extraídos da casca da pêra abacate bem como a sua influência na toxicidade celular em células tumorais humanas HepG-2, permitindo assim aumentar o potencial deste desperdício alimentar.

II – Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Reagentes

Ácido gálico, Sigma-Aldrich; Ácido tânico, Merck; 5,5' – dithiobis (2-nitrobenzoic acid) - DTNB, Sigma; Sodium Nitroprusside dihydrate – SND, VWR; Cloreto de Ferro Hexahidratado – $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Fluka; 2,2 – diphenyl – 1 picrylhydrazil – DPPH, Alfa Aesar; Reagente de Bradford, Bio-Rad Protein Assay; Pepsina – Fluka; Ferrocianeto de Potássio – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, Merck; Glucose – $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Sigma-Aldrich; Catequina hidratada - $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich; Cloreto de Sódio – NaCl , Merck; Ácido 2-Tiobarbitúrico – $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$, Sigma-Aldrich; Ácido Tricloroacético - CCl_3COOH , Merck Millipore; Ácido Sulfúrico - H_2SO_4 , Sigma-Aldrich; Etanol 96% - $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, VWR; Metanol – CH_3OH , VWR HiPerSolv CHROMANORM gradient for HPLC; 1-Butanol - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$, Merck Millipore; Reagente de Folin-Ciocalteu's, Merck Millipore; Reagente de Griess, VWR, DMEM (Dubecco's modifies Eagle's Medium)

A água destilada e a *Milli-Q* usados ao longo do trabalho prático foram obtidas no 4º piso do C8.

2.1.2 Aparelhos

Ao longo do trabalho prático a balança utilizada foi a Santorius BP 110 S, o vortex Heidolph Reax 2000 e o ultra-sons Transsonic 460/H.

De forma a poder retirar a secar as amostras, utilizou-se o liofilizador Heto Power Dry LL 3000, acoplado à bomba Edwards Model RV3. Para secar as amostras também se recorreu ao evaporador rotativo da Büchi Rotavapor R-200, cujo banho é Büchi Heating Bath B-490 e a bomba acoplada é Büchi B-169 Vacuum-System.

Nas precipitações em etanol recorreu-se à centrífuga Beckman Model J2-21 Centrifuge. Outra centrífuga utilizada foi a Mini Spin F45-12-11 da Eppendorf, para amostras em menores quantidades.

O espectrofotómetro utilizado no doseamento de fenóis, proteínas, açúcares e na determinação de radicais de NO foi o UV-160 A, UV-Visible Recordings. Contudo no estudo da inibição da acetilcolinesterase (AChE) recorreu-se ao espectrofotómetro Jasco V-50 UV-Vis Spectrophotometer. No doseamento de Taninos, na atividade antioxidante, na peroxidação de lípidos e na Citotóxicidade das células recorreu-se ao leitor de microplacas Sunrise, Labocontrol Tecan.

Para os testes de FTIR, o espectrofotómetro é da Thermo e o detetor usado é o DTGS-TEC. A análise por HPLC-DAD foi realizada num VWR-Hitachi LaChrom Elite equipado com uma coluna LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-8 (5 μm) (Merck) e software EZChrom Elite (Agilent Technologies 2007), com injetor automático e detecção por sistema de «Diode array». A análise por LC-MS e LC-MS/MS foi efetuada num cromatógrafo líquido com sistema Surveyor Plus Modular LC acoplado a um espectrómetro de “armadilha de iões” (ion trap) LCQ Duo equipado

com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) da Thermo Scientific (bremen, Germany). A coluna usada foi a LiChroCART 2504 LiChrospher 100 RP-8 (5 µm) (Merck, Alemanha).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação dos Extratos da Casca da Pêra Abacate

Para o preparado dos extratos fez-se uma decocção da casca da *Persea americana* do tipo Hass. Para a decocção utilizou-se 100 mL de água destilada juntamente com 10 g de casca, deixando em ebulição durante 10 minutos. Posteriormente, foi filtrada e o filtrado foi reservado a -20°C e depois liofilizado.

Foram preparados 3 extratos aquosos, estes são da mesma espécie de abacate, mas de alturas diferentes. Os extratos 1 e 2 são da mesma pêra abacate e a decocção foi feita em outubro de 2014, contudo o extrato 1 foi liofilizado em outubro de 2014 e reservado a -20 °C. No caso do extrato 2, este foi reservado a -20 °C em 2014 e a sua decocção foi apenas liofilizada em novembro de 2015. A pêra abacate do extrato 3 foi comprada em janeiro de 2016 e a sua decocção e posterior liofilização da mesma, foram feitas na mesma altura.

Fez-se o doseamento dos fenóis totais (2.2.3.1), taninos (2.2.3.2), proteínas (2.2.3.3), açúcares (2.2.3.4) e atividade antioxidante, pelo método do DPPH (2.2.4.1), para os três extratos.

2.2.2 Purificação dos Extratos

Foram aplicadas três metodologias diferentes para a purificação dos extratos com o objetivo de recuperar os compostos fenólicos, a diálise a pH ácido, a digestão com pepsina seguida de diálise ácida e a precipitação em etanol.

2.2.2.1 Diálise a pH Ácido

Fez-se uma solução de 10 mg/mL do extrato 1 que foi agitada no vortex e nos ultra-sons de forma a ser totalmente diluída. Foi reservada uma amostra da solução, a -20 °C, para doseamentos de fenóis totais (2.2.3.1), de taninos (2.2.3.2) e de DPPH (2.2.4.1).

De seguida, adicionou-se a solução na membrana de diálise, a membrana usada foi a P10000. Os compostos com peso molecular superior a 10000 Da ficam retidos no interior da membrana.

A membrana de diálise foi colocada em 50 mL de água *Milli-Q*, a pH 1.2 e mantida sob agitação.

A diálise consiste num método pelo qual moléculas grandes, como é o caso das proteínas, e moléculas pequenas, como é o caso dos aminoácidos, em solução podem ser separadas por difusão seletiva através de uma membrana semipermeável. ^[15]

Foram recolhidas amostras da água a pH 1.2, de hora a hora, durante 24 horas, de forma a quantificar-se os fenóis totais e taninos extraídos.

Após 24 h, a solução presente no interior da membrana, designada por após a diálise, e as águas a pH 1.2, designadas por dialisado, foram reservadas a -20 °C e liofilizadas. Doseou-se os fenóis totais (2.2.3.1), taninos (2.2.3.2) e atividade antioxidante (2.2.4.1) presentes no dialisado e no interior da membrana.

2.2.2.2 Digestão Gástrica com Pepsina Seguida de Diálise Ácida

Foi preparada uma solução de 320 mg de pepsina com 200 mg de NaCl (cloreto de sódio) em água destilada a pH a 1.2, até perfazer os 100 mL, simulando o suco gástrico. [48]

Fez-se uma solução de 1:1 da solução de 10 mg/ml do extrato 1 com a solução de suco gástrico. Incubou-se a 37 °C, durante 1 h, de forma a simular a digestão. [48]

Após 1h, a solução foi colocada numa membrana de diálise P10000 e reservou-se o restante a -20 °C. O procedimento usado na diálise foi o descrito em 2.2.2.1. a solução adicionada no interior da membrana da diálise foi designada por Extrato 1 com pepsina, após a diálise, o que estava presente no interior da membrana foi designado por após diálise com pepsina, as águas de recolha foram designadas de dialisado com pepsina. Doseou-se os fenóis (2.2.3.1), taninos (2.2.3.2) e atividade antioxidante pelo método do DPPH (2.2.4.1) para o extrato 1 com pepsina, para o após diálise com pepsina e para o dialisado com pepsina.

2.2.2.3 Precipitação em Etanol

Este procedimento foi adaptado da literatura. [49]

Preparou-se uma solução de 10 mg/mL do extrato 3 e adicionou-se 1:5 de etanol, a 96 %. Reservou-se em banho de gelo, após 2 min, levou-se a amostra à centrifuga durante 45 min, 4500 rpm. De seguida, separou-se o sobrenadante do precipitado. O sobrenadante foi reservado e foi feita uma nova extração do precipitado. Após as 2 extrações os sobrenadantes foram reunidos e secos no evaporador rotativo, lavou-se o sobrenadante por 3 vezes. O precipitado obtido foi seco em azoto. Doseou-se os fenóis totais (2.2.3.1), taninos (2.2.3.2) e atividade antioxidante pelo método do DPPH (2.2.4.1), para o sobrenadante e precipitado, obtidos.

2.2.3 Doseamentos

2.2.3.1 Doseamento dos Fenóis Totais

A determinação dos fenóis totais, foi realizada pelo método de *Folin-Ciocalteu*. [50] O método colorimétrico segundo Folin-Ciocalteu é o mais utilizado neste tipo de determinações. [51]

Adicionou-se 30 µL de extrato (1 mg/mL), 1350 µL de água *Milli-Q* e 30 µL de *reagente de Folin*. Após 3 min, adicionou-se 90 µL de (2 %) e agitou-se durante 2 h a 8 °C, formando-se um complexo azul. O complexo azul formado provem da reação do reagente de *Folin-Ciocalteu* que é reduzido pelos compostos fenólicos da amostra, sendo o mesmo lido a 760 nm.

Fez-se uma curva de calibração (anexo A.1) para os fenóis totais, usando o ácido gálico como padrão num intervalo entre 0,2 µg/mL e 10 µg/mL. A equação da curva obtida foi, $y = 0,0352x - 0,0012$, $R^2 = 0,999$. Onde, x= concentração de ácido gálico (mg/mL) e y=

absorvância a 760 nm. A quantificação de fenóis presentes nas amostras foi feita em quantidade de equivalentes de ácido gálico/ mg de amostra.

2.2.3.2 Doseamento de Taninos

A determinação dos taninos presentes na amostra, foi realizada pelo método de azul da Prússia.^[52] Adicionou-se 300 µL de água destilada a 100 µL da amostra a quantificar (1 mg/mL). Seguidamente adicionou-se 300 µL a 0.1 M de FeCl₃ com 0.1 M de HCl. Adicionou-se 300 µL de 0.008 M de K₃[Fe(CN)₆]. Quimicamente, ocorre a redução dos grupos hidroxi-fenólicos dos iões Fe³⁺ a Fe²⁺, os quais são complexos com ferrocianeto, produzindo pigmentos de coloração azul. Foi lida a absorvância do complexo azul formado a 605 nm.

Neste método também foi feita uma curva de calibração (anexo A.2), cujo padrão foi o ácido tânico, num intervalo de concentração entre 0,001 mg/mL e 0,015 mg/mL. A curva de calibração obtida para os taninos foi $y = 147,75x - 0,0055$ $R^2 = 0,9965$, onde x = concentração de ácido tânico(mg/mL) e y = Absorvância a 605 nm. A quantificação dos taninos presentes nas amostras foi feita em quantidade de equivalentes de ácido tânico/ mg de amostra.

2.2.3.3 Doseamento de Proteínas

Um dos métodos espectrofotométricos utilizado, para a determinação de proteínas totais, é o método de Bradford.^[53] Este método utiliza o corante “Coomassie brilliant blue” G-250. O método de Bradford é rápido, sensível e está sujeito a um menor número de interferentes, em comparação com outros métodos reconhecidos para a quantificação proteica. Este método é baseado na interação entre corante e as macromoléculas das proteínas que contém aminoácidos de cadeia lateral básica ou aromática.^[54]

Adicionou-se 795 µL de água *Milli-Q*, 5 µL de amostra e 200 µL de reagente de Bradford. As proteínas vão interagir com o corante, provocando um deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniónica, ocorrendo uma mudança de cor da solução de castanho avermelhado para azul intenso. Foi lida a absorvância a 595 nm.

Para este ensaio foi feita uma curva de calibração com BSA a diferentes concentrações, entre 0,001 µg/mL e 0,01 µg/mL. A curva de calibração obtida para as proteínas foi: $y = 45,855x + 0,0217$, $R^2 = 0,9898$, onde x = concentração de BSA (µg/mL) e y = Absorvância a 605 nm. A quantificação das proteínas presentes nas amostras foi feita em quantidade de equivalentes de BSA/ mg de amostra.

2.2.3.4 Doseamento de Açúcares

Na determinação de açúcares redutores recorreu-se ao método do 3,5-dinitrosalicilato (DNS).^[55] Pesou-se 50 mg da amostra, que foi reduzida a um pó fino. De seguida transferiu-se a amostra para um tubo e adicionou-se 10 mL de H₂SO₄, 1.5 M. Aqueceu-se o tubo em banho de água (100 °C) durante 20 min, agitando de vez em quando.

Arrefeceu-se o tubo à torneira, e o seu conteúdo foi transferido para um erlenmeyer, e adicionou-se 12 mL de NaOH a 10 %. Aqueceu-se o erlenmeyer e filtrou-se para um balão de 50 mL. Perfez-se o volume do balão para 50 mL e agitou-se.

Posteriormente, num tubo, adicionou-se 1 mL da amostra anteriormente preparada, 1 mL de reagente de DNS e 2 mL de água *Milli-Q*, aquece-se em banho de água a 100 °C durante 5 min.

Em meio alcalino e por aquecimento, o DNS é reduzido na presença de glúcidos redutores a 3-amino-5-nitrossalicilato, composto de cor castanha avermelhada. Contudo, uma vez que os poliósidos não são redutores, procede-se previamente a uma hidrólise ácida das amostras de modo a serem obtidas as oses constituintes.^[56]

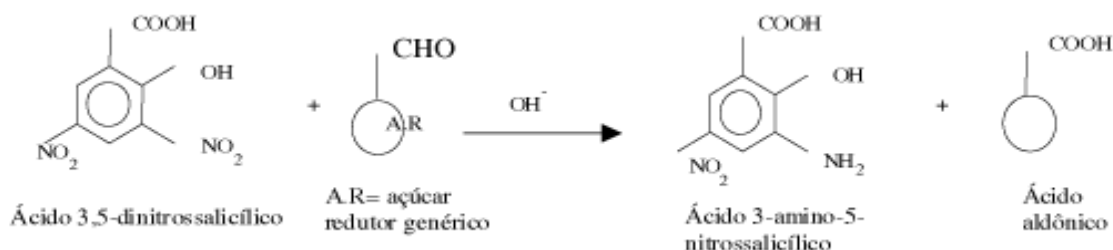


Figura 14 - O ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor, em meio alcalino, a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, formando-se também ácido aldônico.^[56]

Arrefeceu-se o tubo à torneira, o seu conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e perpez-se o seu volume. Posteriormente, registou-se os valores de absorvância do complexo de cor castanha avermelhada a 540 nm.

Para o método do DNS foi feita uma curva padrão com glucose a diferentes concentrações, entre 0,006 mg/mL e 0,036 mg/mL. A curva de calibração obtida para o método de DNS foi: $y = 2,6508x - 0,0114$, $R^2 = 0,9493$, onde x = concentração de glucose (mg/mL) e y = Absorvância a 540 nm. A quantificação dos açúcares presentes nas amostras foi feita em quantidade de equivalentes de glucose/ mg de amostra.

2.2.4 Atividade Antioxidante

2.2.4.1 Método de Extinção do Radical DPPH^[57]

Fez-se uma solução de 2 mg de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) em 100 mL de CH₃OH (metanol).

Adicionou-se a 10 µL da amostra a quantificar e 1 mL da solução de DPPH, aguardou-se 30 min e registou-se a sua absorvância a 517 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Neste método colorimétrico, pode verificar-se a mudança da cor roxa do DPPH, para a cor amarela. Isto acontece quando o eletrão desemparelhado se liga ao átomo de hidrogénio do antioxidante.^[57] Os resultados foram expressos em percentagem de redução do DPPH relativamente ao controlo, sendo calculados através da equação 1.

$$AA (\%) = 100 \times \left(\frac{Abs_{controlo} - Abs_{amostra}}{Abs_{controlo}} \right) \quad 1$$

Onde, AA (%) representa a atividade antioxidante, $Abs_{controlo}$ e $Abs_{amostra}$ são absorvâncias da solução de controlo e da amostra, respetivamente. Foram testadas diferentes concentrações da amostra, o valor de EC_{50} (representa a concentração de amostra que corresponde a 50% de inibição do radical).

2.2.4.2 Peroxidação de Lípidos

Neste estudo avaliou-se a capacidade antioxidante das amostras através da diminuição da peroxidação lipídica, induzida por ferro no salmão. Foi utilizada uma amostra de salmão, que foi submetido à oxidação pelo ferro, avaliando a capacidade antioxidante das amostras. O método utilizado neste trabalho foi a Reação ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).^[58]

Pesou-se 1g de salmão, que foi homogeneizado com 9 mL de tampão fosfato salino (Pbs) 1x. Adicionou-se 1 mL da amostra a quantificar (1 mg/mL). Adicionou-se 1 mL de FeSO₄ (15 mM) e 2 mL de H₂O₂ (1 mM). Foi incubado a 37 °C durante 1 h, num banho de H₂O. Posteriormente, retirou-se 0,5 mL da mistura, a estes 0,5 mL adicionou-se 0,25 mL de TBA (1 %) e 0,25 mL de TCA (2,8 %). De seguida foi incubado durante 10 min, em água a 100 °C. De seguida arrefeceu-se em banho de gelo e adicionou-se 2 mL de N-butanol, onde são formadas duas fases. A fase superior é retirada e é lida a sua absorvância a 535 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Neste ensaio são usados dois brancos, um com 100% de oxidação e outro sem oxidação. No branco com 100% de oxidação em vez de se adicionar 1mL da amostra adiciona-se 0,5 mL de H₂O e 0,5 mL de PBS 1x. No branco sem oxidação adiciona-se 4 mL de PBS 1x, uma vez que não se adiciona 1 mL de FeSO₄ (15mM) e 2 mL de H₂O₂ (1 mM).

Os resultados foram expressos em percentagem de redução da peroxidação lipídica relativamente ao controlo, sendo calculado com recurso à equação 1.

$$AA (\%) = 100 \times \left(\frac{Abs_{controlo} - Abs_{amostra}}{Abs_{controlo}} \right) \quad 1$$

Onde, AA (%) representa a atividade antioxidante, Abs_{controlo} e Abs_{amostra} são absorvâncias da solução de controlo e da amostra, respetivamente. Os ensaios foram efetuados a diferentes concentrações, de forma a conseguir-se determinar a concentração da amostra analisar para a qual a atividade antioxidante é 50 %, designada por TBARS.

2.2.4.3 Captura do Óxido Nítrico (NO)

Em 1858, Johann Peter Griess desenvolveu um método de análise de nitritos e nitratos nos alimentos que se baseia na reação de diazotização de Griess. As vantagens da reação de Griess são a sua simplicidade, rapidez, baixo custo e elevada sensibilidade.^[59]

O reagente de Griess é usado para determinar nitrito através de espectrofotometria.

O método de captura do NO foi medido através do uso de 500 µL da amostra, a diferentes concentrações, com 900 µL de SNP (20 mM). Sabe-se que o composto nitroprussiato de sódio (SNP) em solução aquosa de pH fisiológica produz NO. Esse por sua vez, um radical lipossolúvel e hidrossolúvel, reage rapidamente com o oxigênio para formar outras espécies reativas, nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻).^[60]

A mistura é incubada, à temperatura ambiente, durante 2,5 h. Posteriormente são adicionados 900 µL do reagente de Griess. O regente de Griess é composto por duas substâncias, ácido sulfanílico e N-(1-naftalenodiamina). Em condições ácidas, o ácido sulfanílico reage com o nitrito formando um sal diazónio, que por sua vez reage rapidamente com o N-(1-

naftalenodiamina) formando um composto azo colorido que pode ser detetado espectrofotometricamente a 450 nm.^[63] os ensaios foram realizados em triplicado.

Uma solução padrão de nitrito de sódio foi tratada da mesma forma com a finalidade de observar a relação entre a concentração de nitrito e o composto azo colorido formado.

Os ensaios realizados foram expressos em percentagem de redução do NO relativamente ao controlo e calculados segundo a equação 1.

$$AA (\%) = 100 \times \left(\frac{Abs_{controlo} - Abs_{amostra}}{Abs_{controlo}} \right) \quad 1$$

Onde, AA (%) representa a atividade antioxidante, Abs_{controlo} e Abs_{amostra} são absorvâncias da solução de controlo e da amostra, respetivamente.

Os ensaios foram realizados a diferentes concentrações das amostras a analisar, de forma a determinar-se a concentração para a qual existe 50% de inibição do NO, designada por NO.

2.2.4.4 Atividade Inibitória da Acetilcolinesterase - AchE

O método do usado para o cálculo da atividade enzimática da acetilcolinesterase foi adaptado.^[61] Usou-se 325 µL de solução tampão TRIS (50 mM, pH 8,0), 100 µL de amostra a analisar, e 25 µL da solução de acetilcolinesterase (0,1 U/mL) foram pipetados para uma cuvette e deixados a incubar durante 15 min. Simultaneamente, adicionou-se os mesmos volumes de tampão e da amostra, contudo, acrescentou-se 25 µL de AchE. Após os 15 min, foram pipetados 475 µL de DTNB e 75 µL do substrato (solução de AChI), e foi lida a absorvância, a 405 nm, contra o respetivo ensaio em branco, na ausência da solução da enzima, durante 4 min em intervalos de 30 segundos. Os ensaios foram realizados em triplicado.

É calculada a percentagem de inibição da acetilcolinesterase em função da concentração de amostra, IC₅₀. A equação usada no cálculo da percentagem de inibição é a equação 2.

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - \left(100 \times \left(\frac{V_{amostra}}{V_{controlo}} \right) \right) \quad 2$$

Onde, V_{amostra} é a velocidade inicial da reação contendo o extrato e o V_{controlo} é a velocidade inicial da reação contendo a enzima.

2.2.5 Citotoxicidade nas Células HepG-2^[62]

As células HepG-2 (7,5 × 10⁴ células/poço), proveniente do carcinoma hepatocelular, foram cultivadas em DMEM, constituído por Glucose, L-glutamina, Pen-Strep e FBS, a 37 °C numa atmosfera de 5 % de CO₂ em T75. A cada 48 h o meio das células foi renovado, até confluência de 90 %.

Após confluência de 90 % do T75 transferiu-se as células para microplacas de 96 poços. Adicionou-se 100 µl de DMEM em cada poço e depois são reservou-se a 37 °C numa atmosfera a 5 % de CO₂ durante 48 h.

Nos estudos de citotoxicidade, são aplicadas diferentes concentrações nas células durante 24 h, sendo usado o teste de viabilidade do MTT. Neste ensaio é medida a redução do MTT, reflexo da atividade metabólica de células viáveis, ou seja, a redução do MTT só ocorre em

células metabolicamente ativas, logo o nível de atividade é uma medição da viabilidade das células. O produto formado após a redução do MTT, pode ser solubilizado em metanol e o resultante medido espectrofotometricamente. [62]

Adicionou-se 100 µL/poço das amostras em estudo, a diferentes concentrações. No ensaio de controlo as células ficam incubadas com meio DMEM. Ficaram incubadas durante 24h. Após as 24 h, as microplacas foram lavadas duas vezes com PBS (1X) e colocadas na estufa a 37°C. De seguida, colocou-se 100 µL de CH₃OH para cada poço. Após 30 min é lida a absorvância a 595 nm e a 630 nm. Os ensaios foram realizados oito vezes.

A densidade ótica celular média dos poços foi comparada com a densidade média dos poços de controlo. A concentração que provoca a diminuição em 50% da viabilidade celular (IC₅₀), foi determinada a partir de uma regressão linear, por correlação da percentagem de inibição em função do logaritmo das concentrações das amostras a analisar. A percentagem de viabilidade celular foi obtida através da equação 2.

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{Absorv\ancia_{amostra}}{m\acute{e}dia\ da\ absorv\ancia_{controlo}} \times 100$$

2.2.6 Identificação e Quantificação dos Compostos

2.2.6.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR

A radiação infravermelha (IV) encontra-se na zona dos 33-12820 cm⁻¹, entre as regiões do visível e das micro-ondas. [46]

De uma forma muito esquemática, a radiação IV é emitida por uma fonte vai atravessar a amostra e é depois analisada por um detetor. Após a amplificação do sinal, os dados são convertidos para a forma digital por um conversor e transferidos para o computador. [46]

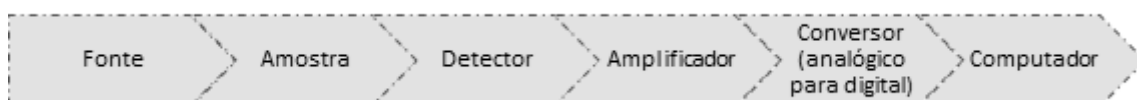


Figura 15 - Componentes básicos do FTIR

Foi pesada 1 mg da amostra, que juntamente com 500 mg de KBr (brometo de potássio), foi homogeneizado e prensado a 6 toneladas, durante 5 min. Posteriormente. Os espectros de transmitância foram obtidos no espectrofotómetro de FTIR. A resolução foi de 4 cm⁻¹ e o número de varrimentos de 256 scans entre 400 - 4000 cm⁻¹.

2.2.6.2 HPLC - DAD

A análise por HPLC foi realizada através de uma eluição por gradiente, composto por uma solução A (CH₃OH) e uma solução B (TFA 0.05 % em água Milli-Q) com o seguinte método: 0 minutos – 20 % de A e 80% e B; 20 minutos – 80 % de A e 20 % e B; 25 minutos – 80 % de A e 20 % e B; 28 minutos – 20 % de A e 8 0% e B; 30 minutos – 20 % de A e 8 0% e B para as três amostras. Para estas foi usado um fluxo de 1 mL/min e injetados de 25 µL das soluções de 1 mg/mL de cada uma. A deteção foi feita entre os 200 e os 500 nm com um DAD.

No caso do estudo em questão a coluna usada a LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) da Merck e o *software* EZChrom Elite.

2.2.6.3 LC-MSⁿ

As análises por LC-MSⁿ foram efetuadas num equipamento HPLC Surveyor Plus Thermo Scientific acoplado a um espectrómetro de massa LCQ Duo Ion Trap Mass Spectrometer Thermo Scientific A coluna cromatográfica utilizada foi a LiChrospher RP 18 5u 250 mm x 4,6 mm (i.d.).

A análise por HPLC foi realizada através de uma eluição por gradiente, composto por uma solução A (CH₃OH) e uma solução B (TFA 0.05% em água *Milli-Q*) com o seguinte método: 0 minutos – 20 % de A e 80 % de B; 20 minutos – 80 % de A e 20% de B; 25 minutos – 80 % de A e 20 % de B; 28 minutos – 20 % de A e 80 % de B; 30 minutos – 20 % de A e 80 % de B para as três amostras.

O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, foram injetados de 25 μ L das amostras a analisar, a uma concentração de 1 mg/mL. A detecção foi feita entre os 200 e os 500 nm com um DAD.

Os espectros de massa foram adquiridos num espectrómetro de massa LCQ-Duo da Thermo Scientific equipado com fonte de ionização por electrospray e com um analisador de massa do tipo *ion trap*. Todos os parâmetros instrumentais foram otimizados para garantir a melhor razão sinal/ruído. Resumidamente, azoto foi utilizado como gás nebulizador (40 ua) e como gás auxiliar (20 ua). O potencial aplicado ao capilar foi de 4.5 kV e a temperatura do capilar metálico foi de 220 °C. As experiências foram realizadas com a polaridade negativa. A energia de colisão (EC) aplicada foi de 40 ua.

O software usado na aquisição e processamento dos espectros de massa foi o Xcalibur versão 1.2 da Thermo Scientific.

2.3 Análise Estatística

Ao longo do trabalho vai recorrer-se ao **teste-t**. O teste-t é usado para comparar um grupo de medidas com outro, a fim de decidir se são ou não diferentes. Os estatísticos dizem que estamos a testar a *hipótese nula* (H_0), a qual estabelece que os valores médios de dois conjuntos de medidas (obviamente de uma mesma quantidade) são iguais. Se a probabilidade desse resultado ter ocorrido for muito pequena, pode-se concluir que o resultado observado é estatisticamente relevante. Essa probabilidade também é chamada de *valor de P*. Em termos gerais, um *valor de P* pequeno significa que a probabilidade de obter um valor da estatística de teste como o observado é muito improvável, levando assim à rejeição da hipótese nula. O nível de significância é geralmente determinado pelo pesquisador antes da coleta dos dados. Em muitas aplicações da estatística, o nível de significância é tradicionalmente fixado em 0,05. Em suma, quando $P \leq 0,05$ a hipótese nula é rejeitada.^[46] O software usado para o estudo estatístico foi o GraphPad Prism 5.0.

III – Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos extratos aquosos da pêra abacate

Os três extratos da casca da pêra abacate foram analisados por HPLC-DAD de acordo com o procedimento descrito em 2.2.6.2. Os cromatogramas obtidos para o 1, 2 e 3 estão representados na figura 16, 17 e 18, respectivamente.

Nas figuras 16, 17 e 18 é possível observar-se as diferenças entre os diferentes extratos preparados. Apesar dos extratos das figuras 16 e 17 provirem da mesma casca, existem algumas diferenças nos cromatogramas. O cromatograma do extrato 1 (figura 16) apresenta um menor número de picos de absorção máximos do que o extrato 2 (figura 17), indicando que o número de compostos presentes no extrato 2 é superior aos compostos presentes pelo extrato 1. Contudo, o extrato 2 apresenta um valor de absorvância dos picos máximos inferior à apresentada pelo cromatograma do extrato 1, indicando assim que os compostos presentes no extrato 2 estão em menor quantidade que os apresentados pelo extrato 1.

O cromatograma do extrato 3 (figura 18) comparativamente aos cromatogramas dos extratos 1 (figura 16) e 2 (figura 17), apresenta um maior número de picos e o seu máximo de absorvância é superior, indicando que possa existir uma maior variedade de compostos químicos no extrato 3.

Pela análise da Figura 16, 17 e 18 é possível verificar no cromatograma dos três extratos a existência de picos máximos de absorção maioritários. No extrato 1 aos tempos de retenção 2,3; 6,5; 7,4 e 8,4. No extrato 2 aos tempos de retenção 2,3; 6,5; 7,4 e 8,4. No extrato 3 aos tempos de retenção 2,3; 7; 7,9 e 8,8.

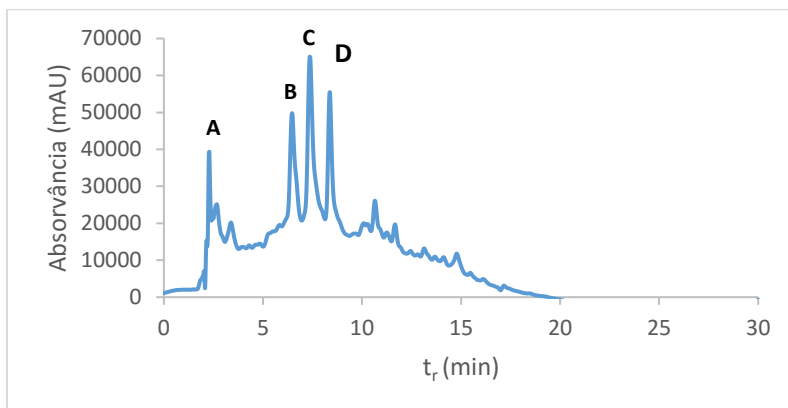


Figura 16 – Perfil cromatográfico do extrato 1 (1 mg/mL), obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (*Persea americana*). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.1. **A** - $t_r=2,3$; **B** - $t_r=6,5$; **C** - $t_r=7,4$; **D** - $t_r=8,4$

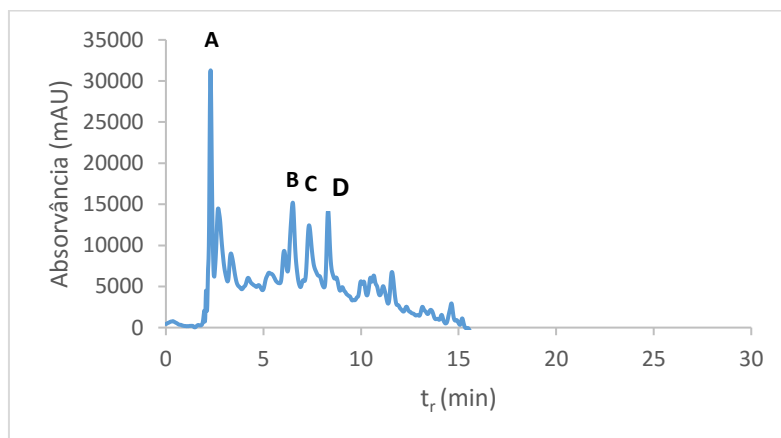


Figura 17 - Perfil cromatográfico do extrato 2 (1 mg/mL), obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (*Persea americana*). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.1 **A** - $t_r=2,3$; **B** - $t_r=6,5$; **C** - $t_r=7,4$; **D** - $t_r=8,4$

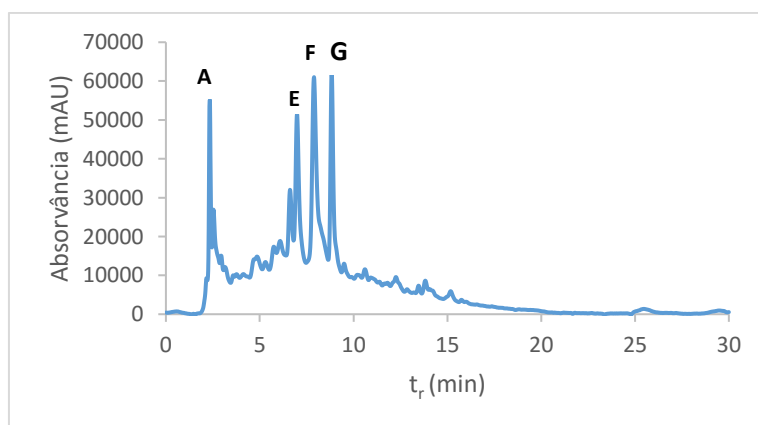


Figura 18 - Perfil cromatográfico do extrato 3 (1 mg/mL), obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (*Persea americana*). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.1. **A** - $t_r=2,3$; **E** - $t_r=7$; **F** - $t_r=7,9$; **G** - $t_r=8,8$

Nas figuras 19, 20 e 21 estão representados os espectros UV-Vis dos compostos maioritários presentes em cada extrato aos respectivos tempos de retenção. Os picos maioritários das figuras 19 e 20 apresentam o mesmo tempo retenção, contudo os espectros de UV-Vis é diferente, demonstrando que apesar de se tratar do mesmo extrato os compostos presentes são diferentes e as suas absorvâncias também. Na figura 21 os compostos maioritários apresentam tempos de retenção diferentes dos exibidos pelos extratos 1 e 2, contudo o composto do espectro A apresenta o mesmo tempo de retenção e um espectro UV-Vis semelhante, tratando-se do mesmo composto.

Os espectros representados nas figuras 19, 20 e 21 são espectros característicos de compostos fenólicos, uma vez que todos os flavonóides apresentam um máximo de absorção entre 240-290 nm (banda II).^[25] Nos flavonóides em que os anéis B e C são conjugados (através de uma ligação dupla entre os carbonos C₂ e C₃ no anel C) existe uma banda de absorção máxima a 300-550 nm, contudo entre 310-370 nm este máximo de absorção é para flavonas e flavonóis.^[26] Os flavanóis e as proantocianidinas apresentam um máximo de absorção a cerca de 270-290 nm (banda II).^[25]

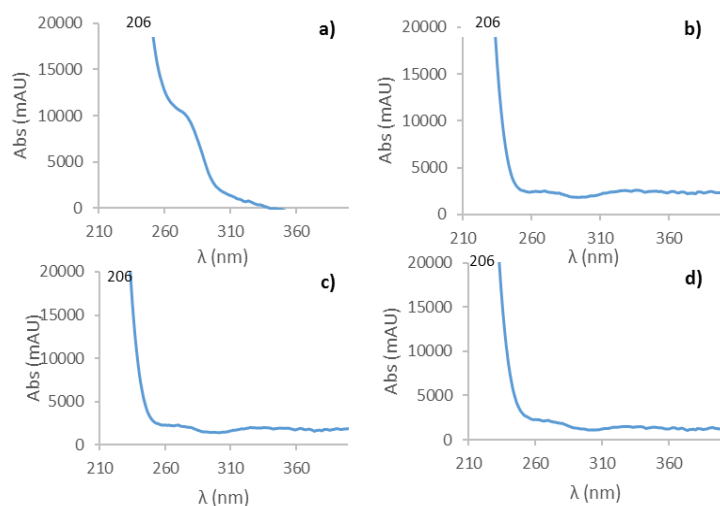


Figura 19 – Espectros UV-Vis dos compostos maioritários do extrato 1. a) $t_r= 2,3$; b) $t_r= 6,5$; c) $t_r= 7,4$; d) $t_r=8,4$

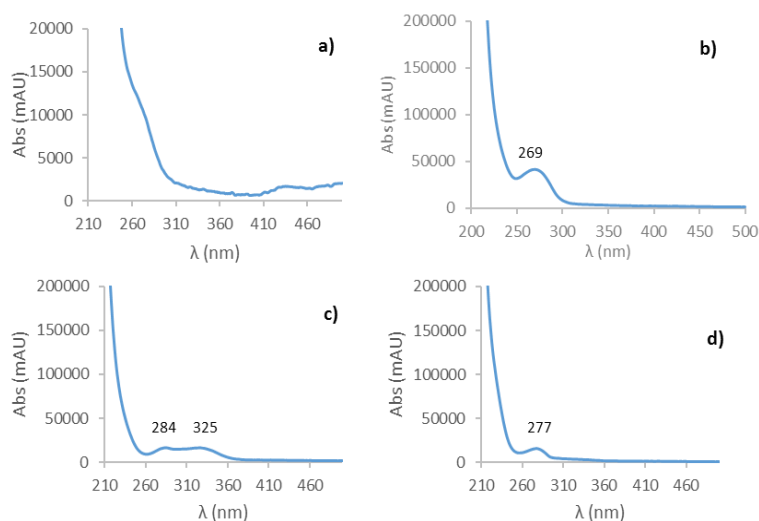


Figura 20 - Espectros UV-Vis dos compostos maioritários do extrato 2. a) $t_r= 2,3$; b) $t_r= 6,5$; c) $t_r= 7,4$; d) $t_r=8,4$

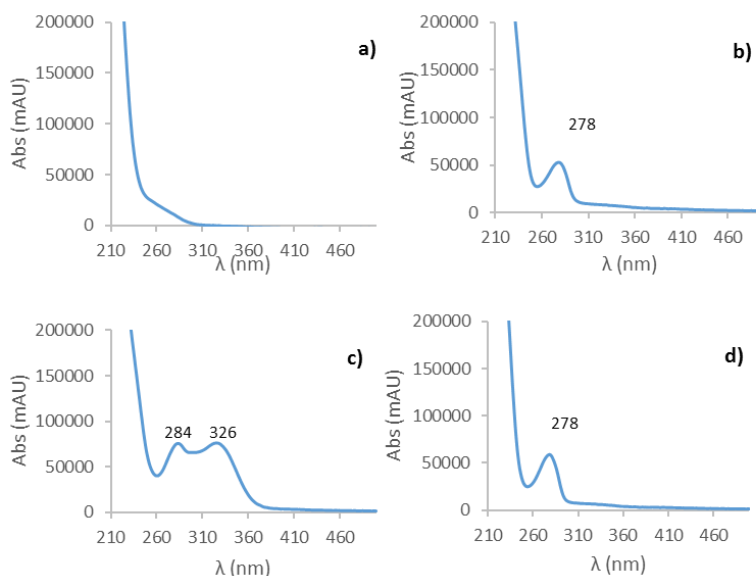


Figura 21 - Espectros UV-Vis dos compostos maioritários do extrato 3. a) $t_r= 2,3$; b) $t_r= 7$; c) $t_r= 7,9$; d) $t_r=8,8$.

Uma vez que se verificou a existência de compostos fenólicos através do UV-Vis foram quantificados os fenóis totais e taninos presentes nos extratos. Os fenóis totais foram quantificados aplicando-se o procedimento descrito em 2.2.3.1. Os resultados da figura 22 confirmam que o extrato 3 continha maior quantidade de fenóis totais.

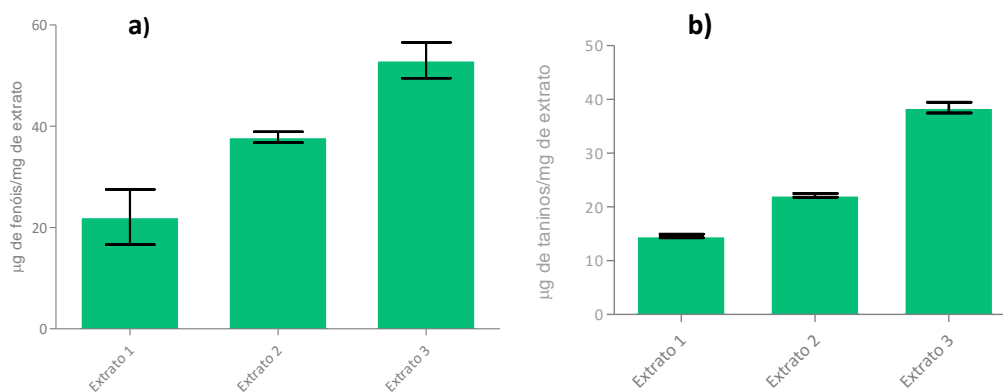


Figura 22 – a) Comparação dos fenóis presentes nos diferentes extratos. O procedimento para a quantificação dos fenóis é o descrito em 2.2.3.1. **b)** Comparação dos taninos presentes nos diferentes extratos. O procedimento aplicado para a quantificação dos taninos é o descrito em 2.2.3.2.

Os valores apresentados na figura 22- a) foram analisados pelo teste-t. Uma vez que, por comparação dos diferentes extratos os valores de P foram inferiores a 0,05, pode afirmar-se que existem diferenças significativas entre os três extratos, como se pode observar pelas figuras 16, 17 e 18. Apesar dos extratos 1 e 2 provirem da mesma fruta, que apenas foi liofilizada em alturas diferentes, as diferenças são evidentes, não somente em termos de conteúdo em fenóis totais e taninos (figura 22), mas também pelos cromatogramas dos dois extratos, figuras 16 e 17. Relativamente às diferenças apresentadas dos extratos 1 e 2 relativamente ao extrato 3, pode dever-se ao facto de os extrato 1e 2 terem estado reservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante algum tempo, levando à diminuição de compostos fenólicos.^[63] Os extratos 1 e 2 comparativamente com o extrato 3 apresentam diferenças significativas, ($P < 0,05$), no conteúdo em fenóis e taninos e no cromatograma da Figura 18 que como referido tem mais compostos e com picos de absorção de maior intensidade, isso pode dever-se à maturidade da fruta, quando foi feita a decocção, pois quanto mais madura for a fruta, maior vai ser a quantidade de fenóis presente,^{[64], [65]} o que o que se refletiu na composição da decocção da casca.

Foi feito o doseamento dos taninos presente nos extratos (descrito em 2.2.3.2), uma vez que este é um método colorimétrico menos suscetível à interferência de proteínas, em comparação com o método de *Folin-Ciocalteu* (descrito em 2.2.3.1), usado para o doseamento de fenóis. Este método apresenta ainda a vantagem de ser simples, rápido, sensível e de baixo custo.^[66]

A figura 22-b) demonstra que existem também diferenças significativas entre os três extratos e os taninos presentes, o que é confirmado pelo teste-t, onde o valor de $P < 0,05$. A diferença apresentada pelos três extratos, em relação à quantidade de taninos presente deve-se ao facto de os extratos 1 e 2 terem estado durante algum tempo reservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[67] e à maturidade do fruto,^{[64], [65]} tal como referido anteriormente.

Poderão haver diferenças tão significativas entre os três extratos e as quantidades de fenóis e taninos presentes em cada um, pode ser associada a questões climatéricas, pois como

a casca do extrato 3 foi colhida num ano diferente da casca do extrato 1 e 2, assim sendo vão haver diferenças na quantidade de taninos e fenóis das duas cascas, uma vez que a quantidade de taninos e fenóis depende diretamente de questões climatéricas.^[68]

Quantificou-se a atividade antioxidante dos três extratos pelo método de extinção do DPPH, descrito em 2.2.4.1. O DPPH apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e, portanto, representa um bom método de medida da atividade antioxidante em frutas.^[68] Na figura 23 estão representados os resultados da capacidade de extinção do DPPH para concentrações crescentes dos extratos analisados.

Na figura 23 é possível observar-se para todos os extratos o aumento da concentração dos extratos aumenta a capacidade de extinção do radical, havendo assim uma relação linear, com valor de R^2 superior a 0,9. Analisando a figura 23 é notório que para o extrato 3 (figura 23-c) a concentração de extrato necessário para uma determinada percentagem de extinção do radical é inferior, o que indica a sua elevada atividade antioxidante.

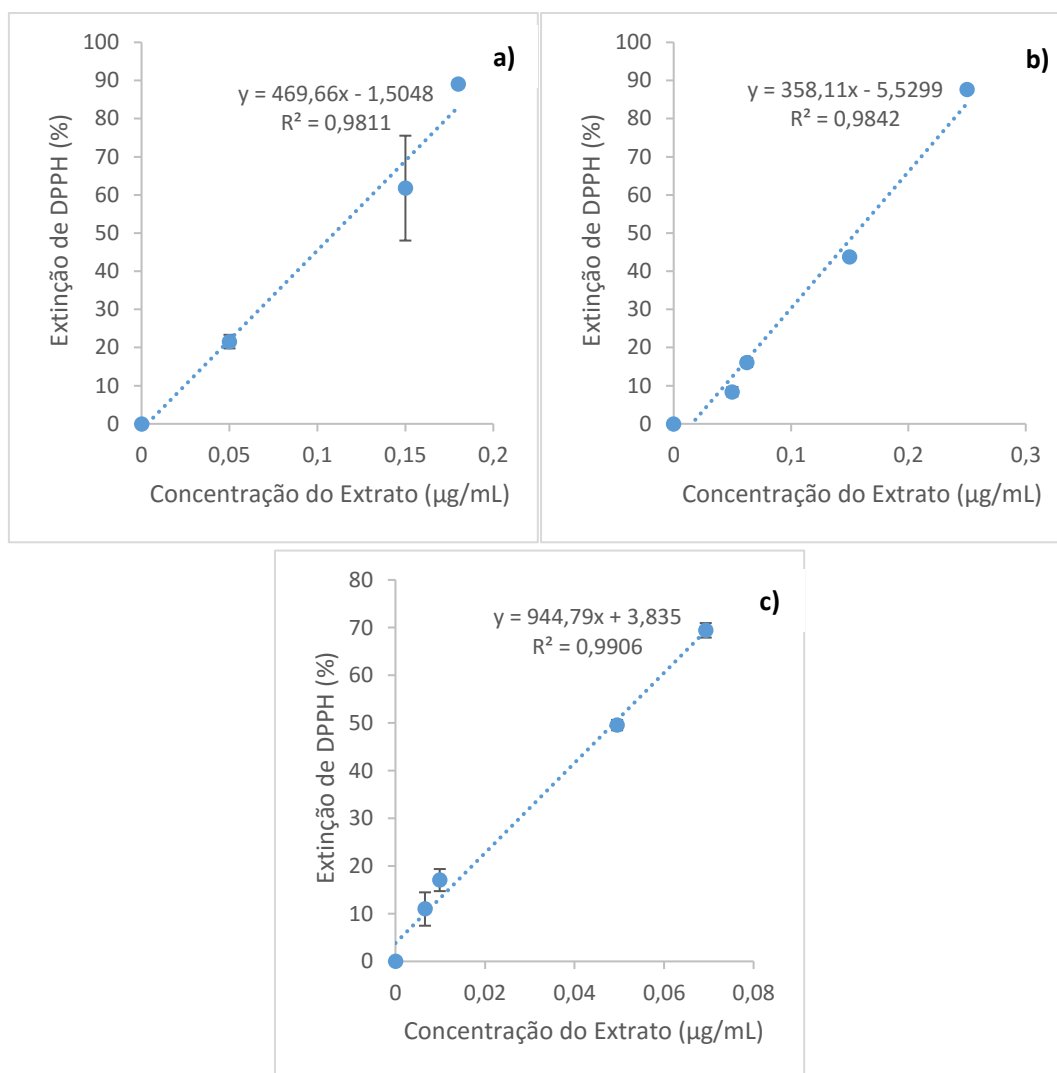


Figura 23 – Capacidade de extinção do DPPH para concentrações crescentes dos extratos, pelo método 2.2.4.1. **a)** Extrato 1; **b)** Extrato 2; **c)** Extrato 3.

A partir dos gráficos da figura 23 foi possível calcular o valor EC_{50} (concentração de extrato que corresponde a 50 % de inibição do radical) para os diferentes extratos, tabela 2 coluna 5.

Tabela 2 – Fenóis Totais, Taninos e EC_{50} dos extratos de *Persea americana* Hass (pêra abacate). O método de doseamento dos fenóis totais usado é o descrito no ponto 2.2.4, o dos taninos está de acordo com o descrito em 2.2.5 e o da atividade antioxidante, EC_{50} , está de acordo com o descrito em 2.2.6.

	Fenóis Totais - (μ g de fenóis/mg de extrato)	Taninos (μ g/mg de extrato)	% de taninos por fenóis	EC_{50} (μ g/ml)
Extrato 1	$22,08 \pm 9,42$	$14,60 \pm 0,55$	66,13	$109,66 \pm 4,10$
Extrato 2	$37,86 \pm 1,87$	$22,18 \pm 6,22 \times 10^{-4}$	58,57	$155,12 \pm 0,82$
Extrato 3	$53,03 \pm 6,12$	$38,48 \pm 1,74 \times 10^{-3}$	72,56	$48,86 \pm 1,71$

A EC_{50} dos três extratos é muito diferente entre si, pelo teste-t os extratos 1 e 2 apresentam um valor de $P = 0,0062$, os extratos 1 e 3 e os extratos 2 e 3 apresentam um $P < 0,001$, indicando que os três extratos apresentam atividade antioxidantes muito diferentes. Segundo a tabela 4 coluna 4 a atividade antioxidante dos extratos por ordem de grandeza é Extrato 3 > Extrato 1 > Extrato 2.

Calculou-se a percentagem de taninos presente nos fenóis totais quantificados (tabela 2 coluna 4) verificando-se que no extrato 1 há maior percentagem de taninos por fenóis que no extrato 2 e isso pode dever-se às reações de oxidação que ocorrem nos fenóis, quando reservado durante algum tempo a temperaturas baixas.^[72]

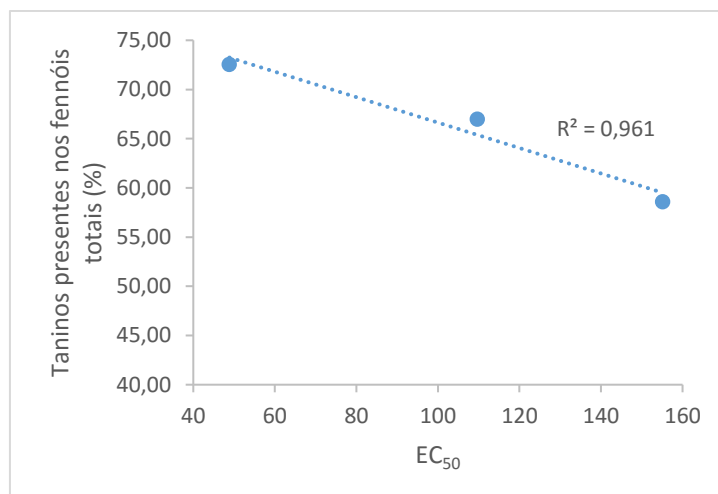


Figura 24 - Correlação entre a % de Taninos presente no cálculo de fenóis totais e a atividade antioxidante (EC_{50}) dos extratos.

Na figura 24 é possível perceber-se que existe uma relação linear entre a atividade antioxidante dos extratos e a percentagem de taninos presente nos fenóis totais, $R^2 = 0,96$, indicando que a quantidade de taninos presente no extrato contribui para a atividade antioxidante. Estudos anteriores demonstram que a atividade antioxidante das cascas das frutas está diretamente relacionada com a presença de ácidos fenólicos e polifenóis (taninos e flavonóides).^[69]

Posteriormente foi quantificada a presença de proteínas (pelo método descrito em 2.2.3.3) e açúcares (pelo método descrito em 2.2.3.4) nos extratos 2 e 3. Não se usou o extrato 1, pois este apresenta o menor número de fenóis totais, sendo o extrato 2 representativo do extrato 1.

Tabela 3 – Proteínas e açúcares presentes nos extratos 2 e 3. O doseamento de proteínas foi feito de acordo com o procedimento descrito em 2.2.3.3 e o doseamento de açúcares com o procedimento apresentado em 2.2.3.4.

	Proteínas (μg de proteínas/mg de extrato)	Açúcares (μg de açúcares/mg de extrato)
Extrato 2	$50 \pm 0,01$	$14 \pm 0,001$
Extrato 3	$11 \pm 0,01$	$8 \pm 0,002$

Através da tabela 5 é perceptível que há uma maior quantidade de proteínas e açúcares presentes no extrato 2, o que contribui para que na matéria seca do extrato 2 exista uma menor percentagem de compostos com atividade antioxidante, comparativamente ao extrato 3 cuja atividade antioxidante é muito superior. Tendo em conta isto, foi desenvolvida uma estratégia de purificação dos compostos fenólicos dos extratos, de forma a eliminar as proteínas e açúcares presentes, tendo em vista a recuperação da maioria dos compostos bioativos presentes. Pretende-se assim eliminar os compostos poliméricos, proteínas e polissacáridos que se encontram agregadas aos extratos, uma vez que foi reportado que a presença de fibras solúveis nos extratos pode afetar a análise química, a biodisponibilidade e as propriedades biológicas apresentadas pelos extratos. [70]

3.2 Purificação dos extratos

De forma a conseguir recuperar os compostos presentes nos extratos procedeu-se à sua purificação por três metodologias, nomeadamente por diálise a pH ácido, por digestão gástrica com pepsina seguida de diálise ácida e por precipitação em etanol.

3.2.1 Diálise a pH Ácido

De forma a conseguir purificar os extratos recorreu-se a uma diálise de forma a que os compostos de maior tamanho, como é o caso das fibras, sejam separados dos mais pequenos, flavonoides. Nas diálises utilizou-se uma membrana de porosidade 10 000 Da, logo os compostos com tamanho igual ou superior a este valor ficaram retidos no interior e seriam recuperados no dialisado os compostos de massa molecular inferior. Para este estudo o extrato utilizado foi o 1, pois apresenta menor atividade antioxidante.

Tabela 4 - Fenóis totais, taninos e EC_{50} presentes no Extrato 1, no interior da manga de diálise e no dialisado. O método de doseamento dos fenóis totais usado é o descrito no ponto 2.2.3.1, o dos taninos está de acordo com o descrito em 2.2.3.2 e a da atividade antioxidante, EC_{50} , está de acordo com o descrito em 2.2.4.1. O N.D. significa não definido.

	Fenóis Totais - (μg de fenóis/mg de extrato)	Taninos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato)	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Extrato 1	22,08 \pm 9,42	14,60 \pm 0,55	109,66 \pm 4,10
Após diálise (dentro da membrana)	4,24 \pm 0,15	5,91 $\times 10^{-4}$ \pm 3,91 $\times 10^{-6}$	N.D.
Dialisado	63,86 \pm 4,93	8,00 $\times 10^{-4}$ \pm 1,46 $\times 10^{-4}$	25,12 \pm 9,01 $\times 10^{-4}$

Analisando a tabela 4 é perceptível a existência de um aumento significativo na quantidade de fenóis totais presentes por mg de extrato no dialisado em relação ao extrato inicial. Este aumento pode dever-se às fibras que ficaram retidas pela membrana de diálise não estando presentes no dialisado o que permitiu um aumento da percentagem de fenóis na matéria seca. É também possível verificar-se que com o aumento dos fenóis existe uma diminuição do EC_{50} , ou seja, um aumento significativo da atividade antioxidante no dialisado. Todavia este método

apresentou como desvantagem ser difícil de secar as amostras recuperadas, para além de não permitir a recuperação dos taninos, que deverão ficaram adsorvidos nas fibras dentro da manga após a diálise, como se contata na tabela 4.

Ao analisar-se os HPLC's presentes na figura 25 do extrato antes e após a diálise, é possível perceber-se que existe uma diminuição dos picos máximos de absorção aos tempos de retenção 6,5 (B), 7,4 (C) e 8,4(D) o que indica que o dialisado tem menos taninos, contudo o número de picos presente no dialisado é superior ao apresentado pelo extrato 1 (fig.16), o que indica uma maior quantidade de fenóis, o que corrobora com os resultados apresentados na tabela 6.

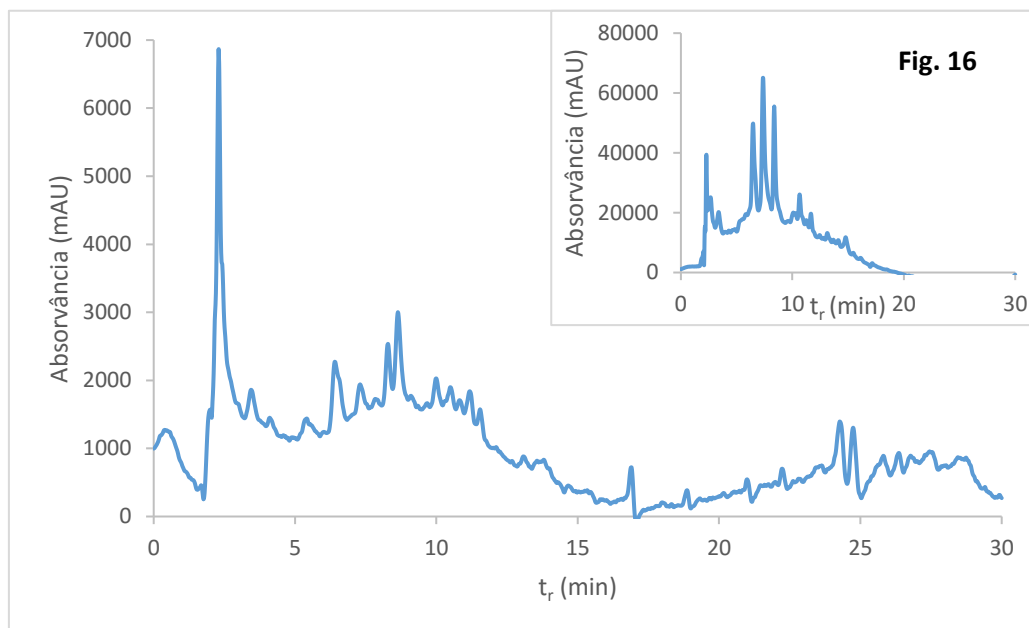


Figura 25 - Perfil cromatográfico do dialisado do extrato 1 (1 mg/mL), obtido por HPLC. O método usado no HPLC é o descrito em 2.2.6.2.

Apesar de se verificar um aumento significativo dos fenóis totais no dialisado, e consequentemente um aumento da atividade antioxidante, não se verificou um aumento na recuperação de taninos, que se tinham mostrado muito importantes para a atividade antioxidante do extrato, assim sendo recorreu-se a outro método de purificação do extrato.

3.2.2 Digestão Gástrica com Pepsina Seguida de Diálise a pH Ácido.

A pepsina é uma enzima proteolítica ativa no suco gástrico, esta é produzida no estômago e tem como função simular a digestão gástrica.^[71] O uso desta enzima na diálise tem como finalidade facilitar a recuperação dos compostos fenólicos, nomeadamente taninos das fibras presentes no extrato por quebra das ligações de modo a facilitar a extração destes compostos por diálise^[71] de forma a obter-se no interior da membrana de diálise um menor número de fenóis.

Neste estudo usou-se o extrato 1, uma vez que é o extrato que apresenta menor atividade antioxidante e também porque foi o usado no estudo demonstrado em 3.2.1, podendo-se assim comparar os resultados obtidos.

Tabela 5 - Fenóis totais, taninos e EC_{50} presentes no Extrato 1, no extrato 1 com pepsina, após a diálise com pepsina e no dialisado com pepsina. O método de doseamento dos fenóis totais usado é o descrito no ponto 2.2.3.1, o dos taninos é o apresentado em 2.2.3.2 e o EC_{50} da atividade antioxidante, DPPH, apresentado em 2.2.4.1. N.D. significa não definido

	Fenóis Totais (μg de fenóis/mg de extrato)	Taninos (μg /mg de extrato)	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Extrato 1	$22,08 \pm 9,4$	$14,79 \pm 5,83 \times 10^{-4}$	$109,66 \pm 4,10$
Extrato 1 com pepsina	$22,88 \pm 2,27$	$8,28 \times 10^{-3} \pm 1,12 \times 10^{-4}$	$61,16 \pm 1,10 \times 10^{-3}$
Após diálise com pepsina	$10,72 \pm 1,43$	$5,91 \times 10^{-4} \pm 3,90 \times 10^{-6}$	N.D.
Dialisado com pepsina	$6,67 \pm 0,48$	$8,06 \times 10^{-3} \pm 1,51 \times 10^{-4}$	$33,54 \pm 2,02 \times 10^{-3}$

De acordo com os dados apresentados na tabela 5, o uso de pepsina na diálise não demonstrou eficiência na extração pois não se registou um aumento da quantidade de fenóis e taninos por mg de extrato, no dialisado, possivelmente porque a pepsina é uma enzima proteolítico, que digere proteínas e a constituição das fibras é maioritariamente polissacáridos. Em oposição, verificou-se uma diminuição de fenóis e taninos recuperado relativamente ao processo anterior o que pode dever-se ao facto de o extrato ter estado durante 1 h a 37°C , pois estudos demonstraram que tempos de extração longos e temperaturas elevadas aumentam a possibilidade de oxidação dos fenóis, diminuindo assim a presença de compostos fenólicos nos extratos.^[72] Contudo, o valor de EC_{50} diminui face ao extrato 1, ou seja, há um aumento da atividade antioxidante dos compostos que estão presentes no dialisado, isto pode dever-se aos taninos que estão no dialisado apresentarem uma atividade biológica elevada. Contudo o valor de EC_{50} do dialisado deste método aumentou face ao valor obtido pelo método de diálise a pH 1,2, ou seja, obteve-se uma pior atividade antioxidante, demonstrando que este método não revelou melhorias ao nível da atividade antioxidante, face ao método descrito em 2.2.2.1.

Através da análise dos HPLC's do extrato dialisado com pepsina, figura 27, e do extrato 1 com pepsina, figura 26, é perceptível que existe uma diminuição da absorvância dos picos máximos relativamente ao extrato inicial, isso deve-se a uma diminuição significativa da quantidade de fenóis/mg de extrato presentes no dialisado com pepsina em relação ao extrato com pepsina. Na figura 26 (extrato dialisado com pepsina) é visível que a pepsina não foi eficiente na recuperação dos compostos a partir do extrato inicial (figura 16).

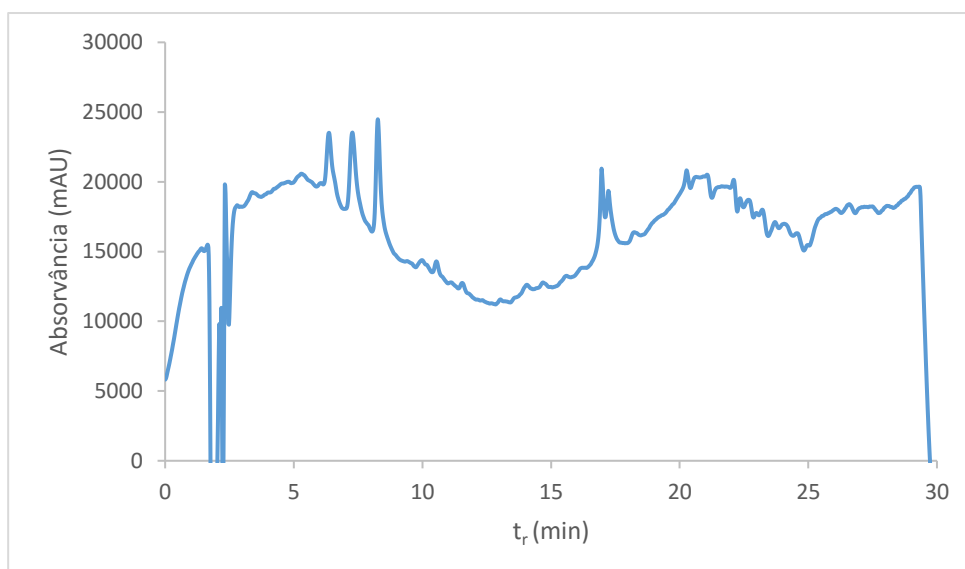


Figura 26 - Perfil cromatográfico do extrato 1 com pepsina (1 mg/mL), obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (*Persea americana*). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.2

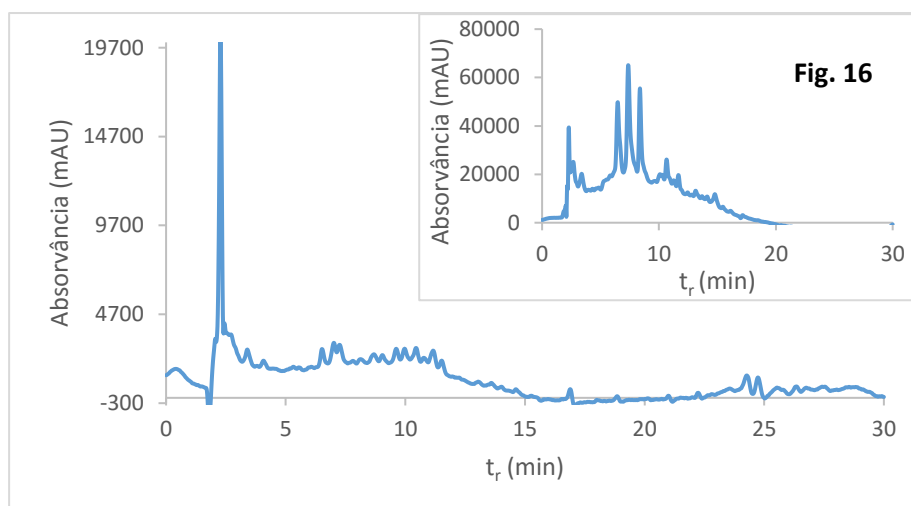


Figura 27 - Perfil cromatográfico do dialisado com pepsina (1 mg/mL), obtido por HPLC. O método usado no HPLC é o descrito em 2.2.6.2.

Este método não demonstrou ser vantajoso, pois não se conseguiu recuperar os fenóis e taninos presentes no extrato 1 neste caso também se mostrou ser difícil de secar o dialisado.

Os picos maioritários do extrato 1, encontram-se presentes no dialisado obtido através da diálise a pH ácido, contudo não houve um aumento da concentração dos mesmos. No dialisado com pepsina, obtido através da digestão gástrica com pepsina, houve a recuperação dos compostos A e B, contudo não se verificou um aumento da concentração. (tabela 6).

Tabela 6 - Valores obtidos para o cálculo da razão entre a área dos picos existentes no extrato 1 inicial e dos existentes no dialisado e no dialisado com pepsina. N.Q. significa não quantificado.

Pico	Área do pico do extrato 1 (%)	Área do pico do dialisado relativamente à área do pico correspondente, do extrato 1 (%)	Área do pico do dialisado com pepsina, relativamente à área do pico correspondente, do extrato 1 (%)
A	100	21,10	68,32
B		3,40	3,10
C		0,95	N.Q.
D		2,50	N.Q.

3.2.2 Precipitação com Etanol

Uma vez que as diálises com e sem pepsina, em nada favoreceram o enriquecimento do extrato em compostos fenólicos, e como a matéria seca tem uma elevada massa em fibras ^[2] recorreu-se ao método de precipitação com etanol. Neste método utilizou-se o extrato 3, porque dos três extratos é o mais bioativo. A utilização deste método tem como objetivo a separação dos compostos fenólicos das fibras, obtendo-se assim duas fases o precipitado e o sobrenadante. No precipitado encontram-se as fibras que são uma mistura de polissacáridos, que estão presentes em diversas plantas, no sobrenadante encontram-se os compostos fenólicos. Ao haver a desagregação das fibras dos compostos fenólicos vai haver uma diminuição de interferentes nos métodos de doseamento. ^[49]

Este método teve como vantagem, o facto de se conseguir secar o sobrenadante e o precipitado obtidos.

Tabela 7 - Fenóis totais, taninos e EC₅₀ presentes no Extrato 3, no precipitado e no sobrenadante. O método de doseamento dos fenóis totais usado é o descrito no ponto 2.2.3.1, o dos taninos é o apresentado em 2.2.3.2 e o EC₅₀ da atividade antioxidante, DPPH, apresentado em 2.2.4.1.

	Fenóis (µg de fenóis/mg de extrato)	Taninos (µg/mg de extrato)	EC ₅₀ (µg/mL)
Extrato 3	53,03 ± 6,12	38,48 ± 1,74 × 10 ⁻³	48,86 ± 1,71
Precipitado	4,20 ± 0,27	11,37 ± 2,88 × 10 ⁻⁴	a
Sobrenadante	69,28 ± 0,71	36,96 ± 2,79 × 10 ⁻³	51,45 ± 1,09 × 10 ⁻³

a) Obteve-se 7,2% de inibição para 10 mg/mL

Através dos dados apresentados na tabela 7 acerca da precipitação com etanol, conclui-se que este método de purificação do extrato é mais eficaz, uma vez que no sobrenadante obteve-se mais compostos fenólicos do que os presentes no extrato 3, e conseguiu-se recuperar os taninos quase na totalidade. Na figura 28 é possível observar-se o cromatograma do sobrenadante recuperado após o processo de purificação, verificando-se um aumento dos picos máximos de absorvância, indicativo também que a precipitação em etanol é um bom meio de extração de fenóis e taninos. Apesar de ainda haver fenóis, de forma muito residual relativamente à quantidade recuperada (e não que ainda há) como se pode observar na figura 29 e taninos presentes no precipitado, pode afirmar-se que estes foram extraídos com sucesso,

uma vez que houve a diminuição da absorvância dos picos, ou seja, a quantidade dos compostos diminuiu em relação ao extrato inicial. (Figura 29).

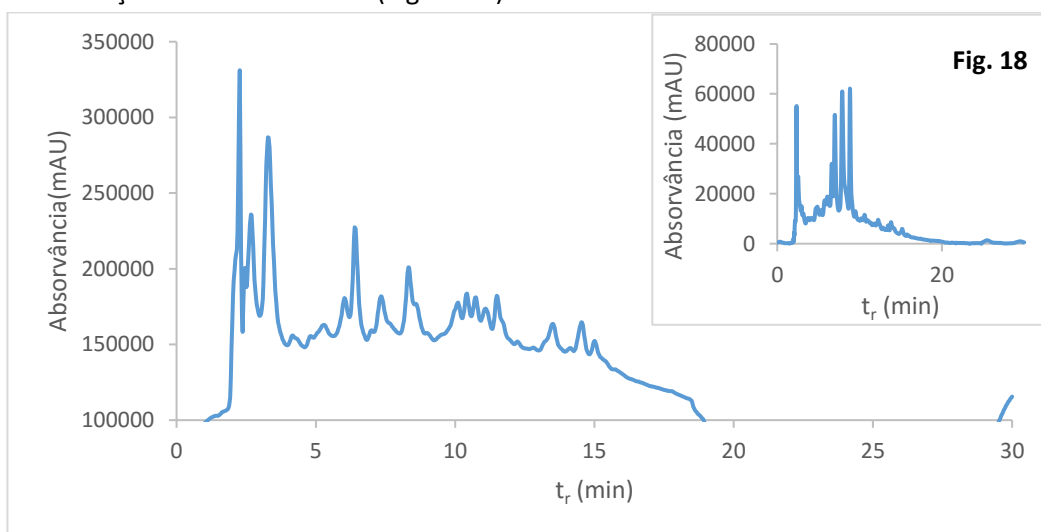


Figura 28 - Perfil cromatográfico do sobrenadante do extrato 3 da casca da pêra abacate (1 mg/mL), obtido por HPLC. O método usado no HPLC é o descrito em 2.2.6.2

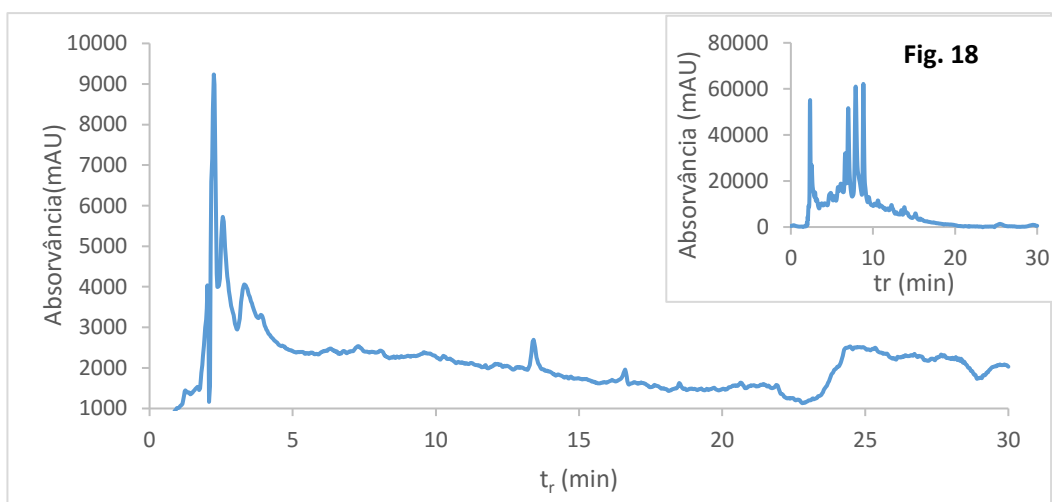


Figura 29 - Perfil cromatográfico do precipitado do extrato 3 da casca da pêra abacate (1 mg/mL), obtido por HPLC. O método usado no HPLC é o descrito em 2.2.6.2

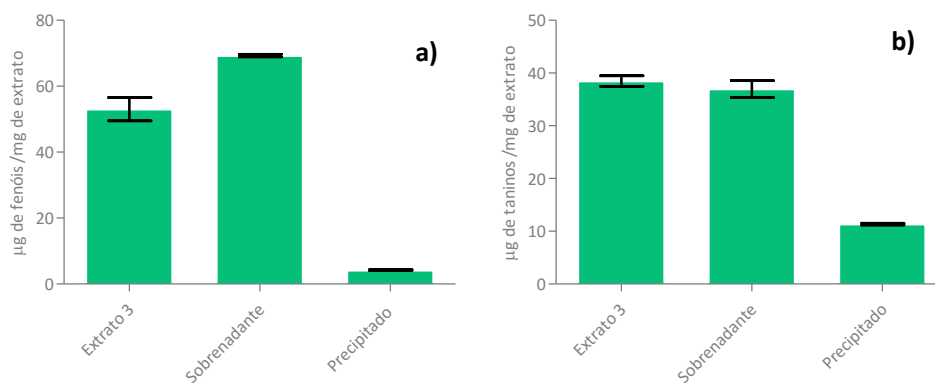


Figura 30 - a) Comparação dos fenóis presentes no extrato 3, no precipitado e no sobrenadante. O procedimento para a quantificação dos fenóis é o descrito em 2.2.3.1. b) Comparação dos taninos presentes no extrato 3, no sobrenadante e no precipitado. O procedimento aplicado para a quantificação dos taninos é o descrito em 2.2.3.2.

Aplicando o teste-t aos valores de fenóis totais/mg de extrato, apresentados na figura 30-a), obtém-se valores de $P < 0.05$, indicando que as amostras têm diferenças significativas entre si, o que corrobora com os dados apresentados nas figuras 28 e 29. Comparando o extrato 3 com o sobrenadante em relação aos taninos presentes/mg de extrato obteve-se um valor de $P = 0,46$, o que indica que o sobrenadante não apresenta muitas diferenças em relação ao extrato inicial no que diz respeito à quantidade de taninos. Todavia, comparando o extrato 3 com o precipitado e o sobrenadante com o precipitado obteve-se valores de $p < 0,05$, indicando as diferenças entre as amostras em estudo. Assim sendo, conseguiu-se recuperar o número de taninos no sobrenadante quase na totalidade.

Em alguns estudos os valores obtidos para quantificar os fenóis totais presentes na casca da pêra abacate Hass. Os valores obtidos foram $12,6 \pm 0,3 \mu\text{g}$ de fenóis/mg de extrato^[73] e $25,32 \pm 0,24 \mu\text{g}$ de fenóis/mg de extrato,^[2] em ambas as extrações recorreu-se a solventes orgânicos. No método de extração dos compostos fenólicos, não se recorreu a solventes orgânicos e a quantidade de fenóis recuperada ($53,03 \pm 6,12 \mu\text{g}$ de fenóis/mg de extrato) é muito superior ao apresentado na literatura. No método de precipitação em etanol, usou-se somente um solvente orgânico, o etanol, e o valor de fenóis recuperados foi mais uma vez muito superior ao apresentado na literatura ($69,28 \pm 0,71 \mu\text{g}$ de fenóis/mg de extrato). É assim possível concluir que os métodos de extração usados são melhores, uma vez que demonstraram ser mais eficazes, menos dispendiosos e mais amigos do ambiente.

Uma vez que o método de precipitação em etanol demonstrou ser o mais eficaz na purificação do extrato, registou-se a atividade antioxidante apresentada pelo sobrenadante e o precipitado, com recurso a mais do que um método no cálculo das atividades antioxidantes, de forma a elucidar os mecanismos de atuação na redução do *stress* oxidativo dos compostos recuperados.^[74]

Foi ainda calculada citotoxicidade do extrato 3, do sobrenadante e do precipitado, uma vez que a maioria dos compostos fenólicos recuperada pode ser tóxica, pois no caso da preparação dos extratos, a casca é submetida a 100°C o que pode desencadear reações de oxidação dos compostos levando a formação de compostos altamente tóxicos.^[18] Outra das razões de se calcular a citotoxicidade é que na precipitação em etanol usa-se o etanol que é um solvente orgânico tóxico,^[75] que pode tornar o sobrenadante e o precipitado tóxicos.

No sobrenadante verificou-se um aumento do pico A, face ao extrato 3, contudo o mesmo não se observou no pico E. No precipitado houve um aumento do pico A face ao extrato 3, contudo não se observou a presença de nenhum dos outros três picos maioritários (E, F, G). Não se verificou a presença dos picos F e G no sobrenadante, tendo ocorrido a degradação dos compostos quando foram secos no evaporador rotativo, devido à temperatura da água (45°C) (tabela 8).

Tabela 8 - Valores obtidos para o cálculo da razão entre a área dos picos existentes no extrato 3 inicial e dos existentes no sobrenadante e no precipitado. N.Q. significa não quantificado.

Pico	Área do pico do extrato 3 (%)	Área do pico do sobrenadante relativamente à área do pico correspondente ao extrato inicial (%)	Área do pico do precipitado relativamente à área do pico correspondente ao extrato inicial (%)
A	100	255	250
E		16	N.Q.
F		N.Q.	N.Q.
G		N.Q.	N.Q.

3.3 Atividade antioxidante

Como anteriormente já referido, os antioxidantes têm sido relatados por diminuírem o *stress* oxidativo, que é causador de inúmeras doenças degenerativas, como é o caso do cancro e do Alzheimer por diferentes mecanismos de atuação. Para o cálculo da atividade antioxidante do extrato 3, do sobrenadante e do precipitado, usaram-se os seguintes métodos: ensaio de extinção do radical DPPH (EC_{50}), eliminação do óxido nítrico (NO), a inibição da peroxidação lipídica (TBARS), e a atividade inibitória da *acetilcolinesterase* (IC_{50}).

A quantificação da capacidade de extinção do radical DPPH foi efetuada no extrato 3. Usou-se concentrações de extrato 3 a concentrações entre 0,006 mg/mL e 0,069 mg/mL (figura 31-a), o sobrenadante com concentrações entre 0,03 mg/mL e 0,08 mg/mL (figura 31-b), de forma a poder ocorrer a extinção do radical DPPH, figura 31. Para o extrato 3 (figura 31-a) obteve-se a equação $y = 944,79x + 3,835$, $R^2 = 0,99$, e para o sobrenadante (figura 31-b) obteve-se a equação $y = 996,41x - 1,2652$, $R^2 = 0,98$, onde x = concentração da amostra (mg/mL) e y = % de inibição do radical DPPH.

Como se pode observar na Figura 31 aparentemente o extrato 3 e o sobrenadante têm atividades antioxidante diferentes. A partir das equações obtidas para o extrato 3 e para o sobrenadante, é possível calcular o EC_{50} , que corresponde à quantidade de amostra necessária para inibir 50 % do radical DPPH. Para o extrato 3 obteve-se um valor de $EC_{50} = 48,86 \pm 6,15 \times 10^{-4}$ µg/mL (tabela 9, coluna 2), e para o sobrenadante o valor de $EC_{50} = 51,45 \pm 1,09 \times 10^{-3}$ µg/mL (tabela 9, coluna 2). Uma vez que quanto menor for o valor de EC_{50} , maior vai ser a capacidade antioxidante da amostra, neste método o extrato 3 mostrou ser melhor antioxidante que o sobrenadante. Não foi possível calcular-se o EC_{50} para o precipitado, tendo-se obtido, para 10 mg/mL, inibição de 7,2 % do radical DPPH. Os valores obtidos são muito semelhantes, isso deve-se ao facto de se ter recuperado grande parte dos taninos, contudo os pode afirmar-se que as amostras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

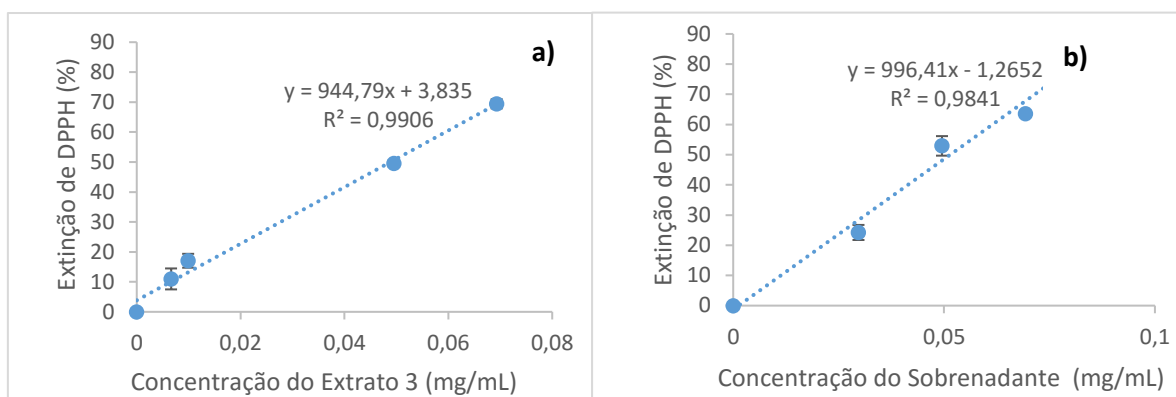


Figura 31 - Capacidade de extinção do DPPH para concentrações crescentes das amostras pelo método 2.2.4.1. a) Extrato 3; b) Sobrenadante.

O efeito protetor exercido pelas frutas e legumes tem sido atribuído à presença de compostos antioxidante, inibindo assim o processo de peroxidação lipídica. [34] A oxidação lipídica de ácidos gordos insaturados nas membranas celular podem causar perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembranares, perda da seletividade na troca iônica, levando à formação de produtos citotóxicos até a morte celular. A peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação reagindo com os radicais peróxido ou alcóxido e, dessa forma, gerando um hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante, como referido anteriormente. [33]

No método da inibição da peroxidação lipídica (TBARS), descrito em 2.2.4.2, usou-se concentrações do extrato 3 entre 0,5 mg/mL e 1,2 mg/mL (figura 32-a) e para o sobrenadante entre 0,1 mg/mL e 0,7 mg/mL (figura 32-b), de forma a inibir o processo de peroxidação lipídica, figura 32. Para o extrato 3 (figura 32-a) obteve-se a equação $y = 51,159x + 2,5855$, $R^2 = 0,97$, e para o sobrenadante (figura 32-b) obteve-se a equação $y = 104,79x + 7,5674$, $R^2 = 0,95$, onde x = concentração da amostra (mg/mL) e y = % de inibição da peroxidação lipídica.

Pode verificar-se pela Figura 32 que com o aumento da concentração aumenta a % de inibição da peroxidação lipídica, no entanto para o extrato atinge-se um patamar a concentrações superiores a 1, enquanto que o sobrenadante apresenta maior capacidade inibitória para concentrações inferiores.

A partir das equações obtidas para o extrato 3 e para o sobrenadante é possível calcular o EC_{50} , que corresponde à quantidade de amostra necessária para inibir 50% da peroxidação lipídica. Para o extrato 3 obteve-se um valor de $EC_{50} = 829,51 \pm 1,8 \mu g/mL$ (tabela 9, coluna 3) e para o sobrenadante o valor de $EC_{50} = 405 \pm 2,4 \mu g/mL$ (tabela 9, coluna 3). Uma vez que quanto menor for o valor de EC_{50} , maior vai ser a capacidade antioxidante da amostra, é possível constatar que o sobrenadante apresenta melhor atividade antioxidante que o extrato 3. Não foi possível calcular-se o EC_{50} para o precipitado, pois como a quantidade de antioxidantes é muito diminuta no precipitado, não se conseguiu obter um valor coerente.

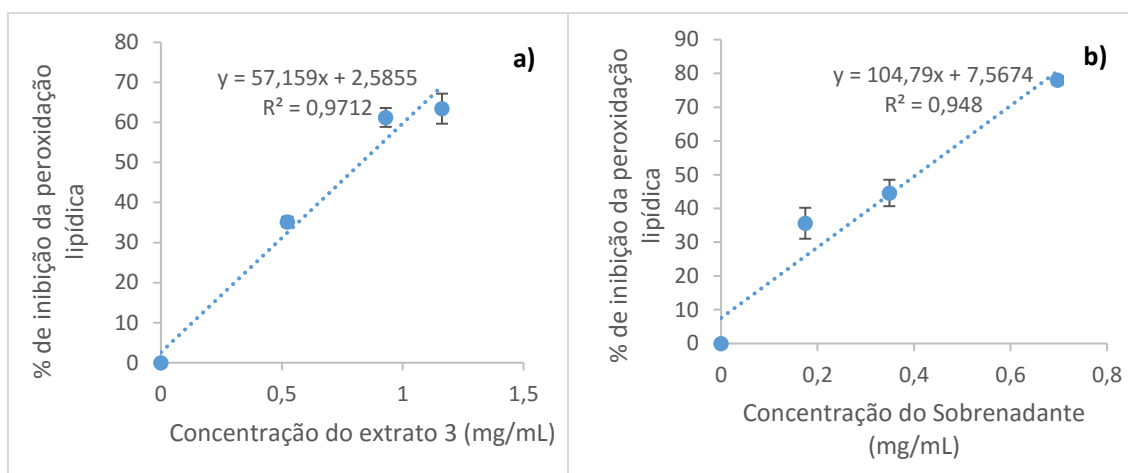


Figura 32 - Capacidade de inibição da peroxidação lipídica para concentrações crescentes das amostras, pelo método 2.2.4.2. **a)** Extrato 3; **b)** Sobrenadante.

Os antioxidantes apresentam efeitos benéficos nas doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias crônicas associadas com o óxido nítrico (NO), como referido anteriormente.^[34] Os compostos fenólicos comuns, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, isoflavonas e antocianinas, presentes nas frutas têm sido investigados quanto aos seus efeitos sobre a produção de NO. Desta forma estudou-se a capacidade das amostras como antioxidante, na captura do NO, procedimento descrito em 2.2.4.3.

Usaram-se concentrações de extrato 3 entre 2 mg/mL e 4,2 mg/mL (figura 33-a) e para o sobrenadante entre 0,01 mg/mL e 0,22 mg/mL (figura 33-b), de forma a inibir o NO, figura 33. Para o extrato 3 (figura 33-a) obteve-se a equação $y = -2,9807x^2 + 24,857x + 0,0763$, $R^2 = 0,99$, e para o sobrenadante (figura 33-b) obteve-se a equação $y = -1422,6x^2 + 524,38x + 5,2987$, $R^2 = 0,96$, onde x = concentração da amostra (mg/mL) e y = % de inibição do NO. As concentrações utilizadas no sobrenadante são muito inferiores as do extrato, indicando que existe um aumento da captura de NO.

A partir das equações obtidas para o extrato 3 e para o sobrenadante é então possível calcular o EC_{50} , que corresponde à quantidade de amostra necessária para inibir 50% de NO. Para o extrato 3 obteve-se um valor de $EC_{50} = 3371,5 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$ (tabela 9, coluna 4), e para o sobrenadante o valor de $EC_{50} = 133,85 \pm 3,17 \mu\text{g/mL}$ (tabela 9, coluna 4). Uma vez que quanto menor for o valor de EC_{50} , maior vai ser a capacidade antioxidante de captação do radical NO da amostra, é possível constatar que o sobrenadante apresenta melhor atividade antioxidante que o extrato 3. Neste método também não foi possível calcular o valor de EC_{50} para o precipitado, pois como a quantidade de antioxidantes é muito diminuta no precipitado, não se conseguiu obter um valor coerente.

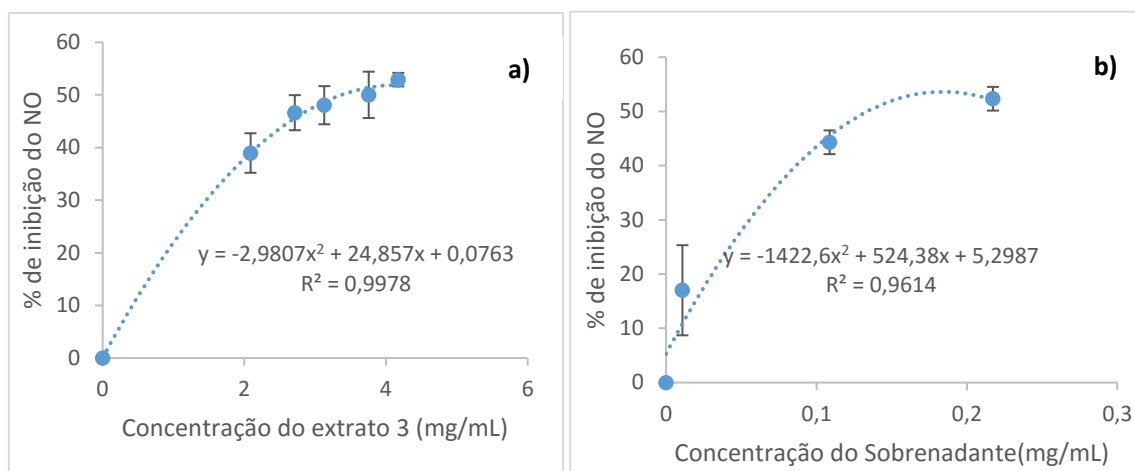


Figura 33 - Capacidade de inibição do NO para concentrações crescentes das amostras, pelo método 2.2.4.3. **a)** Extrato 3; **b)** Sobrenadante.

No método da atividade inibitória da acetilcolinesterase- AChE, (descrito em 2.2.4.4) usaram-se concentrações de extrato 3 e sobrenadante entre 2 mg/mL e 4 mg/mL, de forma a poder ocorrer a inibição da AChE, figura 34. Para o extrato 3 (figura 34-a) obteve-se a equação $y = 0,6523x^2 + 14,607x + 0,2413$, $R^2 = 0,99$, e para o sobrenadante (figura 34-b) obteve-se a equação $y = -2,2655x^2 + 25,111x - 0,0017$, $R^2 = 0,1$, onde x = concentração da amostra (mg/mL) e y = % de inibição da AChE.

Pode verificar-se pela figura 34, que com o aumento da concentração aumenta a percentagem de inibição da AChE, no entanto sobrenadante atinge-se um patamar a concentrações superiores a 3, enquanto que o extrato apresenta menor capacidade inibitória para concentrações inferiores.

A partir das equações obtidas para o extrato 3 e para o sobrenadante, é possível calcular o IC_{50} , que corresponde à quantidade de amostra necessária para inibir 50 % da acetilcolinesterase. Para o extrato 3 obteve-se um valor de $IC_{50} = 3003,6 \pm 1,5 \mu g/mL$ (tabela 9, coluna 5), e para o sobrenadante o valor de $IC_{50} = 2602,09 \pm 1,45 \mu g/mL$ (tabela 9, coluna 5). Uma vez que quanto menor for o valor de IC_{50} , maior vai ser a capacidade antioxidante da amostra, neste método sobrenadante mostrou ser melhor antioxidante que o extrato 3. Não foi possível calcular-se o IC_{50} para o precipitado, tendo-se obtido, para 15 mg/mL, inibição de $6,4 \pm 4$ % da AChE.

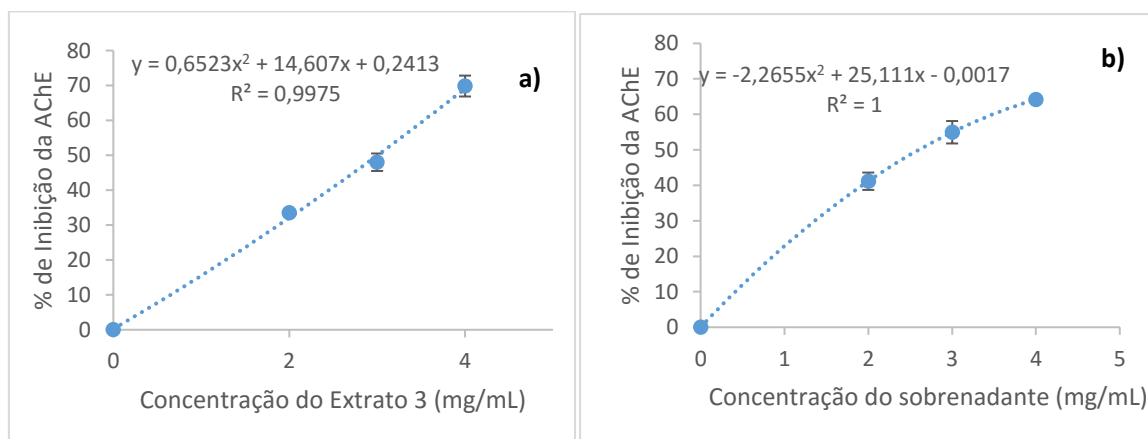


Figura 34 - Capacidade de inibição da AChE para concentrações crescentes das amostras, pelo método 2.2.4.4. **a)** Extrato 3; **b)** Sobrenadante.

Os resultados obtidos nos diferentes métodos de análise da prevenção do *stress* oxidativo estão resumidos na tabela 9.

Tabela 9 – Atividade antioxidante do extrato 3, do precipitado e do sobrenadante. O método utilizado para o cálculo do EC_{50} encontra-se de acordo com o descrito em 2.2.6. O método utilizado no cálculo do IC_{50} está descrito no ponto 2.2.9. O método utilizado no cálculo dos TBARS está de acordo com o descrito em 2.2.10. O método utilizado no cálculo dos NO está descrito no ponto 2.2.11. N.D. significa não definido.

	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	TBARS ($\mu\text{g/mL}$)	NO ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} da AChE ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato 3	$48,86 \pm 6,15 \times 10^{-4}$	$829,51 \pm 1,80$	$3371,51 \pm 2,73$	$3003,60 \pm 1,52$
Precipitado	a	N.D.	N.D.	b
Sobrenadante	$51,45 \pm 1,09 \times 10^{-3}$	$405,10 \pm 2,42$	$133,85 \pm 3,17$	$2602,09 \pm 1,45$

a) $7,16 \pm 3,7$ % de inibição do radical DPPH- Valor obtido para 10 mg/mL

b) $6,42 \pm 3,79$ % de inibição da AChE - Valor obtido para 15 mg/mL

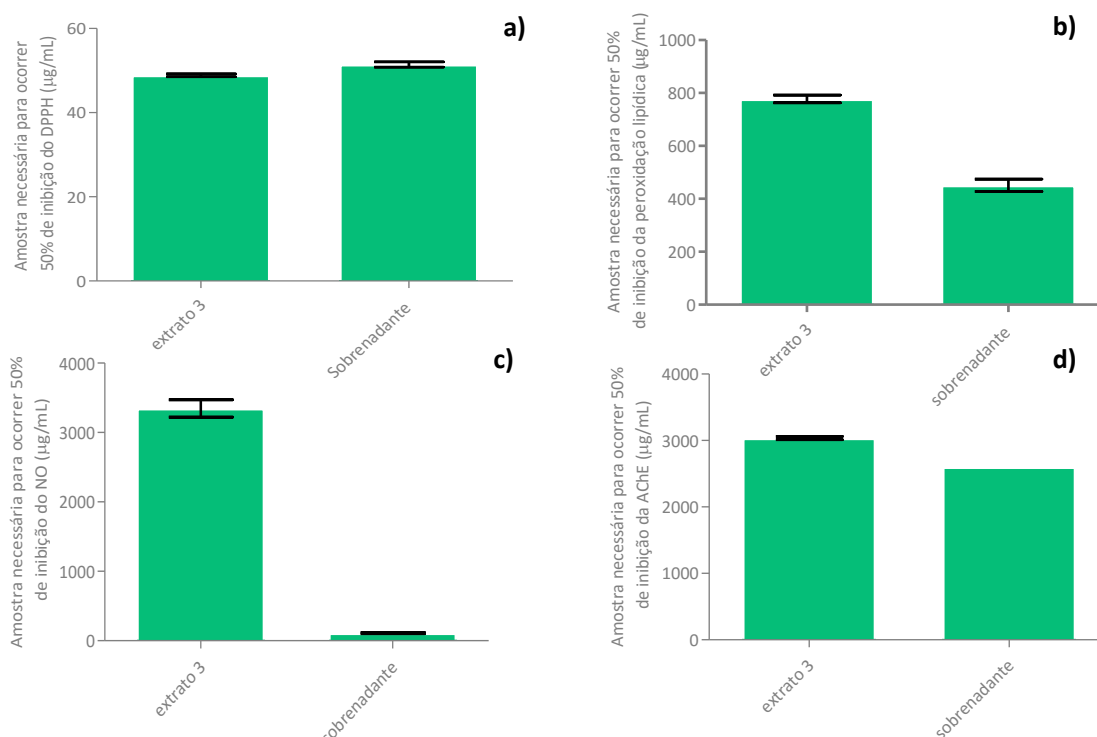


Figura 35 - Comparação da capacidade antioxidante das amostras, nos diferentes métodos de cálculo da atividade antioxidante. **a)** método do DPPH – EC_{50} , descrito em 2.2.4.1; **b)** método da peroxidação lipídica – TBARS, descrito em 2.2.4.2; **c)** método da captura do óxido nítrico – NO, descrito em 2.2.4.3; **d)** método da atividade inibitória da acetilcolinesterase – IC_{50} , descrito em 2.2.4.4.

De forma a comparar-se os valores obtidos para o extrato 3 e para o sobrenadante, nos diferentes métodos de cálculo da atividade antioxidante, aplicou-se o teste-t. Para todos os métodos o valor de $P < 0,05$ pode dizer-se que existem diferenças na atividade antioxidante do extrato inicial em relação ao sobrenadante. No método do DPPH verificou-se que o extrato 3 apresenta uma atividade antioxidante superior à do sobrenadante, contudo isso já não se verifica nos outros métodos, daí se ter recorrido a mais do que um método de cálculo da atividade antioxidante, diminuindo assim as interferências e conclusões erradas que se

pu dessem retirar, assim sendo é possível afirmar que o sobrenadante apresenta melhor atividade antioxidante do que o extrato 3. Os valores apresentados para a inibição do NO pelo sobrenadante, são muito superiores ao apresentado pelo extrato, esse aumento devesse ao aumento de compostos fenólicos no sobrenadante.

3.4 Citotoxicidade

De forma a perceber-se se os compostos presentes no extrato 3, no sobrenadante, e no precipitado são tóxicos, estudou-se a sua citotoxicidade, com recurso ao teste do MTT, nas células HepG-2, que simulam o metabolismo do fígado. [76] O uso do reagente MTT e tem como objetivo determinar a viabilidade das células quando em contacto com concentrações crescentes dos extratos e determinar o IC₅₀ dos vários extratos, ou seja, a concentração na qual a viabilidade celular é reduzida em 50%. Assim sendo, este estudo permitiu determinar a concentração, das amostras, que é tóxica para as células HepG-2, uma vez que as células HepG-2 podem ser usadas como modelo de estudo de hepatotoxicidade. [76]

Obteve-se as curvas da relação entre a variação da concentração, de cada uma das amostras, com % de citotoxicidade apresentada, figura 36. O procedimento aplicado é o descrito em 2.2.5.

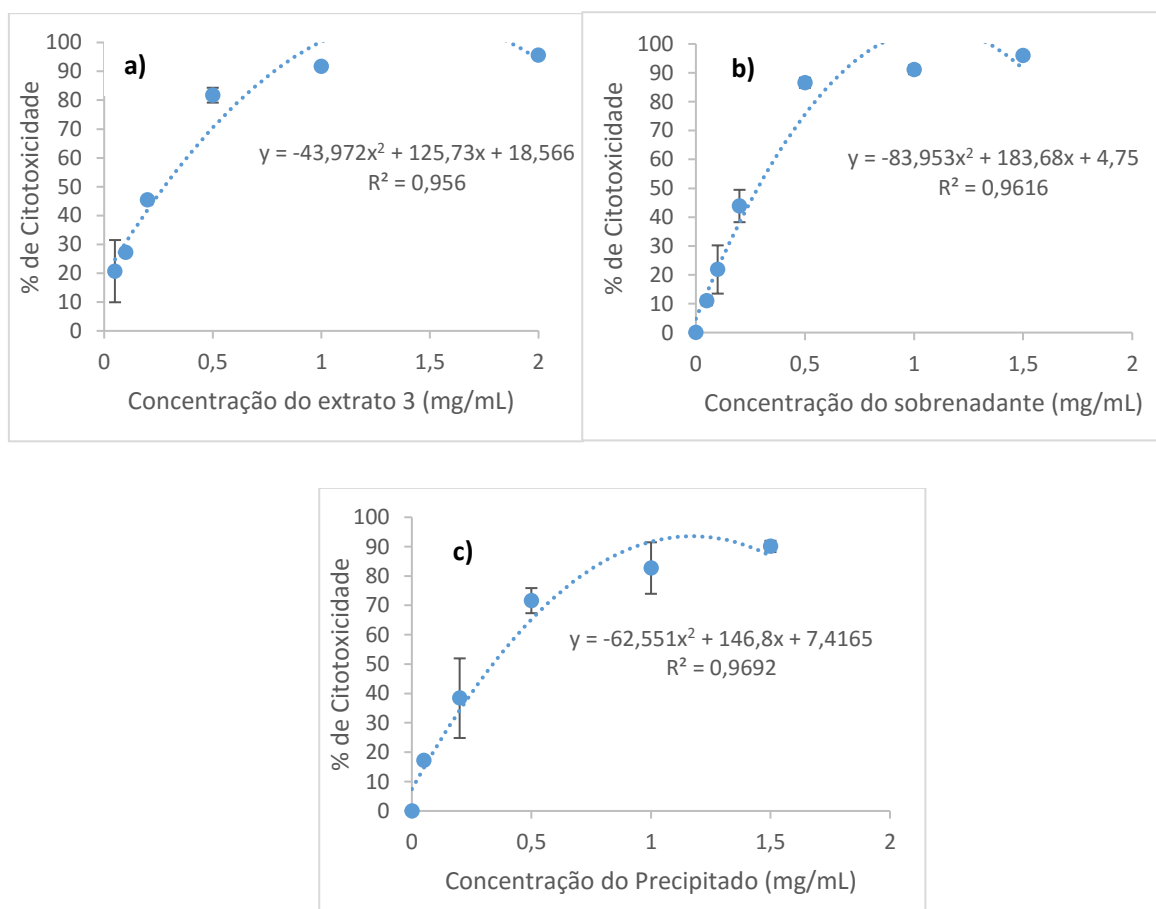


Figura 36 - % de citotoxicidade apresentada pelas amostras, pelo método 2.2.5 a) Extrato 3; b) Sobrenadante; c) Precipitado

Na figura 36 é notório que se atinge um patamar de cerca de 80 % de citotoxicidades apenas para concentrações de amostra a analisar superiores a 0,5 mg/mL. Calculou-se o IC_{50} , para cada uma das amostras, ou seja, a concentração de amostra necessária para que a viabilidade celular seja reduzida a 50 %. Das equações apresentadas na figura 36, sabe-se que x = concentração da amostra (mg/mL) e y =% de citotoxicidade das amostras.

Os valores de IC_{50} calculados para as 3 amostras, encontram-se na tabela 10. Os valores de IC_{50} obtidos foram superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$, logo é possível afirmar que nenhuma das amostras é tóxica, pois segundo a literatura se o valor de $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$.^[77]

Tabela 10 – Citotoxicidade, nas células HepG-2, do extrato 3, do precipitado e do sobrenadante. O método utilizado é o que se encontra descrito no ponto 2.2.14.

	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato 3	276,81 \pm 3,50
Precipitado	339,13 \pm 4,72
Sobrenadante	282,40 \pm 2,81

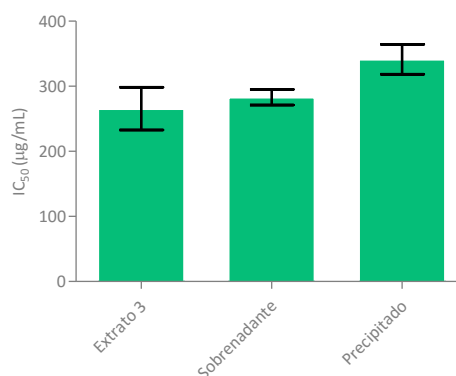


Figura 37 – Comparação dos valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para cada uma das amostras.

Comparando os valores de IC_{50} do extrato 3 com o sobrenadante, pelo teste-t, obtém-se um valor de $P = 0,6$, comparando o extrato 3 com o precipitado obteve-se um valor de $P = 0,13$ e comparando o sobrenadante com o precipitado obteve-se $P = 0,08$. Uma vez que o valor de $P < 0,05$ para os três casos, pode afirmar-se que estes não apresentam diferenças significativas em termos toxicológicos, o que é ótimo, pois apesar de se ter usado um solvente orgânico tóxico na precipitação em etanol, conseguiu-se reduzir de forma significativa a sua toxicidade através das lavagens feitas com água.

Tendo em conta os resultados obtidos através do estudo da citotoxicidade nas células HepG-2, células cancerígenas do fígado, é possível concluir-se que a casca da pêra abacate não apresenta uma toxicidade que seja prejudicial à saúde humana. Logo, o aproveitamento das cascas deve de ser tido em conta na indústria alimentar, na farmacêutica e na cosmética.

3.5 Identificação dos Compostos

A precipitação em etanol fez com que os compostos fenólicos presentes no extrato da casca da pera abacate e que aparentemente estavam que estavam agregados às fibras fossem recuperados o com sucesso no sobrenadante pela metodologia de purificação de precipitação com etanol, o que simplificou a identificação dos compostos. Os compostos preliminarmente foram identificados com recurso ao FTIR, e depois a LC-MS.

3.5.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que estuda as vibrações dos átomos de uma molécula, ou seja, a espectroscopia vibracional resulta da deteção e identificação das vibrações entre átomos ligados entre si.

Existem diferentes tipos de modos normais de vibração das moléculas, estes dividem-se na elongação /estiramento e na flexão/deformação angular.

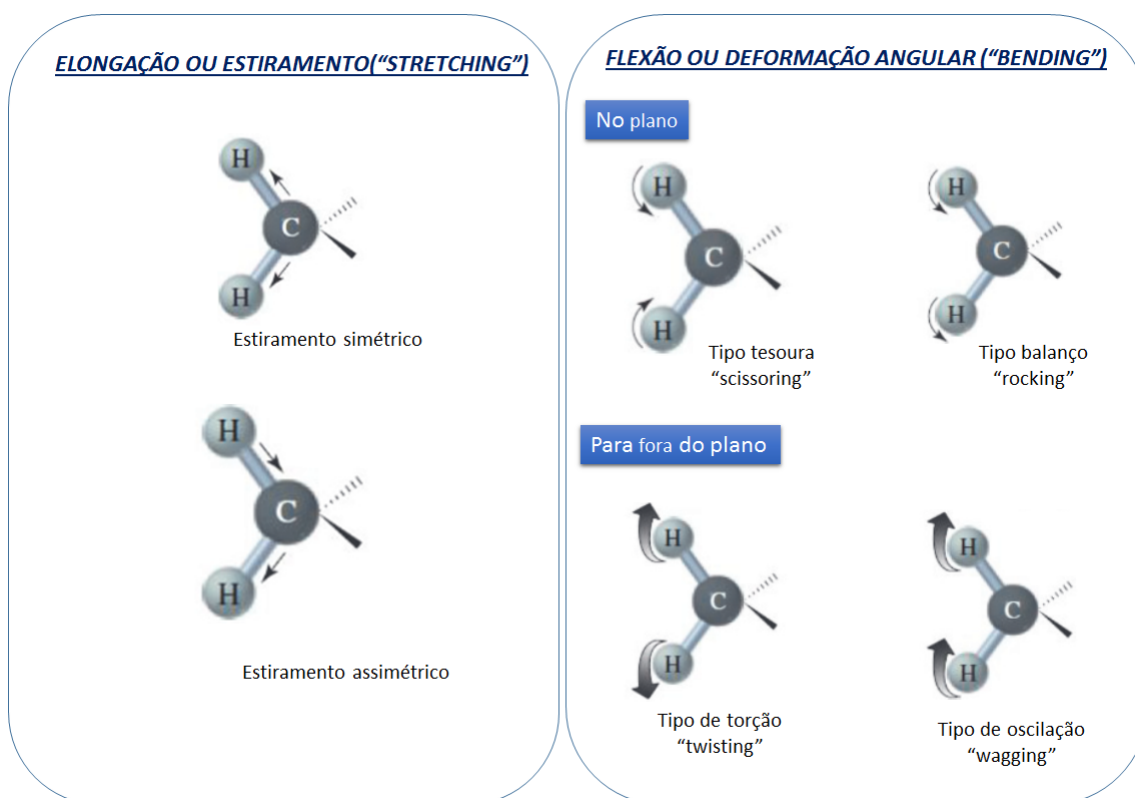


Figura 38 - Tipos de modos vibracionais

As bandas de absorção detetadas num espectro de FTIR são verdadeiras "impressões digitais" das moléculas analisadas, podendo estudar-se amostras em fase líquida, gasosa e sólida.^[46]

A atribuição de bandas mais características ($4000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) às vibrações dos grupos funcionais da molécula pode ser efetuada recorrendo a tabelas de frequência de grupos, permitindo a caracterização química da amostra (hidrocarboneto, álcool, ácido, aldeído, amina,

etc.). Em geral para se chegar à verdadeira estrutura de um composto é necessário comparar o espectro de infravermelho (IV) da amostra com espectros de referência (biblioteca de espectros).

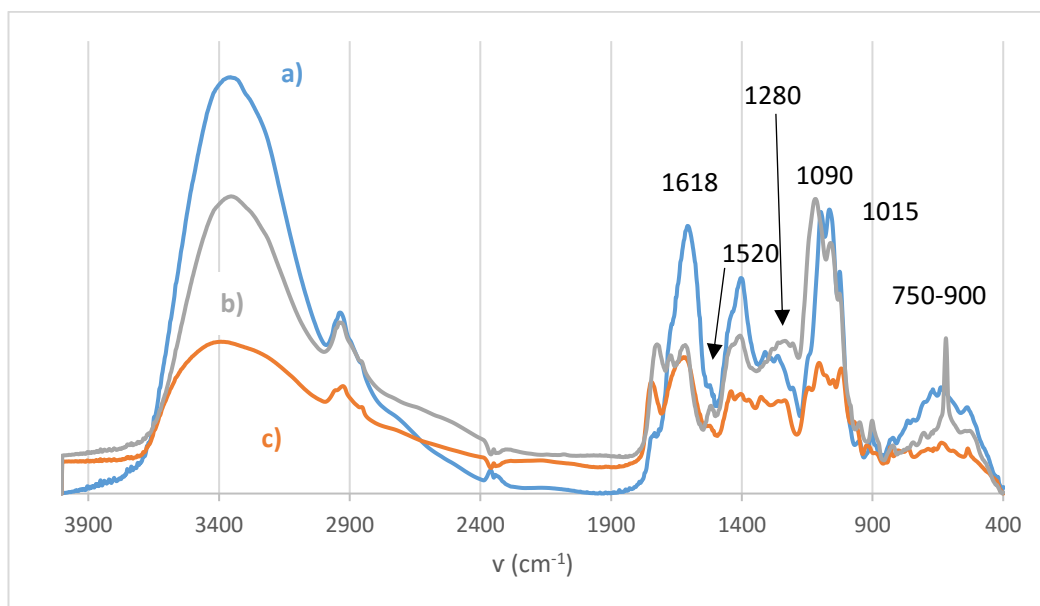


Figura 39 – Sobreposição dos espectros de IV das três amostras, obtidos por FTIR. O método usado no FTIR está de acordo com o descrito em 2.2.6.1. **a) Extrato 3**; **b) Sobrenadante**, **c) Precipitado**.

Na Figura 39, encontram-se sobrepostos os espectros do extrato, do sobrenadante e do precipitado obtidos na purificação na região de 4000-400 cm^{-1} .

De uma forma geral, a comparação destes espectros revela uma elevada semelhança espectral com o aparecimento em todas as amostras analisadas de bandas de absorção nas frequências assinaladas na Figura 39, no entanto com diferentes intensidades. À frequência 3400 cm^{-1} é visível uma banda larga e intensa característica das vibrações de alongamento das ligações -OH presentes em variados compostos como nos polissacáridos e nos compostos fenólicos. A banda aos 2921 cm^{-1} com um pequeno ombro a 2860 corresponde à vibração simétrica e assimétrica de alongamento das ligações C-H nos grupos CH_2 e CH_3 das cadeias alifáticas de polissacáridos e alguns compostos fenólicos como os taninos. A presença de uma banda a 1716 cm^{-1} é característica de ligações éster do grupo C=O presente em alguns compostos fenólicos.

À frequência 1618 cm^{-1} e aos 1520 cm^{-1} encontram-se bandas características da vibração do grupo C=O , de C=C , e outras vibrações características de anéis aromáticos dos compostos fenólicos. São visíveis também a 1280, 1090 e a 1015 cm^{-1} , características das vibrações simétricas e assimétricas das ligações C-O dos compostos fenólicos e taninos. Estes resultados estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 – Grupos funcionais presentes nas amostras e o número de onda correspondente.

Número de onda (cm^{-1})	Grupos funcionais	Onde se encontra	Referencia
3400	Estiramento do grupo OH em polissacáridos	Extrato 3 e precipitado	[78]
3627-2971	Estiramento do grupo OH da água e do etanol	Extrato 3, precipitado e sobrenadante	[79]
2921	estiramento C-H do CH_2	Extrato3, sobrenadante e precipitado	[78]
1712 -1704	Estiramento dos grupos C=O dos compostos aromáticos presentes nos fenóis	Sobrenadante e Precipitado	[79]
1637	elongação C=O de ésteres α,β -insaturados	Extrato 3, sobrenadante e precipitado	[78]
1618; 1520	Estiramento do anel aromático da catequina	Extrato e precipitado	[80]
1609-1608	Estiramento dos grupos C=C dos compostos aromáticos presentes nos fenóis	Extrato 3 e sobrenadante	[79]
1280	Deformação do OH do álcool aromático da catequina	Sobrenadante	[80]
1260-1000	elongação C-O dos álcoois e fenóis	Extrato3, precipitado e sobrenadante	[78]
1376-1373	Flexão no plano dos grupos $-CH_3$ dos fenóis	Sobrenadante, extrato 3 e precipitado	[79]
1340-1339	Flexão dos grupos CH e flexão para fora do plano dos grupos CH_2	Precipitado e sobrenadante	[79]
1300-970	estiramento C-O dos álcoois, ácidos e ésteres	Extrato 3, sobrenadante e precipitado	[78]
1096; 1055	flexão no plano do grupo C-H dos aromáticos	Extrato 3, sobrenadante e precipitado	[78]
1207; 110-1107; 1068-1062	Estiramento do grupo C-O	Extrato 3, sobrenadante e precipitado	[79]
943	flexão O-H dos ácidos carboxílicos	Precipitado e sobrenadante	[78]
896	flexão do grupo C-H dos aromáticos	Sobrenadante	[79]

Na figura 39 estão assinalados os valores das frequências dos picos característicos da catequina.^[80] No extrato e no sobrenadante é possível observar-se alguns dos picos característicos da catequina.. O pico 1618 cm^{-1} diminui substancialmente no sobrenadante, em relação ao extrato, indicando que a quantidade de catequina é menor, contudo as proteínas também absorvem a 1618 cm^{-1} o que contribui para o aumento significativo do pico no extrato. No sobrenadante aparecem os dois picos das catequinas a 1618 e a 1708 cm^{-1} , estando também juntos na região de 1520 e 1490 cm^{-1} .

Em amostras complexas constituídas por uma multiplicidade de compostos, e, portanto, vários grupos funcionais, a obtenção de espectros com inúmeros modos vibracionais dificulta a

identificação por sobreposição de algumas bandas de absorção e deste modo deverá complementar-se esta análise com outras técnicas para a eficiente identificação das espécies químicas presentes. A espectroscopia de FTIR apresenta a vantagem de ser uma técnica rápida e de baixo custo.

Após se ter identificado os grupos presentes nas amostras, procedeu-se à identificação dos compostos por LC-MS.

3.5.2 Espetrometria de Massa - MS

Com recurso à espetrometria de massa, foi possível identificar 10 compostos que estão presentes no sobrenadante da casca da pêra abacate (*Persea americana*) do tipo Hass. Na figura 40 estão representados e numerados, os picos que foram identificados e que cujos compostos identificados estão na Tabela 12. A identificação dos compostos foi feita com recurso a pesquisa bibliográfica de estudos com identificação de compostos e foram usados como padrões o ácido glucónico (pico 1), o ácido quínico (pico 4) e a epicatequina (pico 8) e foi feita a quantificação dos mesmos por HPLC-DAD.

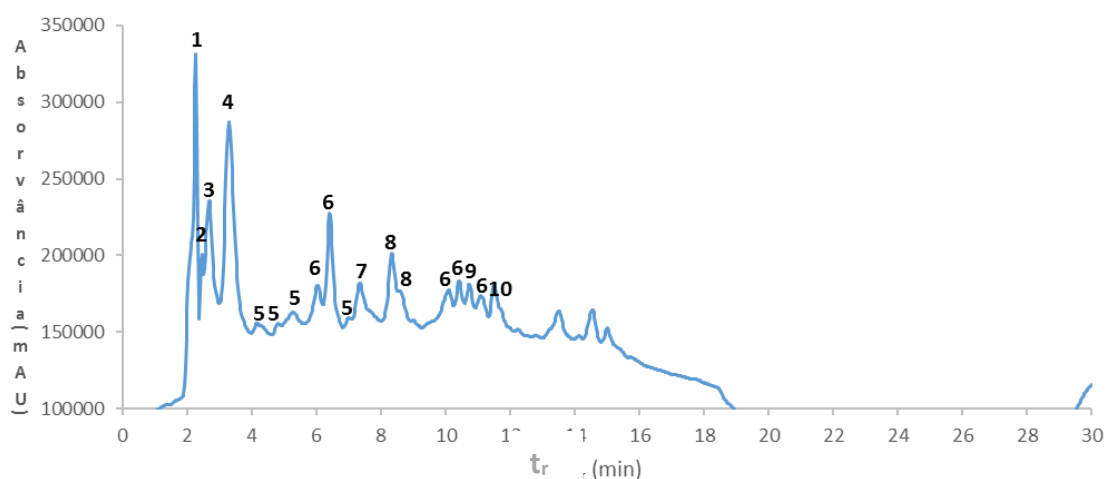


Figura 40 - Perfil cromatográfico do sobrenadante (1mg/mL) , obtido por HPLC, da casca da pêra abacate Hass (*Persea americana*). O método usado no HPLC está de acordo com o descrito em 2.2.6.2.

Em anexo (A.5.1 a A.5.10) encontram-se os esquemas das fragmentações dos compostos identificados assim como os espectros de massa obtidos.

Tabela 12 - Identificação dos compostos presentes no sobrenadante do extrato da casca da pêra abacate (*Persea americana*), do tipo Hass.

pico	t _r (min)	M _w	UV _{máx} (nm)	[M-H] ⁻ m/z	MS ² , m/z, intensidade relativa (%)	Composto
1	2,05	196,16	204	195,03	158,81 (100%); 128,88 (85,42%); 176,86 (51,99%); 194 (18,07%); 110,82 (12,20%); 98,85 (9,68%)	Ácido Glucónico A.5.1
2	2,45	606	205, 261	605,24	573,22 (100%); 415,06 (25,43); 282,93 (30,93%); 264,99 (23,81%); 214,87 (11,83%); 397,04 (10,20%); 262,81 (9,73%)	Dímero epicatequina-etilo A.5.2
3	2,67	648,47	205, 254	647,40	605,31 (100%); 587,21 (92,84%); 415,03 (77,53%); 615,25 (66,26%); 264,95 (41,63%); 529,20 (29,73%); 573,04 (25,71%); 396,96 (23,84%); 189,81 (21%); 485,10 (15,67%); 282,79 (14,93%); 495,06 (14,21%); 391,74 (10,84%); 480,32 (10,80%); 568,46 (10,12%); 363,59 (10,08%); 214,78 (9,19%)	Ácido 3,4,5-Tri-O- galoiquinico A.5.3
4	3,28	192,17	209	191,06	110,87 (100%); 172,77 (38,55%); 128,87 (8,69%)	Ácido quínico A.5.4
5	4,16, 4,83, 5,28, 6,98	866,77	207, 275	865,17	695,07 (100%); 449,17 (56,10%); 781,98 (47,07%); 381,18 (45,54%); 575 (43,22%); 677,15 (40,10%); 424,80 (33,14%); 245,48 (31,71%); 726,69 (26,09%); 243,03 (22,72%); 712,75 (18,23%); 371,91 (22,68%); 806,30 (16,57%); 586,71 (13,34%); 542,84 (11,69%); 467,24 (9,14%)	Procianidina C A.5.5
6	6,02, 6,4, 10,11, 10,43	578,52	206, 267	577,02	407,14 (100%); 425,05 (62,60%); 451,03 (47,20%); 289,03 (25,53%); 245,37 (10,46%); 559,08 (10,17%)	Procianidina B A.5.6
7	7,33	566	207, 283, 323	565,26	419,22 (100%); 550,15 (87,49%); 401,11 (47,47%); 519,28 (34,96%); 373,22 (30,42%); 404,03 (20,98%); 232,90 (20,03); 371,31 (18,41%); 551,07 (14,04%); 386,15 (12,69%); 535,47 (10,50%); 536,23 (10,22%); 355,20 (9,65%); 231,79 (9,28%)	7-Glucosilo-11-metil-oleosido A.5.7
8	8,32, 8,59	290,26	205, 278	289,04	245,15 (100%); 205,02 (32,72%); 179,07 (12,57%); 203,09 (11,17%)	Epicatequina A.5.8
9	10,75	626	206, 267, 349	625,29	300,20 (100%); 301,22 (30,95%); 445,16 (22,01%); 271,40 (15,43%); 299,15 (10,58%)	Quercetina di-hexose A.5.9
10	11,5	596	205, 284, 321	595,21	300,23 (100%); 475,05(14,09%); 445,08 (13,35%); 301,22 (12,01%); 271,14 (9,17%)	Quercetina – O-hexose-O-pentose A.5.10

3.5.2.1 Ácido Glucónico

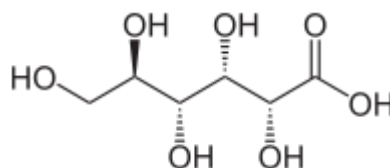


Figura 41 – Ácido Glucónico

O ácido glucónico (figura 41) é um ácido fraco que ocorre durante a decomposição dos polissacáridos, podendo ser encontrado em fruta, mel e vinho. É usado como aditivo alimentar (E574) na regulação da acidez, contudo também é usado no fabrico da cerveja e no leite, pois previne a calcificação. este ácido fraco é um ácido neutro em sabor. ^[81]

Na bibliografia não foi reportada a presença do ácido glucónico na pêra abacate, assim sendo recorreu-se a pesquisa bibliográfica, ^[82] que confirmou que o composto correspondente ao pico 1 trata-se do ácido glucónico. Com recurso ao padrão do ácido quínico, pode-se comprovar a presença do mesmo no extrato, através do espectro UV-Vis obtido.

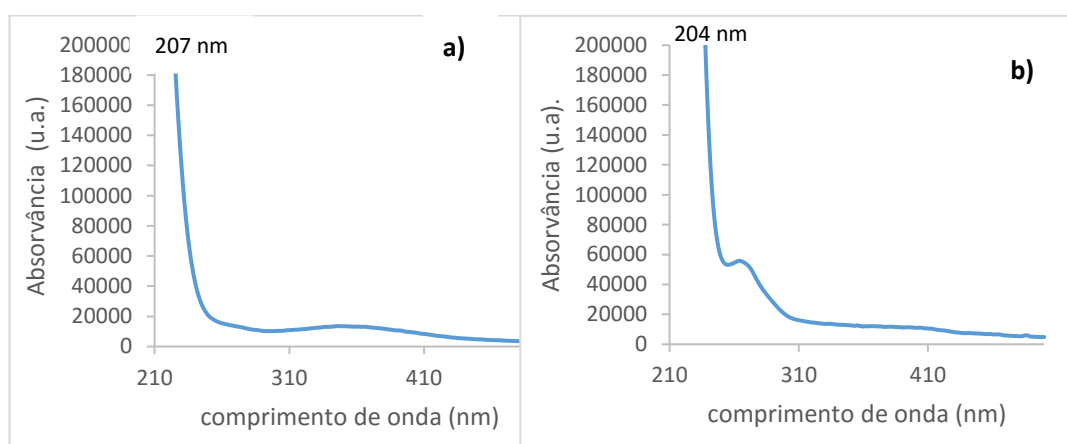


Figura 42 – Espectro UV-Vis do ácido glucónico. a) padrão do ácido glucónico; b) ácido glucónico presente no sobrenadante.

Através do recurso ao padrão do ácido glucónico, fez-se uma reta de quantificação do mesmo, a partir do HPLC-DAD. A reta obtida foi, $y = 108838x + 3546,4$, $R^2 = 0,9$, indicando assim que a quantidade de ácido glucónico presente no sobrenadante é 673,7 µg de ácido glucónico/mg de extrato.

Através do estudo da capacidade antioxidante, tabela 13, do padrão do ácido glucónico, concluiu-se que este apresenta uma atividade antioxidante muito baixa. Contudo, segundo a literatura os ácidos orgânicos, como é o caso do glucónico, podem melhorar sinergeticamente a ação de outros antioxidantes, como os fenólicos. ^[81]

Tabela 13 - Atividade antioxidante do padrão do Ácido Glucónico. O método utilizado para o cálculo do EC_{50} está de acordo com o descrito em 2.2.6. O método utilizado no cálculo dos TBARS está de acordo com o descrito em 2.2.10. O método utilizado no cálculo dos NO está descrito no ponto 2.2.11.

	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Tbars ($\mu\text{g/mL}$)	NO ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido glucónico	5425,4 \pm 0,5	1191,6 \pm 0,04	639,9 \pm 59,3
% de contribuição do ácido glucónico para a atividade antioxidante do sobrenadante	0,6	22,9	7,8

Pelos valores da tabela 13, e comparando os mesmos com os valores da atividade antioxidante, para os diferentes métodos, é possível saber quanto o ácido glucónico contribui para a atividade antioxidante do sobrenadante. Pelo método do DPPH o ácido glucónico vai contribuir em 0,6 % para a atividade antioxidante apresentada pelo sobrenadante neste método, para o método dos TBARS vai contribuir em 22,9 % e no método dos NO contribui em 7,8 %.

3.5.2.2 Dímero epicatequina-etilo

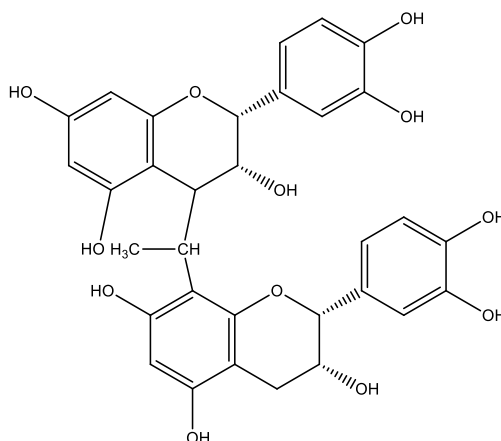


Figura 43 – Dímero epicatequina-etilo

Composto presente no pico 2 foi identificado com recurso a estudos publicados^[83] onde este composto é reportado como estando presente nos caroços de uvas.^[84] Tal como as procianidinas do tipo B, este composto é constituído por duas epicatequinas ligadas entre si, cuja diferença é que estas estão ligadas através de um grupo etilo.

3.5.2.3 Ácido 3,4,5-Tri-*O*-galoilquínico

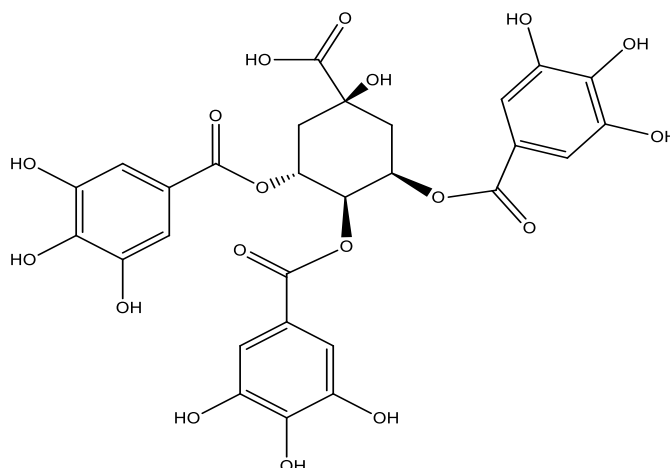


Figura 44 – Ácido 3,4,5-Tri-*O*-galoilquínico

Através de estudos já desenvolvidos pode-se afirmar que o composto do pico 3 corresponde ao ácido 3,4,5-Tri-*O*-galoilquínico. ^[85] Este composto ainda não tinha sido identificado na como um dos constituintes da pêra abacate. Este tanino hidrolisável está presente em diferentes plantas da África, nomeadamente na *Myrothamnus flabellifolius*. A *Myrothamnus flabellifolius* é designada por planta da ressurreição, uma vez que as suas folhas, que aparentam estar mortas, ao apanharem água da chuva ficam logo vistosas. ^[86] Estudos já desenvolvidos a este composto, demonstram que apresenta uma atividade anti-HIV, ^[87] o seu EC₅₀ é 4 µM e o IC₅₀ ^[86] é de 14,2 µM. ^[88] Este tanino para além de apresentar atividade anti-HIV é também um inibidor do DNA polimerase. ^[87]

3.5.2.4 Ácido Quínico

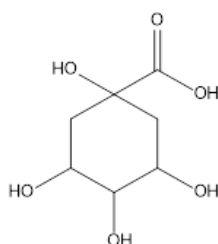


Figura 45 – Ácido Quínico

O ácido quínico (figura 45) pode ser encontrado em grãos de café e em vegetais, porém também pode ser produzido sinteticamente através da hidrólise do ácido clorogénico, que é um bom antioxidante. A acidez que está presente nos grãos de café provém da presença de ácido quínico, o que está relacionado com a presença, na sua estrutura do grupo carboxílico livre do ácido quínico. ^[89]

De acordo com a literatura os ácidos fenólicos, como é o caso do quínico, apresentam uma boa atividade antioxidante, ^[90] contudo a sua solubilidade no sistema lipídico é baixa, o que limita a sua utilização e o potencial antioxidante. ^{[91], [92]} Contudo estes podem sofrer alterações de forma a se tornarem mais lipossolúveis, através de alquilação ou esterificação com ácidos

gordos de cadeia longa ou álcoois, apresentando por vezes atividade antioxidante melhor que o BHT.^[93]

Com recurso ao padrão do ácido quínico, pode-se comprovar a presença do mesmo no extrato, através do espectro UV-Vis obtido. Contudo também foi possível confirmar-se que o pico 4 corresponde ao ácido quínico, através de estudos já publicados, onde demonstram a presença de ácido quínico na pêra abacate.^[94]

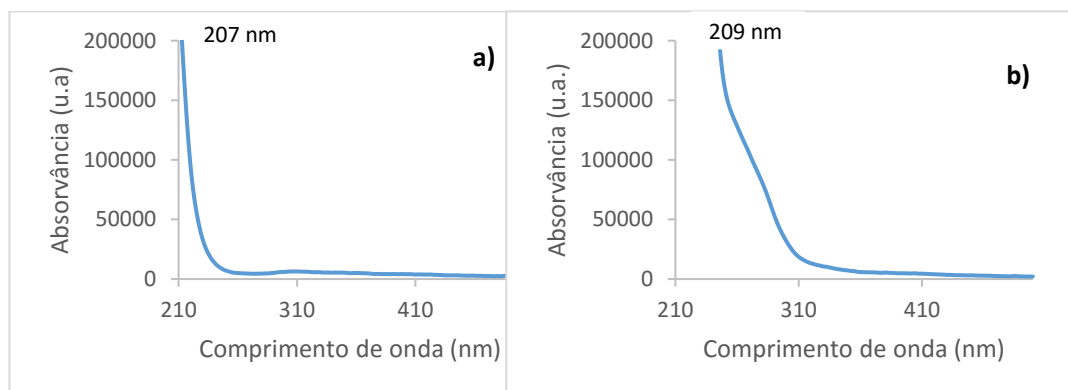


Figura 46 - Espectro UV-Vis do ácido quínico. **a)** padrão do ácido quínico; **b)** ácido quínico presente no sobrenadante.

Através do HPLC-DAD foi possível quantificar a quantidade de ácido quínico presente no sobrenadante. A equação obtida foi $y = 45802x + 2562$, $R^2 = 0,97$, daqui vem que a quantidade de ácido quínico presente no extrato foi 2479,1 μg de ácido quínico/mg de extrato.

Foi feito o estudo da capacidade antioxidante do ácido quínico, através do método do DPPH, dos TBARS e do NO. Nos métodos do DPPH e dos TBARS não se conseguiu obter 50 % de inibição, demonstrando assim que este ácido fenólico não é um bom antioxidante.

Os valores apresentados para o ácido quínico não podem ser tidos em causa, uma vez que o ácido quínico apresenta uma absorvidade muito baixa.

Tabela 14 - Atividade antioxidante do padrão do Ácido Quínico. O método utilizado para o cálculo do EC_{50} está de acordo com o descrito em 2.2.6. O método utilizado no cálculo dos TBARS está de acordo com o descrito em 2.2.10. O método utilizado no cálculo dos NO está descrito no ponto 2.2.11.

	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Tbars ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	NO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Ácido quínico	$5,1 \pm 6,7^a$	$37,5 \pm 4,9^b$	$19,4 \pm 1,3$

a) % de inibição obtida para uma concentração de 1,5 mg/mL

b) % de inibição para uma concentração de 15 mg/mL

Ao quantificar-se a percentagem da contribuição do ácido quínico no método dos NO, para o sobrenadante obteve-se, que o ácido quínico contribuía em 1712,2 %. Como referido anteriormente, este valor não pode ser tido em conta.

3.5.2.5 Procianidinas B e C

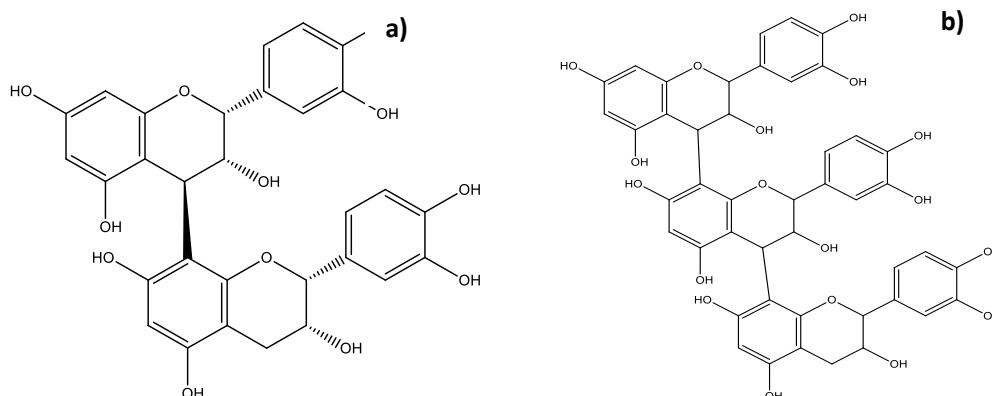


Figura 47 – a) Procianidina B; b) Procianidina C

As procianidinas (figura 47) são outro flavonóide existente na natureza, nomeadamente em frutas e legumes, estas são flavonóides poliméricos, como é o caso do dímero (procianidinas B) e do trímero (procianidinas C). Assim sendo estes dois compostos, vão contribuir para a atividade antioxidante do extrato, tal como a epicatequina, uma vez que as procianidinas são dois ou mais unidades de epicatequina ligadas entre si. [73] As procianidinas B e C já foram identificadas por outros estudos, [94], [73] como estando presentes na pêra abacate.

3.5.2.6 7-Glucosilo-11-metil-oleosido

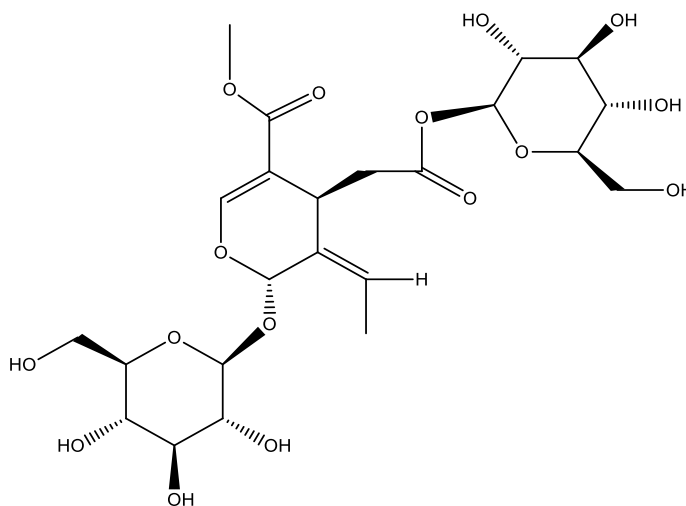


Figura 48 - 7-Glucosilo-11-metil-oleosido

Este composto está presente no jasmim [95] e na pasta de azeitona, [96] ambos apresentam uma atividade antioxidante elevada. [96], [97] O estudo por RMN deste composto está publicado, [98] assim sendo uma forma de confirmar se o composto do pico 7 se trata do 7-Glucosilo-11-metil-oleosido é recolher-se o mesmo e fazer-se o seu estudo por RMN.

3.5.2.7 Epicatequina

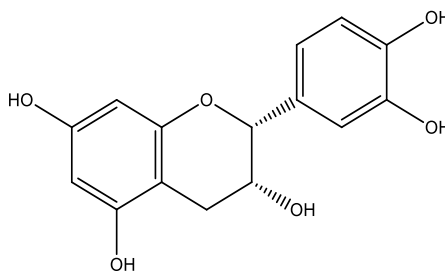


Figura 49 - Epicatequina

A epicatequina é um flavonóide que se encontra presente em frutas e legumes. Os flavonóides apresentam uma atividade antioxidante muito elevada nos seres vivos. As propriedades antioxidantes dos flavonoides devem-se à sua capacidade de capturar radicais livres pela doação dos átomos de hidrogénio fenólicos ^[99] (figura 49).

Apesar de a identificação da epicatequina, como um dos compostos pertencentes à pera abacate, já ter sido feita, ^[94] com recurso a um padrão de epicatequina, conseguiu-se confirmar a presença da mesma no extrato, através do uso do HPLC-DAD.

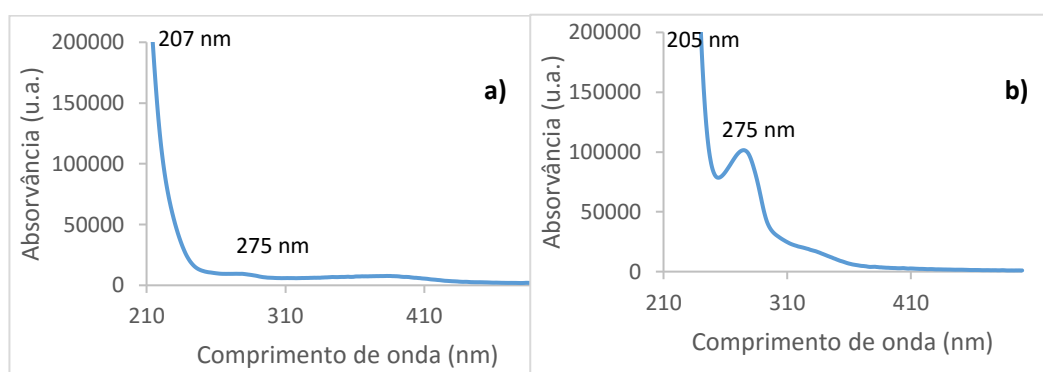


Figura 50 - Espectro UV-Vis da epicatequina. a) padrão da epicatequina; b) epicatequina presente no sobrenadante.

Através do HPLC-DAD pode-se quantificar a quantidade de epicatequina presente no sobrenadante. A equação obtida foi $y = 6 \times 10^6 x - 95,696$, $R^2 = 0,99$, daqui vem que a quantidade de epicatequina presente no extrato foi 6,50 μg de epicatequina/mg de sobrenadante.

Tabela 15 – Atividade antioxidante do padrão de epicatequina. O método utilizado para o cálculo do EC_{50} está de acordo com o descrito em 2.2.6. O método utilizado no cálculo dos TBARS está de acordo com o descrito em 2.2.10. O método utilizado no cálculo dos NO está descrito no ponto 2.2.11.

	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Tbars ($\mu\text{g/mL}$)	NO ($\mu\text{g/mL}$)
Epicatequina	$6,5 \pm 0,0002$	$451,1 \pm 0,04$	109,2
% de contribuição da epicatequina para a atividade antioxidante do sobrenadante	5	0,21	0,4

Pelos valores da tabela 15, e comparando os mesmos com os valores da atividade antioxidante, para os diferentes métodos, é possível saber quanto a epicatequina contribui para

a atividade antioxidante do sobrenadante. Pelo método do DPPH a epicatequina vai contribuir em 5% para a atividade antioxidante apresentada pelo sobrenadante neste método, para o método dos TBARS vai contribuir em 0,21 % e no método dos NO contribui em 0,4%. A epicatequina, apresentou ser um bom antioxidante em todos os métodos, apresentando ter uma capacidade antioxidante superior à do sobrenadante, contudo apesar da contribuição da epicatequina ser pequena para a atividade antioxidante do sobrenadante, esta não deixa de ser importante.

3.5.2.8 Quercetina di-hexose e Quercetina – *O*-hexose-*O*-pentose

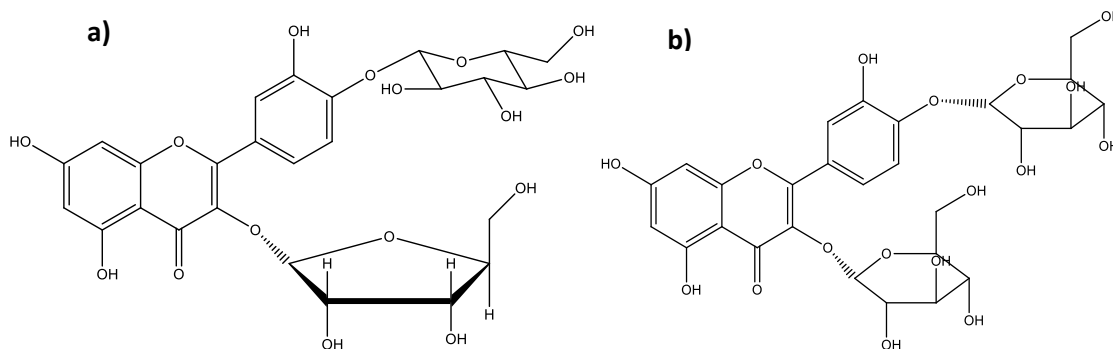


Figura 51 – a) Quercetina – *O*-hexose-*O*-pentose; b) Quercetina di-hexose

Nos picos 9 e 10 foram identificados os compostos quercetina di-hexose e a quercetina – *O*-hexose-*O*-pentose, respetivamente, estes dois compostos ainda não foram reportados como presentes na pêra abacate. Na pesquisa bibliográfica está descrito o comprimento de onda a que estes compostos aparecem, é $\lambda = 236; 303; 326 \text{ nm}$,^[100] tendo em conta os espectros de UV obtidos, é possível afirmar que os compostos dos picos 9 e 10 correspondem à quercetina di-hexose e à quercetina – *O*-hexose-*O*-pentose.

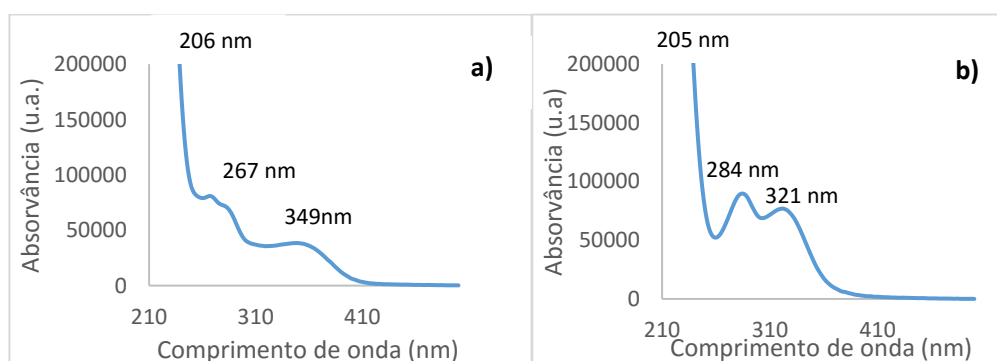


Figura 52 – a) Espectro UV-Vis da quercetina di-hexose; b) Espectro UV-Vis da quercetina – *O*-hexose-*O*-pentose.

Na base destes dois compostos existe um flavonóide que apresenta uma atividade antioxidante muito elevada, que é a quercetina, com $M_r = 302,2 \text{ g.mol}^{-1}$. Em ambos os compostos existe o fragmento m/z 301, quercetina desprotonada, visto que estamos em modo negativo.

Segundo a literatura a capacidade antioxidante da quercetina permite a inibição da peroxidação lipídica. Outro estudo demonstra também que a capacidade de inibição do radical

DPPH deste flavonóide é de 93,27% enquanto que a do BHT é de apenas 45,58%. Logo, a quercitina é um excelente antioxidante. ^[93]

3.5.3 Relevância dos compostos identificados

Da análise da tabela 16 é possível observar que dos compostos quantificados, o ácido glucónico é o que se encontra maioritariamente no sobrenadante da casca da pêra abacate, Hass, sendo a sua contribuição, para as atividades biológicas apresentadas pelo sobrenadante, muito elevada. Os valores obtidos para o ácido quínico não são plausíveis, uma vez que o ácido quínico apresenta uma absorvidade muito baixa, aumentando exponencialmente o erro.

Tabela 16 – Quantidade dos compostos presentes no sobrenadante da *Persea americana* e a sua contribuição biológica. N.D. significa não definido.

	Quantidade no extrato (µg do composto /mg de sobrenadante)	% de Contribuição para as diferentes atividades biológicas		
		EC ₅₀	TBARS	NO
Ácido Glucónico	673,7	0,6	22,9	7,8
Epicatequina	6,5	5,0	0,21	0,4
Ácido Quínico	a	N.D.	N.D.	b

a) Valor obtido foi 2479,1

b) Valor obtido foi 1712,2 %

É de salientar o facto de vários compostos nomeados neste estudo ainda não terem sido identificados na pêra abacate, nomeadamente o ácido glucónico,^[82] o dímero epicatequina-etilo,^[83] o ácido 3,4,5-Tri-*O*-galoilquínico,^[85] o Glucosilo-11-metil-oleosido,^[98] a quercetina – *O*-hexose-*O*-pentose^[100] e a quercetina di-hexose ^[100]. Como já referido, os ácidos orgânicos podem melhorar sinergeticamente,^[81] os compostos fenólicos, como antioxidante, explicando assim o potencial antioxidante demonstrado pelo extrato e pelo sobrenadante.

IV – Conclusão e Perspetivas Futuras

Atualmente, os consumidores estão mais atentos ao que consomem, nomeadamente na qualidade dos alimentos, nas suas características e composição.

A casca das frutas não é muitas vezes utilizada, contudo as suas propriedades e características podem ser interessantes e ser aplicadas com vantagens em diversas áreas, como o estudo desenvolvido neste trabalho demonstra.

O método da decocção ($53,03 \pm 6,12 \mu\text{g}$ de fenóis/mg de extrato) seguido do método de purificação por precipitação em etanol ($69,28 \pm 0,71 \mu\text{g}$ de fenóis/mg de extrato) revelou ser muito eficiente na recuperação dos compostos fenólicos, comparativamente a outros métodos aplicados para a extração e recuperação de fenóis, demonstraram ser muito melhores, pois a quantidade de fenóis recuperados foi superior. Para além disso são métodos amigos do ambiente, pois no caso da decocção utiliza-se água como solvente e na precipitação em etanol utiliza-se etanol, 96%, que apesar de ser tóxico, não é tao tóxico como os solventes que os outros métodos utilizam (ácido clorídrico, metanol, ácido sulfúrico, entre outros).^{[73], [2]}

O sobrenadante ($48,86 \pm 6,15 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$) e o extrato 3 ($51,45 \pm 1,09 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$) apresentam uma excelente atividade antioxidante pelo método da extinção do radical DPPH, isso deve-se à quantidade de fenóis e procianidinas, presentes, estarem diretamente relacionados com a atividade antioxidante.^[73] O EC_{50} do extrato e do sobrenadante revelaram ser melhores antioxidantes do que a vitamina C e os chás verde e preto.^[101]

Do estudo desenvolvido é possível concluir não só que a pêra abacate Hass é um fruto rico em compostos fenólicos cuja atividade antioxidante é elevada, para além da baixa toxicidade apresentada em células tumorais humanas HepG-2. Assim sendo, tanto a casca da pêra abacate como o método de extração de fenóis utilizado, têm um enorme potencial em várias áreas e aplicações.

Através da identificação dos compostos, é possível afirmar que a casca da pêra abacate tem na sua constituição compostos que podem ser encontrados também noutros produtos (plantas, uvas, mel, entre outros), mas os resultados aqui alcançados demonstraram ser mais promissores do que os publicados. Para além disso, com este trabalho foi possível identificar outros compostos, que ainda não tinham sido identificados na pêra abacate, o ácido glucónico,^[82] o dímero epicatequina-etilo,^[83] o ácido 3,4,5-Tri-*O*-galoilquínico,^[85] o Glucosilo-11-metil-oleosido,^[98] a quercetina – *O*-hexose-*O*-pentose^[100] e a quercetina di-hexose^[100]. Contudo, foi também possível confirmar a presença do ácido quínico,^[94] da procianidinas B,^{[94],[73]} da procianidinas C^{[94],[73]} e da epicatequina,^[94] na casca da pêra abacate.

A valorização da casca da pêra abacate, do tipo Hass, é importante, uma vez que permite a diminuição do desperdício alimentar, aumentando, assim, a sua aplicabilidade nas diferentes áreas (cosmética, farmacêutica e alimentar).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram ser bastante promissores, podendo haver uma continuação do mesmo nos seguintes tópicos:

- Separação dos compostos identificados, por cromatografia preparativa de fase reversa, para estudo complementar por RMN com vista a determinação da sua estrutura, e quantificação dos mesmos no extrato;

- Atividade antioxidante dos compostos identificados e estudos *in vivo* dos mesmos;

- Identificação de alguns dos compostos que não foi possível identificar.

V – Bibliografia

- [1] – Fruit and vegetables for health : Report of a Joint FAO/WHO Workshop,1-3 September, 2004, Kobe, Japan.
- [2] – Kosinska, A., Karamac, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., Dykes, G., *Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of Persea americana Mill. Peels and Seeds of Two Varieties*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60, 4613–4619.
- [3] – Oresajo, C., Pillai, S., Manco, M., Yatskayer, M., McDaniel, D., *Antioxidants and the skin: Understanding formulation and efficacy*, Dermatologic Therapy, 2012, 25, 252–259.
- [4] - Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J., Mason, T.J., *Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry*, Ultrasonics Sonochemistry, 2004, 11, 261–265.
- [5] - www.google.pt/search?q=persea+americana - visitado a 7 de Setembro de 2016.
- [6] - Wang, W., Bostic, T., Gu, L., *Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars*, Food Chemistry, 2010, 122, 1193–1198.
- [7] - Shui, G., Leong, L., *Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 2004, 1022, 67–75.
- [8] – Rodríguez-Carpena, J., Morcuende, D., Andrade, M., Kylli, P., Estévez, M., *Avocado (Persea americana Mill) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59, 5625–5635.
- [9] - Bravo, L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*, Nutrition Reviews, 1998, 56, 317–33.
- [10] - Netzel, M., Netzel, G., Tian, Q., Schwartz, S., Konczak, *Sources of antioxidant activity in Australian native fruits Identifications and quantification of anthocyanins*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54, 9820-9826.
- [11] - Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., & Shahidi, F., *Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49, 1410–1416.
- [12] – Shahidi, F., Naczk, M., *Phenolic compounds in fruit and vegetables, Food phenolics: Sources, chemistry, effects, applications*, 1995, 4, 75-107
- [13] - Lu, Q., Arteaga, J., Zhang, Q., Huerta, S., Go, V., Heber, D., *Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substance*, Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16, 23–30.
- [14] - www.revista-fi.com/materias/83.pdf - Visitado a 7 de Setembro de 2016.
- [15] - Akiyama, H, Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, GM., Cooper, NR., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, BL., Finch, CE., Frautschy, S., Griffin, WS., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrazek, R., Mackenzie, IR., McGeer, PL., O'Banion, MK., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, FL., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T., *Inflammation and Alzheimer's disease*, Neurobiology of Aging, 2000, 21, 383-421.
- [16] - Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I., *Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease*, Biol Pharm Bull, 2004, 27, 1965–1969.

- [17] - D'Archivio, M., Filesi, Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*, 2007, 43, 348-361.
- [18] - Soares, E., *Ácidos fenólicos como antioxidantes*, Revista de Nutrição, 2002, 15, 71-81.
- [19] - Neveu, V, Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A., *Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods*, Database, 2010, 2010, 1-9.
- [20] - Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémézy, C., Jiménez, L., *Polyphenols: food sources and bioavailability*, The American Journal of Clinical Nutrition, 2004, 79, 727-747.
- [21] - Bors, W., Heller, W., Michel, C. e Saran, M., *Radical Chemistry of Flavonoid Antioxidants*, Advances in Experimental Medicine and Biology, 1990, 264,165-70.
- [22] - Bate-Smith, EC e Swain, T., *Comparative Biochemistry*, New York, Academic Press, 1962.
- [23] - Guyot, S., Doco, T., Souquet, J.-M., Moutounet, M., Drilleau, J.-F, *Characterization of Highly Polymerized Procyanidins in Cider Apple (Malus Sylvestris Var. Kermerrien) Skin and Pulp*, Phytochemistry, 1997, 44, 351-357.
- [24] - Khanbabaee, K e van Ree, T., *Tannins: Classification and definition*, Natural Product Reports, 2001, 18, 641-649.
- [25] - Santos-Buelga, C., Scalbert, A., *Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80, 1094-1117.
- [26] - Harborne, J. B., Williams, C. A., *Advances in flavonoid research since 1992*, Phytochemistry, 2000, 55, 481-504.
- [27] - Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*, Free Radical Biology and Medicine, 1996, 20, 933-956.
- [28] - Heim, K., Tagliaferro, A., Bobilya, D., *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*, Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13, 572-584.
- [29] - C.M. Liyana-Pathirana, F. Shahidi, C. Alasalvar, *Antioxidant activity of cherry laurel fruit (Laurocerasus officinalis Roem) and its concentrated juice*, Food Chemistry, 2006, 99, 121-128.
- [30] - Gutteridge, JM., Halliwell, B., *Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future*, Annals of the New York Academy of Sciences, 2000, 899, 136-47.
- [31] - Miller, DM., Buettner, GR., Aust, SD., *Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions*, Free Radical Biology & Medicine, 1990, 8, 95-108.
- [32] - Fridovich, I., *Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?*, Annals of the New York Academy of Sciences, 1999, 893, 13-8.
- [33] - Ferreira, I., Abreu, R., *Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos*, Bioanálise, Ano IV, N.º 2, Jul/Dez – 2007
- [34] - Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MT., Mazur, M., Telser, J., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39, 44-84.
- [35] - Resende, R., Moreira, P., Proenca, T., Despande, A., Busciglio, J., Pereira, C., Oliveira, C., *Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimers disease*, Free Radical Biology and Medicine, 2008, 44, 2051-2057.
- [36] - Vinutha, B., Prashanth, D., Salma, K., Sreeja, S., Pratiti, D., Padmaja, R., Radhika, S., Amit, A., Venkateswarlu, K., Deepak, M., *Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity*, Journal of Pharmacology, 2007, 109, 359-363.

- [37] - JUNG, M., PARK, M., *Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from Agrimonia pilosa*, *Molecules*, 2007, 12, 2130-9.
- [38] - Doody, R.S., Gavrilova, S.I., Sano, M., Thomas, R.G., Aisen, P.S., Bachurin, S.O., Seely, L., and Hung, D., *Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: A randomised, double-blind, placebo-controlled study*, *The Lancet*, 2008, 372, 207–215.
- [39] - Abou-Donia, M., *Organophosphorous ester-induced chronic neurotoxicity*, *Archives of Environmental Health*, 2003, 58, 484-497.
- [40] - Ferreira A, Proenca C, Serralheiro M, Araujo E, *The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidante activity of Medicinal plants from Portugal*, *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 108, 31-37.
- [41] - Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., *Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*, *Food Chemistry*, 2006, 99, 191-203.
- [42] - Ayala-Zavala, J., Rosas-Dominguez, C., Vega-Vega, V., Gonzalez-Aguilar, G., *Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own by products: Looking for integral exploitation*, *Journal of Food Science*, 2010, 25, 175–181.
- [43]- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J., Dommes, J., *Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests*, *Food Chemistry*, 2009, 113, 1226–1233.
- [44] - www.passeiweb.com/estudos/sala_de_aula/quimica/osmose - visitado a 18 de Janeiro de 2016.
- [45] - Kenndler, E., *Introduction to chromatography*, Institute for Analytical Chemistry, University of Vienna, 2004.
- [46] – Harris, D., *Análise Química Quantitativa*, 7ª edição, LTC.
- [47] - Ball, G., *Vitamins in foods: Analysis, bioavailability, and stability*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 785, 2006.
- [48] – Yamamoto, Y., Yuko, T., Mitsuyoshi, K., Masaru, I., Takashi, M., Shigeru, S., Hidemasa, Y., *In vitro digestibility and fermentability of levan its hypocholesterolemic effects in rats*, *Journal of Nutrition Biochemistry*, 1999, 10, 13-18.
- [49] - Ghanem, M., Han, R., Classen, B., Quetin-Leclercq, J., Mahy, G., Ruan, C., Qin, P., Peérez-Alfocea, F., Lutts, S., *Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: Localization and composition in relation to salt stress*, *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167, 382–392.
- [50] - Robards, K., *Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables*, *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000, 657–691.
- [51] - Ignat, I., Volf, I., Popa, V., *A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*, *Food Chemistry*, 2011, 126, 1821–1835.
- [52] - Budini, R., Tonelli, D., Girotti, S., *Analysis of total phenols using the Prussian Blue method*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1980, 28, 1236–1238.
- [53] - Stoscheck, CM., *Quantitation of Protein*, *Methods in Enzymology*, 1990, 182, 50-69.
- [54] - Zaia, D., Zaia, C., Lichtig, J., *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*, *QUÍMICA NOVA*,), 1998, 21.

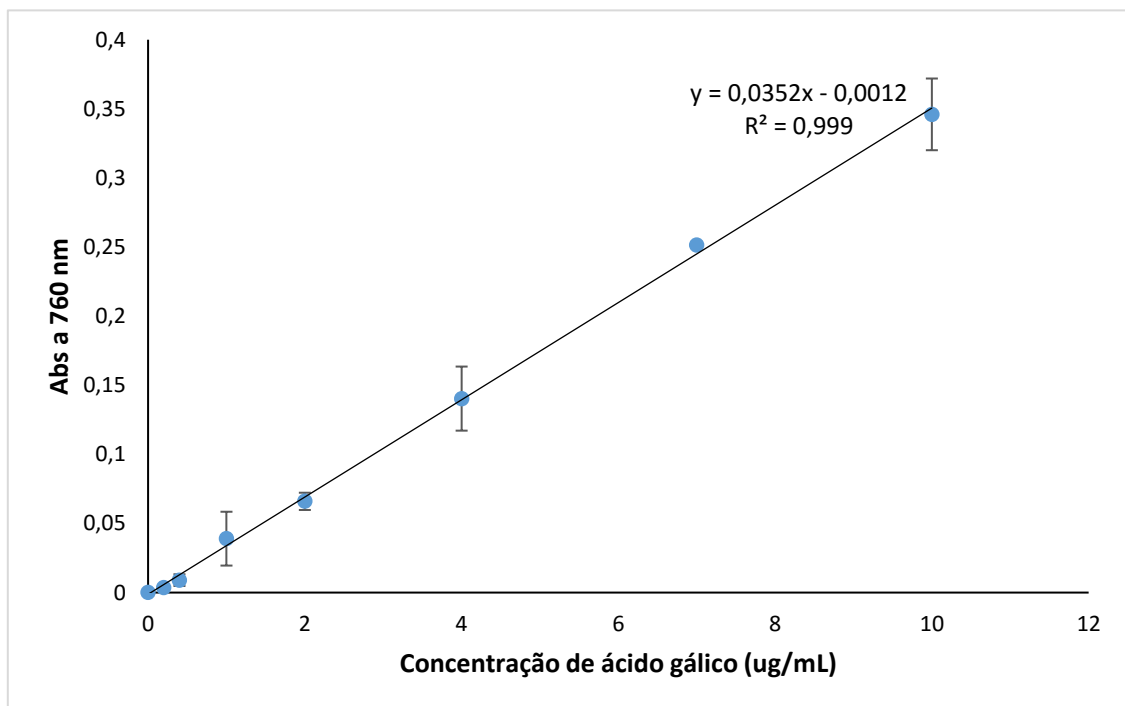
- [55]- Miller, G., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, Analytical Chemistry, 1959, 31, 426–428.
- [56] - Siva,S., Monteiro, V., Alcanfor, J., Assis, E., Asquieri, E., *Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel*, 2003, 13, 337-341.
- [57] – Sharma, O., Bhat, T., *DPPH antioxidant assay revisited*, Food Chemistry, 2009, 113, 1202–1205
- [58]- Hodges, D., DeLong, J., Forney, C., Prange, R., *Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds*, Planta, 1999, 207, 604-611.
- [59] - Schulz, K., Kerber, S.,Kelm, M., *Reevaluation of the Griess Method for Determining NO/NO₂ in Aqueous and Protein-Containing Samples*, NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry, 1999, 3, 225-234.
- [60] - VELLOSA, J., BARBOSA, V., OLIVEIRA, O., *Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres*, Revista Eletrônica de Farmácia, 2007, 4, 119-130.
- [61] - Cardenas, M., Marder,M., Blank, V., Roguin, L., *Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14, 2966–2971.
- [62] - Liu, R.H., *Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals*, The American Journal of Clinical Nutrition, 2003, 78, 517S-520S.
- [63] – Klimczak, I., Maecka, M., Szlachta, M., Gliszczynska-Swigo, A., *Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices*, Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 20, 313–322.
- [64] –Mahmood, T., Anwar, F., Abbas, M., Saari, N., *Cultivars and Mulberry Species from Pakistan Effect of Maturity on Phenolics (Phenolic Acids and Flavonoids) Profile of Strawberry*, International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13, 4591-4607.
- [65] – Amiot, M., Fleuriet, A., Macheix, J., *Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1986, 34, 823–826.
- [66] – Silva, M., Costa, R., Santana, A., Koblitz, M., *Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais*, Semina: Ciências Agrárias, 2010, 31, 669-682.
- [67] - Serrano, J., Puupponen-Pimi, R., Dauer, A., Aura, A., Calixto, F., *Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects*, Molecular Nutrition & Food Research, 2009, 53, S310 –S329.
- [68] - Sluis, A., Dekker,M., Jager, A., Jongen, W., *Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple:Effect of Cultivar, Harvest Year, and Storage Conditions*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49, 3606–3613.
- [69] - Duda-Chodak, A., Tarko, T., *Antioxidant properties of different fruit seeds and peels*, ACTA Scientiarum Polonorum/Technologia Alimentaria, 2007, 6, 29-36.
- [70] - Bravo, L., Abia, R., Saura-Calixto, F., *Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42, 1481-1487.
- [71] - Tomita, A., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., *Potent Antibacterial Peptides Generated by Pepsin Digestion of Bovine Lactoferrin*, Journal of Dairy Science, 1991, 74, 4137-4142.

- [72] - Dai, J., Mumper, R., *Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties*, *Molecules*, 2010, 15, 7313-52.
- [73] - Wang, W., Bostic, T., Gu, L., *Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of diferente strains and cultivars*, *Food Chemistry*, 2010, 122, 1193–1198.
- [74] - Li, H., Wong, C., Cheng, K., Chen, F., *Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants*, *LWT*, 2008, 41, 385-390.
- [75] - pt.vwr.com/store/product/2357964/etanol-96-analar-normapur - visitado a 1 de Setembro de 2016
- [76] – www.hepg2.com - visitado a 1 de Setembro de 2016
- [77] – Mosmann, T., *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*, *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65, 55-63.
- [78] – Ge, Q., Zhang, A., Sun, P. Purification and structural elucidation of a novel fucoglucan from the fruiting bodies of *Phellinus baumii* Pilát, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89, 343-348.
- [79] – Silva, S., Feliciano, R., Boas, L., Bronze, M., *Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity*, *Food Chemistry*, 2014, 150, 489–493.
- [80] – Robb, S., Geldart, E., Seelenbinder, J., Brown, P., Analysis of Green Tea Constituents by HPLC-FTIR, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2002, 25(5), 787–801.
- [81] – GHELDOF, N., WANG, X.H., ENGESETH, N., *Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 5870-5877.
- [82] – Felipe, D., Brambilla, L., Porto, C., Pilau, E., Cortez, D., *Phytochemical Analysis of *Pfaffia glomerata* Inflorescences by LC-ESI-MS/MS*, *Molecules*, 2014, 19, 15720-15734.
- [83] – Es-Safi ,N., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M., *Competition between (+)-Catechin and (-)-Epicatechin in Acetaldehyde-Induced Polymerization of Flavanols*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, 2088-2095.
- [84] – Rockenbach, I., Jungfer, E., Ritter, C., Santiago-Schübel, B., Thiele, B., Fett, R., Galensa, R., *Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS*, *Food Research International*, 2012, 48, 848–855.
- [85] – Clifford, M., Stoupi,S., Kuhnert, N., *Profiling and Characterization by LC-MSn of the Galloylquinic Acids of Green Tea, Tara Tannin, and Tannic Acid*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 2797-2807.
- [86] – Moore, J., Westall, K., Ravenscroft, N., Farrant, J., Lindsey, G., Brandt, W., *The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation*, *Biochemical Journal*, 2005, 385, 301–308.
- [87] – Mahmood, N., Moore, P., DeTornmasl, N., DeBlrnone, F., Colman, S., *Inhibition of HIV infection by caffeoylquinic acid Derivatives*, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 1993, 4, 235-240.
- [88] – en.wikipedia.org/wiki/3,4,5-Tri-O-galloylquinic_acid – visitado a 7 de Setembro de 2016
- [89] – www.tdx.cat/bitstream/handle – visitado a 7 de Setembro de 2016.
- [90] – Dziedzic, S.Z., Hudson, B.J.F, *Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils*, *Food Chemistry*, 1984, 14, 45-51.

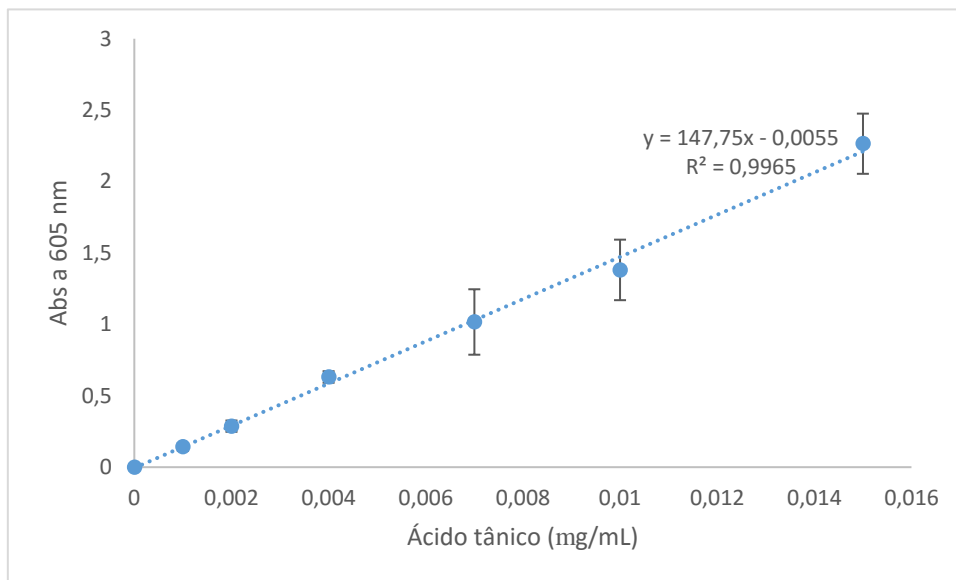
- [91] – Pratt, D.E., *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*, Natural Antioxidants from Plant Material, 1992, 5, 54–71.
- [92] – Ho, C.T., Lee, C.Y., Hua, N.G., *Phenolic compounds in food and their effects on health*, Washington : American Chemical Society, 1992, 54-71.
- [93] – Von GADOW, A., JOUBERT, E., HANSMANN, C.F. *Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (Aspalathus linearis), α -tocopherol, BHT and BHA*, Journal Agriculture and Food Chemistry, 1997, 45, 632-638.
- [94] – Paulina, K., Contreras-Gutierrez, Hurtado-Fernández, H., Gómez-Romero, M., Hormaza, J., Carrasco-Pancorbo, A., Fernández-Gutiérrez, A., *Determination of changes in the metabolic profile of avocado fruits (Persea americana) by two CE-MS approaches (targeted and non-targeted)*, Electrophoresis, 2013, 34, 2928–2942.
- [95] – Barreiros, A., David, J., *Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo*, Quimica Nova, 2006, 29, 113-123.
- [96] – Jain, A., Sharma, R., Kumar, A., Sharma, S., *Jasminum species: an overview*, International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences, 2011, 1, 251-266.
- [97] – Kanakis, P., Termentzi, A., Michel, T., Gikas, E., Halabalaki, M., Skaltsounis, A., *From Olive Drupes to Olive Oil An HPLC-Orbitrap-based Qualitative and Quantitative Exploration of Olive Key Metabolites*, Planta Medica, 2013, 79, 1576–1587.
- [98] - webapps.molecular-networks.com/biopath3/biopath/mols/7-Glucosyl-11-methyloleoside – visitado a 7 de Setembro de 2016.
- [99] – Mariotti, F., Panara, F., Caporali, S., Urbani, S., Veneziani, G., Esposto, S., Taticchi, A., Rosati, A., Rao, R., Perrotta, C., Servili, M., Baldoni, L., *Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development*, Alagna et al. BMC Plant Biology, 2012, 12, 162.
- [100] - Mendoza-Wilson, A., Glossman-Mitnik, D., *Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (C)-catechin and (K)-epicatechin related to their antioxidant ability*, Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 2006, 761, 97–106.
- [101] - Chen, H., Inbaraj, B., Chen, B., *Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in Taraxacum formosanum Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique*, International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13, 260-285.
- [102] - Toit, R., Volstedt, Y., Apostolides, Z., *Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents*, Toxicology, 2001, 166, 63–69.

VI – Anexos

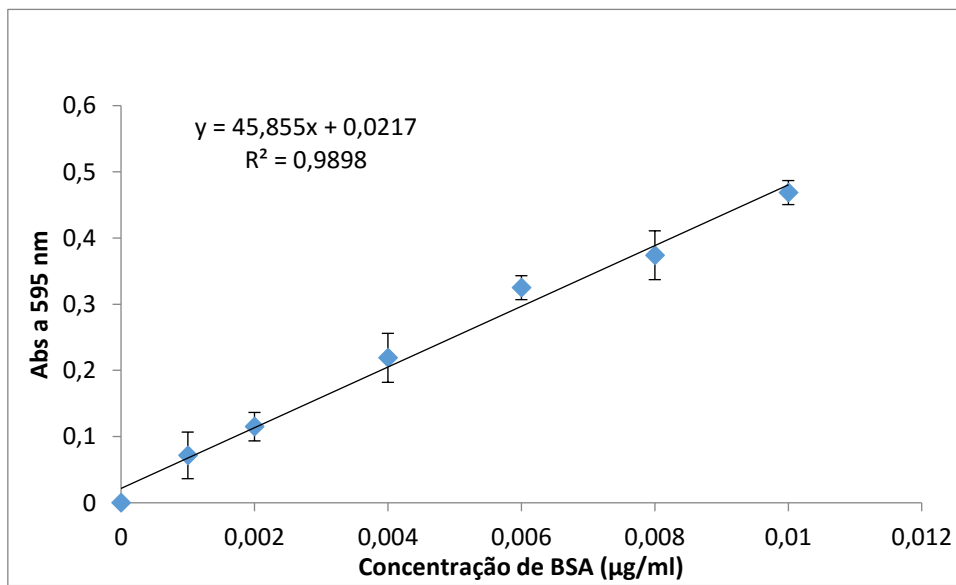
A.1 - Curva de calibração dos fenóis



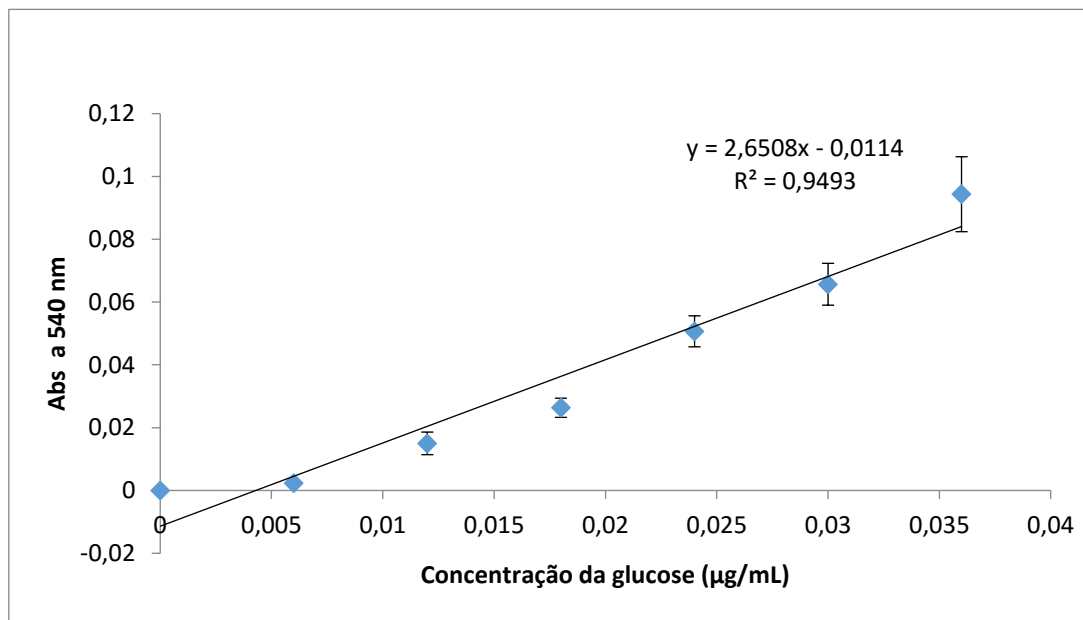
A.2 - Curva de calibração dos Taninos



A.3 - Curva de calibração das Proteínas

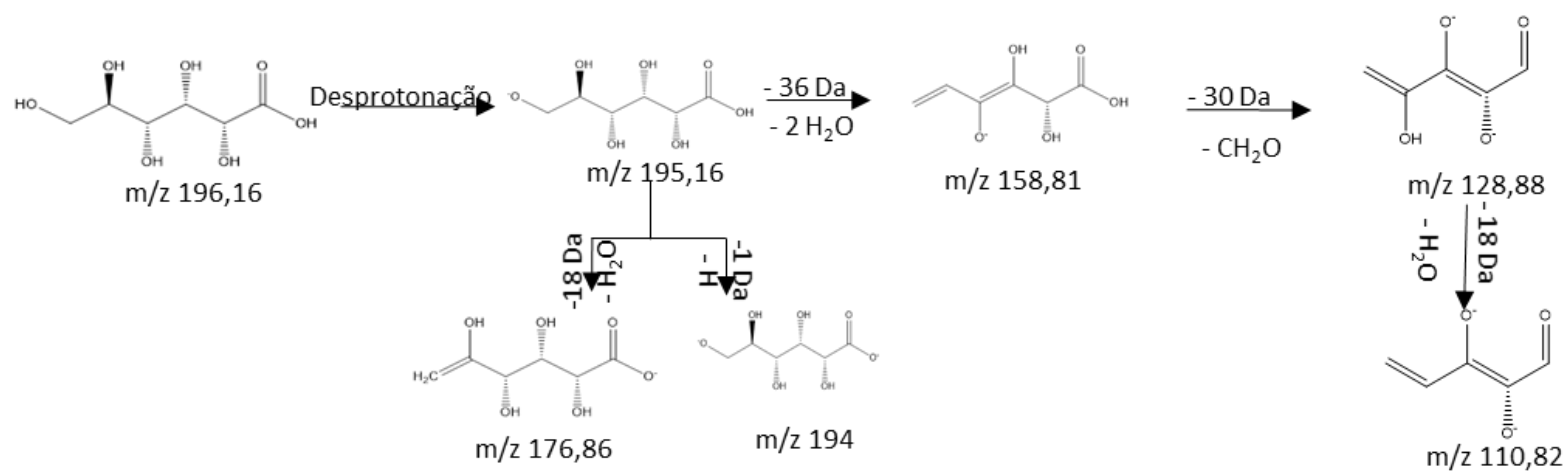
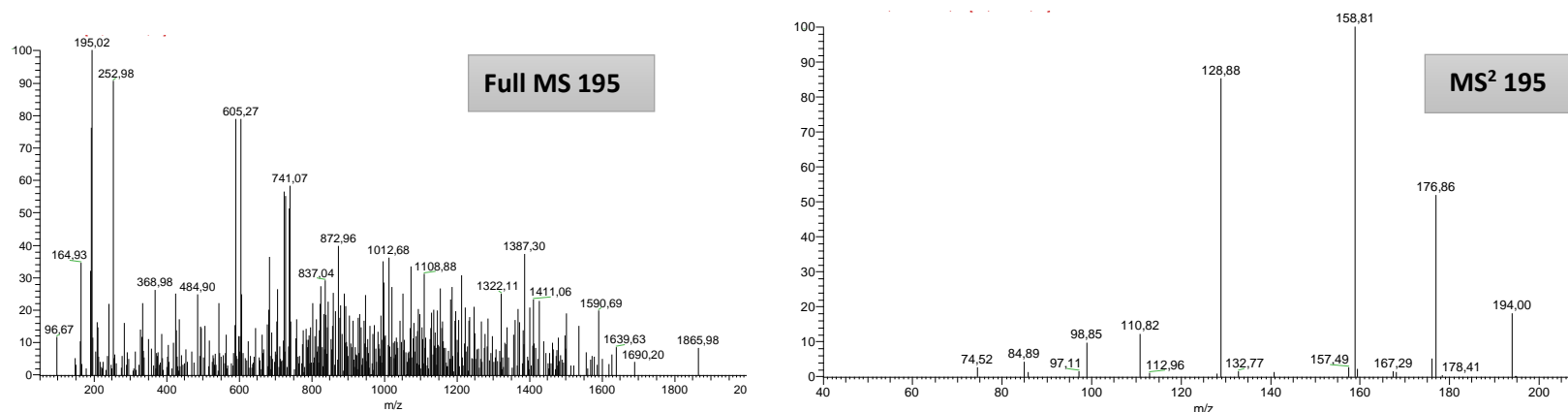


A.4 - Curva de calibração dos Açúcares

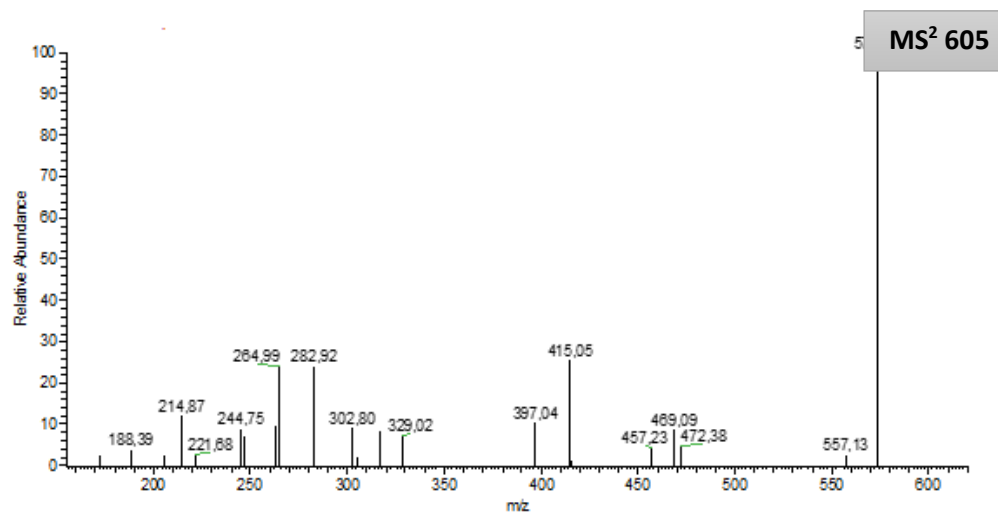
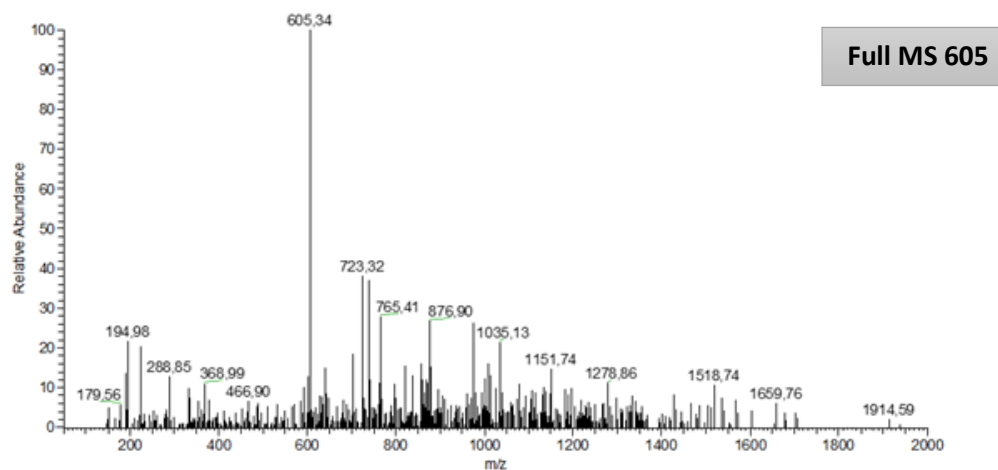


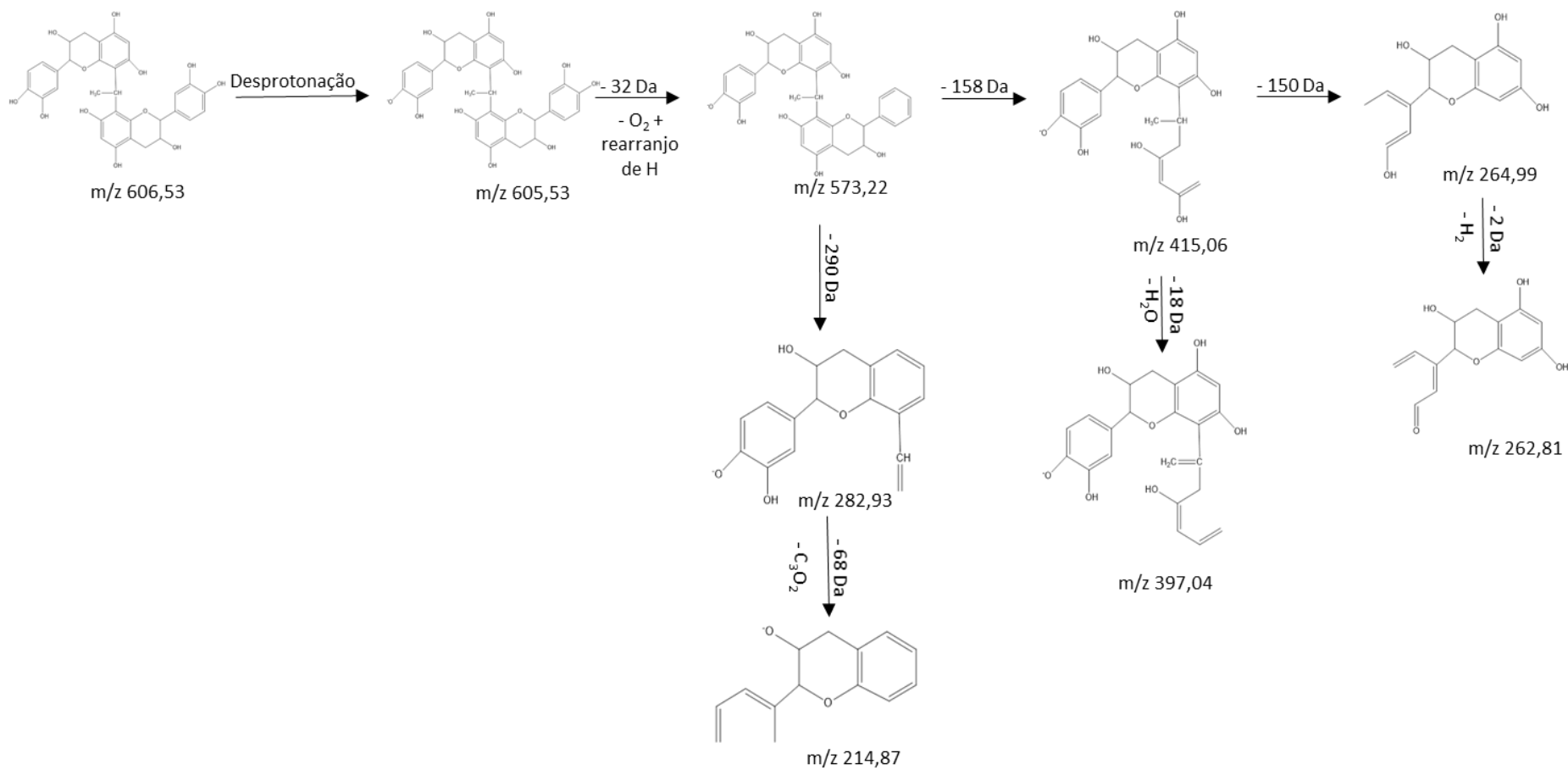
A.5 - Espectros de massa dos compostos identificados e respetiva fragmentação

A.5.1 - Ácido Glucónico

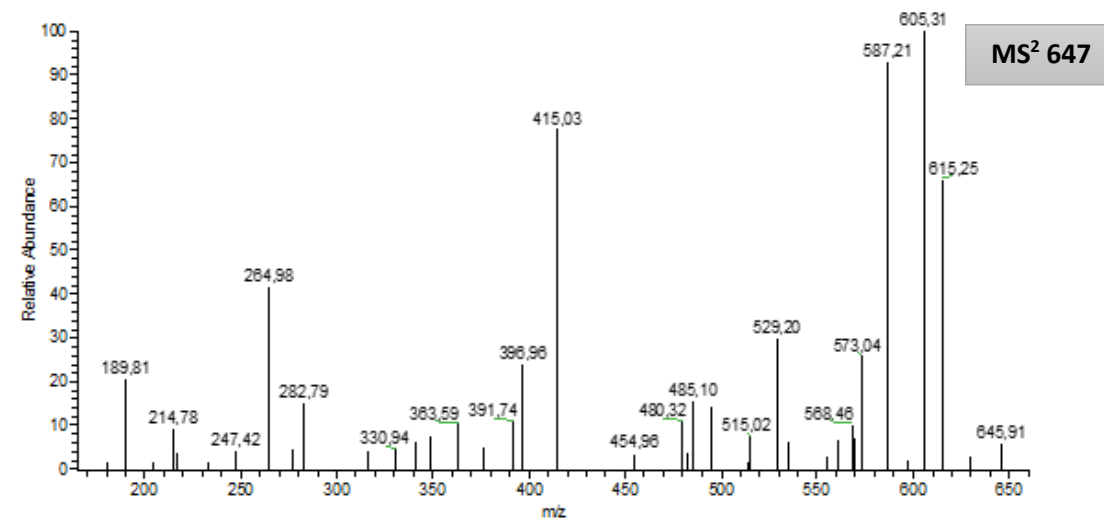
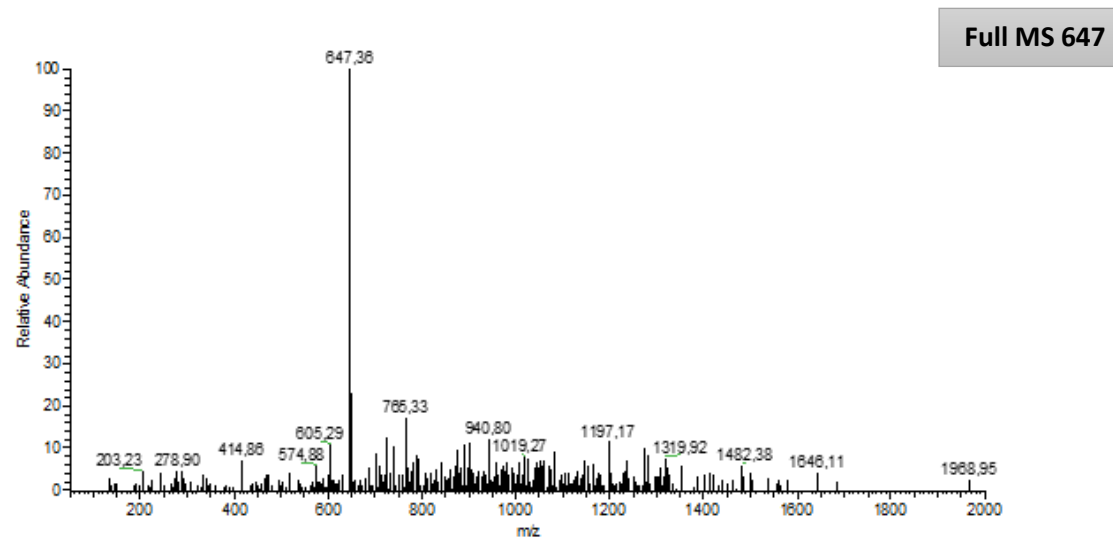


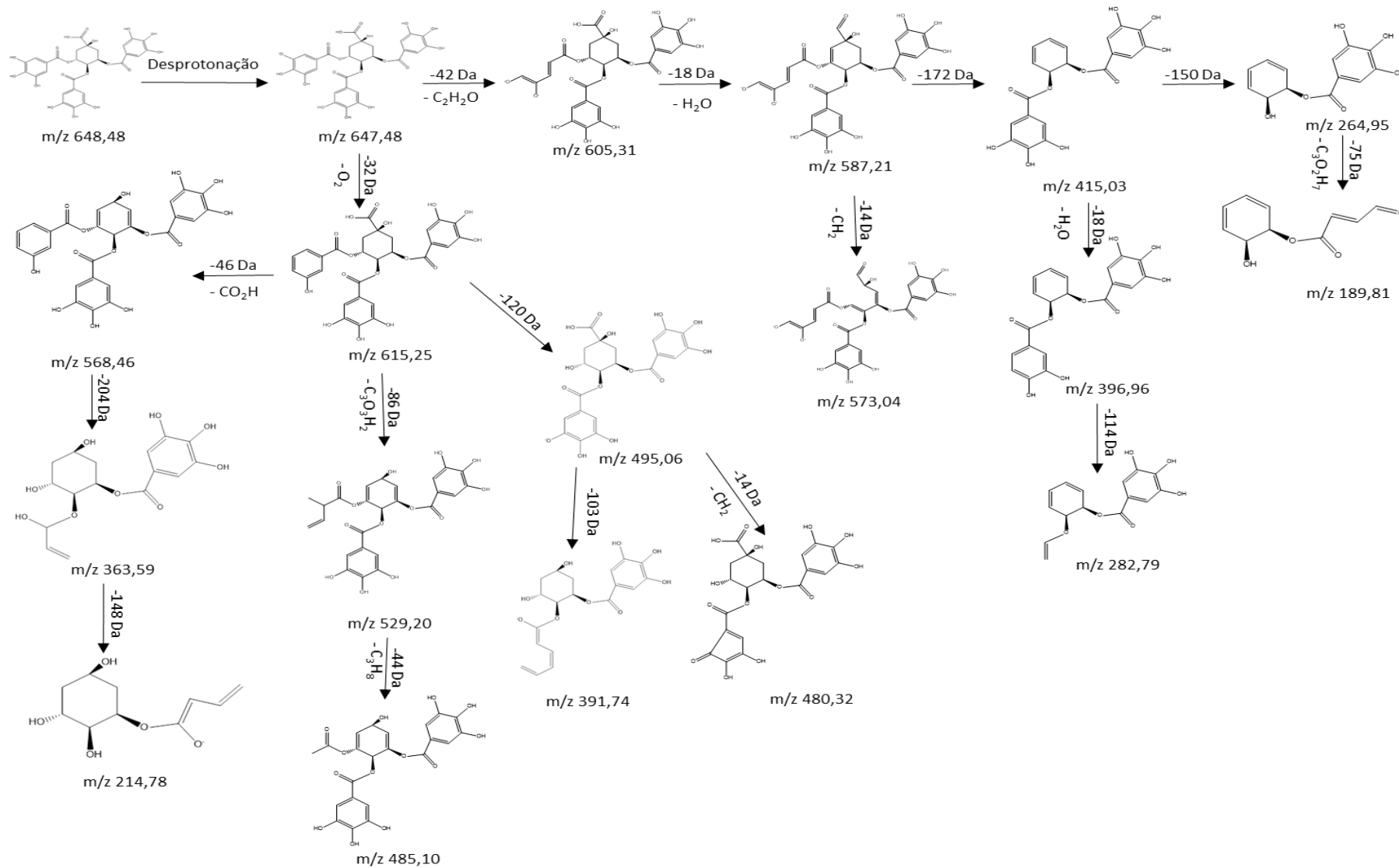
A.5.2 - Dímero epicatequina-etilo



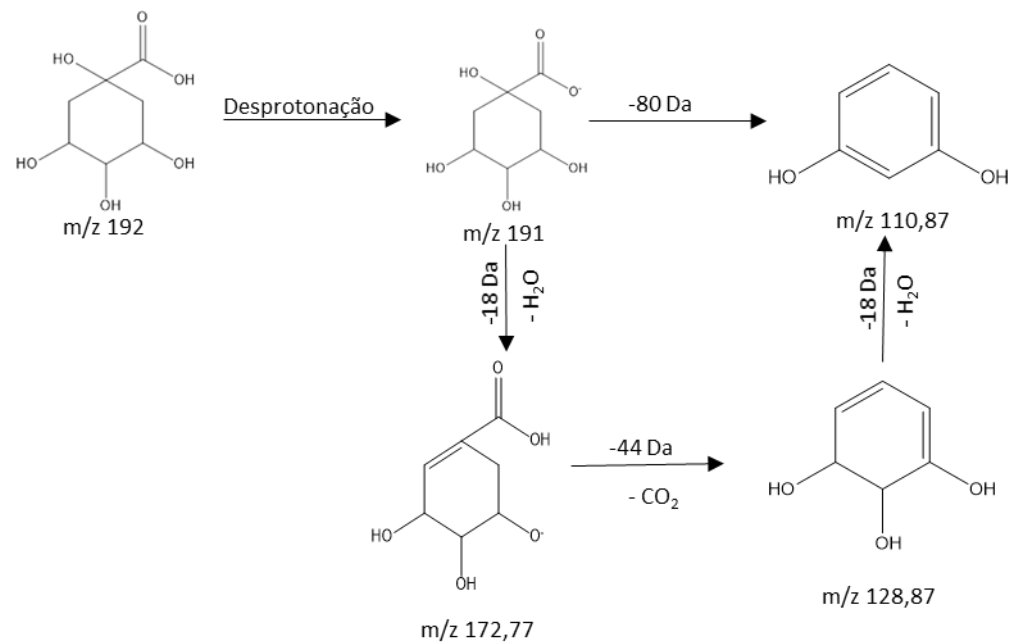
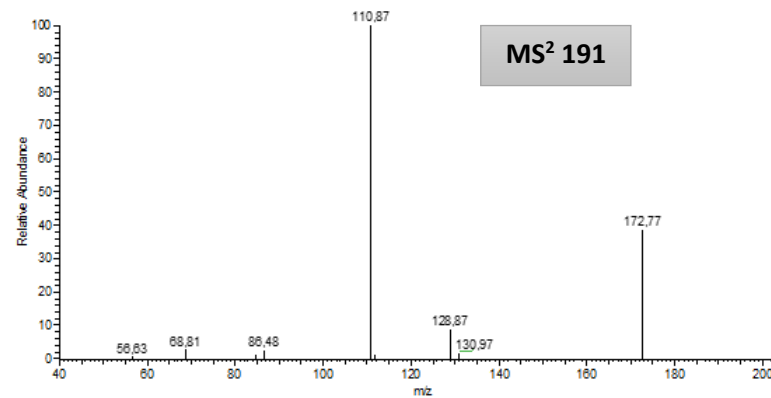
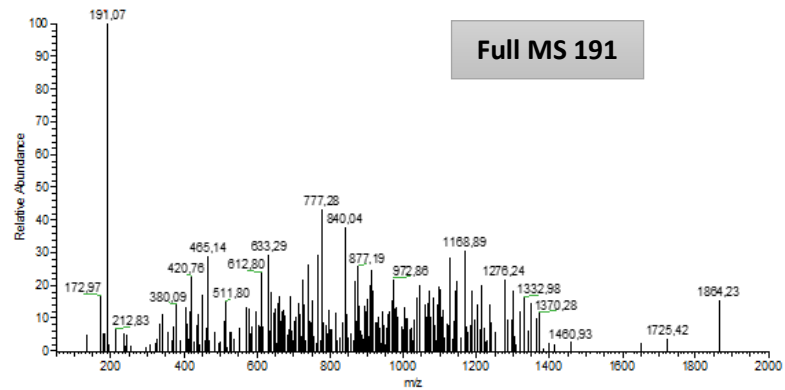


A.5.3 - Ácido 3,4,5-Tri-O- galoilquínico



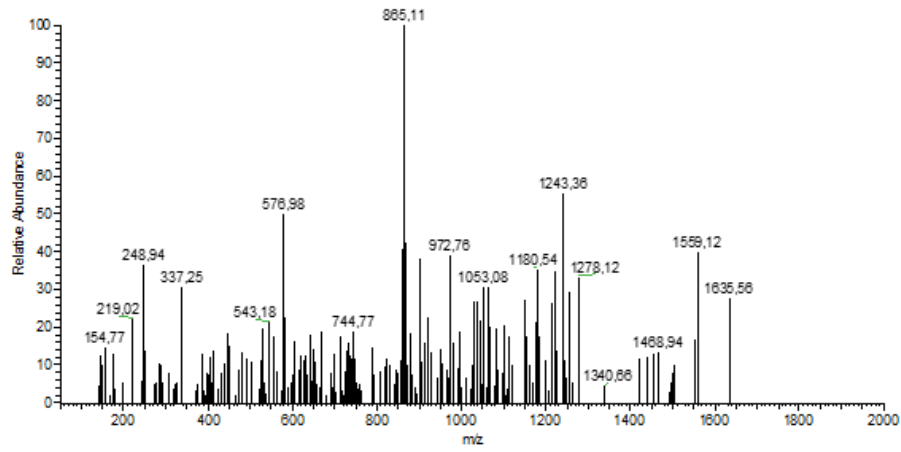
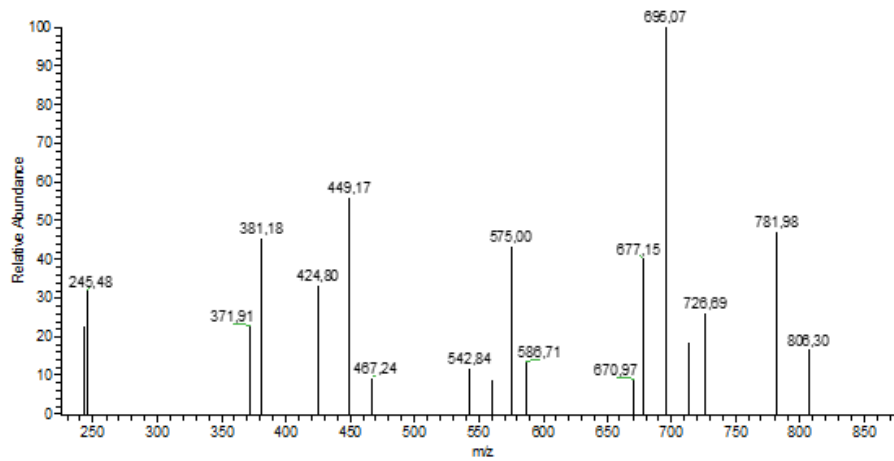


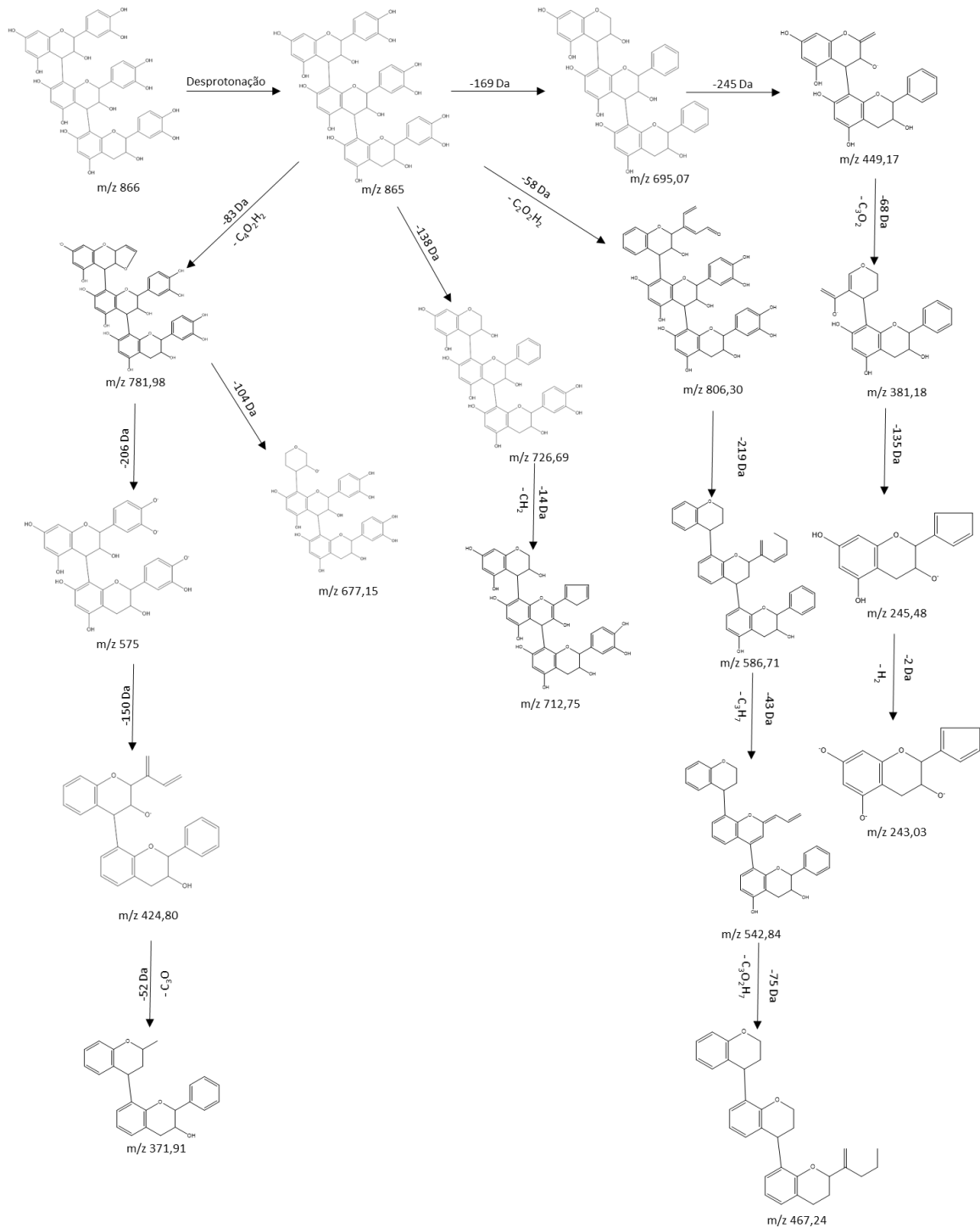
A.5.4 - Ácido quínico



A.5.5 - Prociandina C

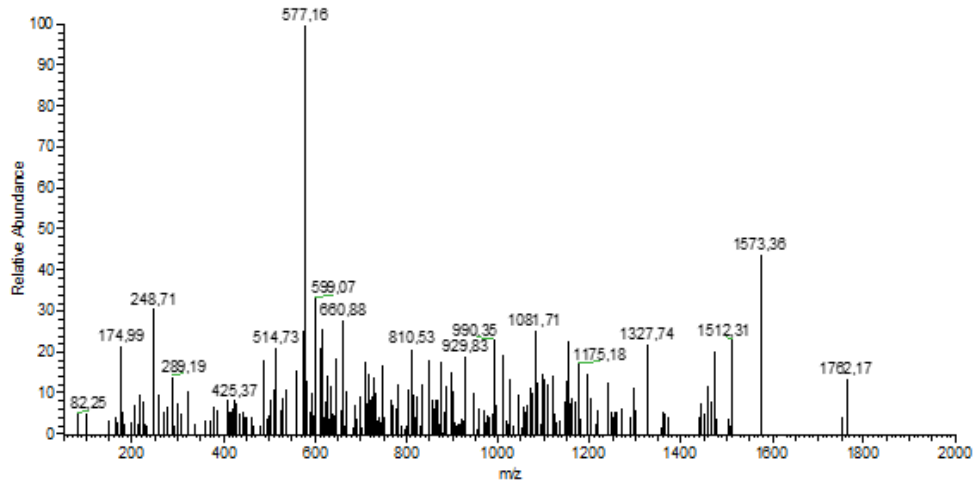
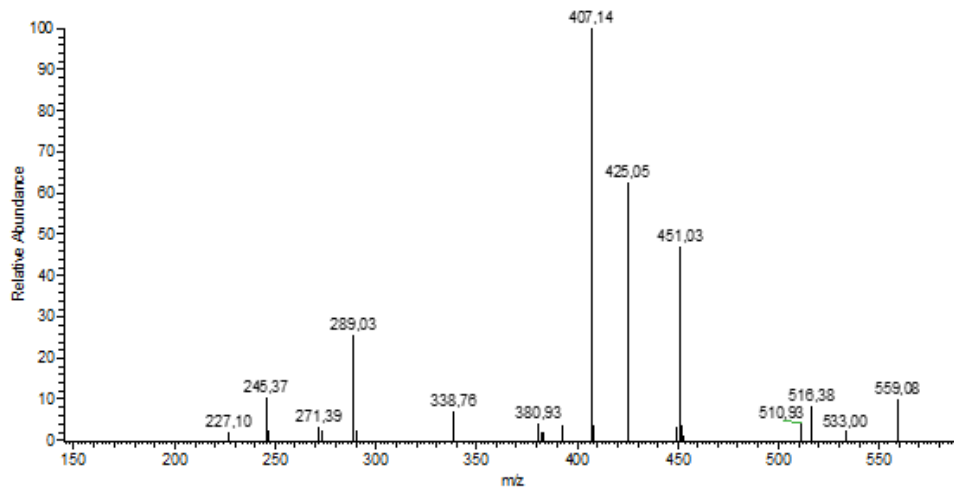
Full MS 865

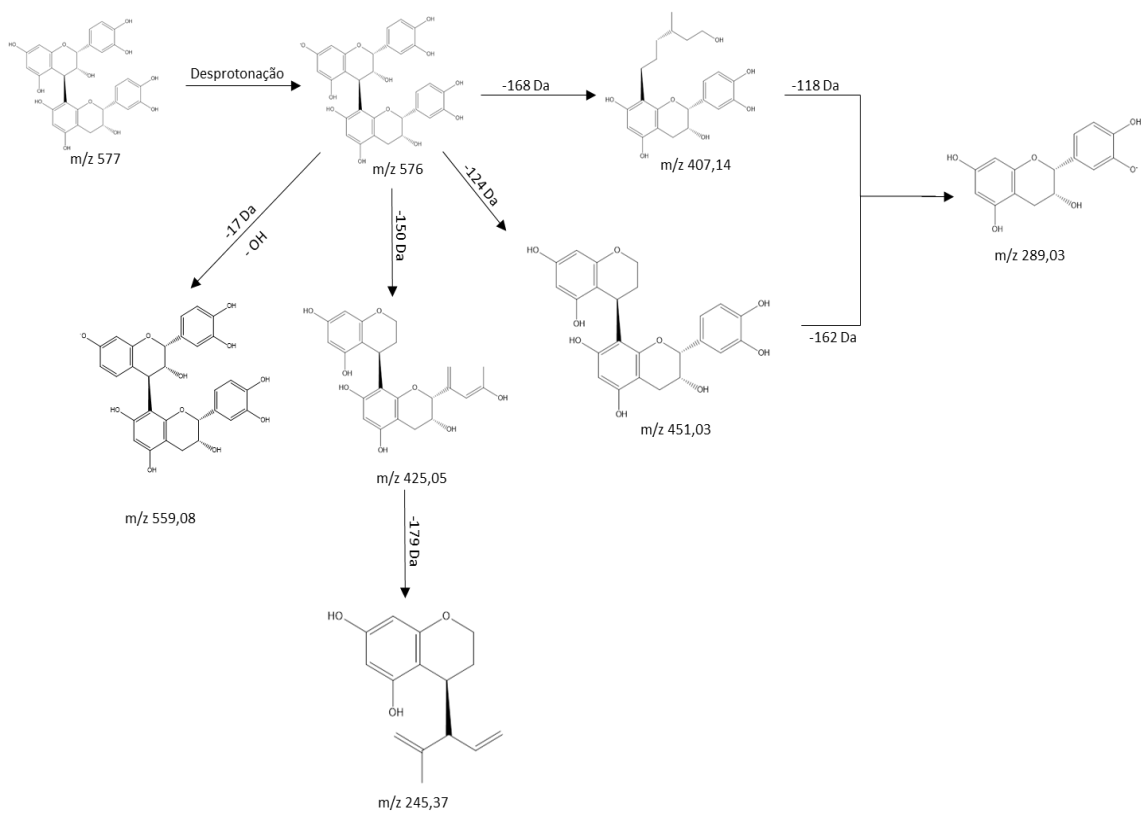
MS² 865



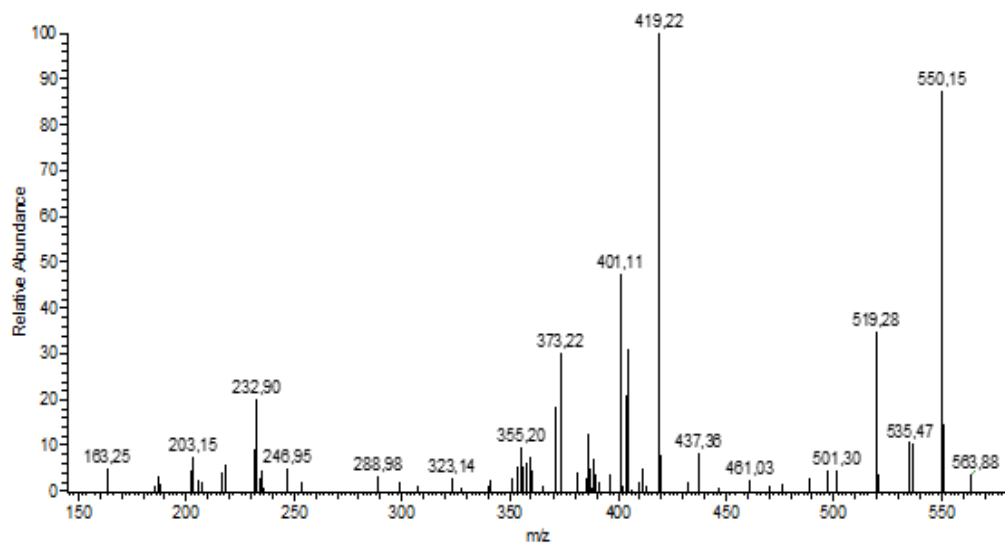
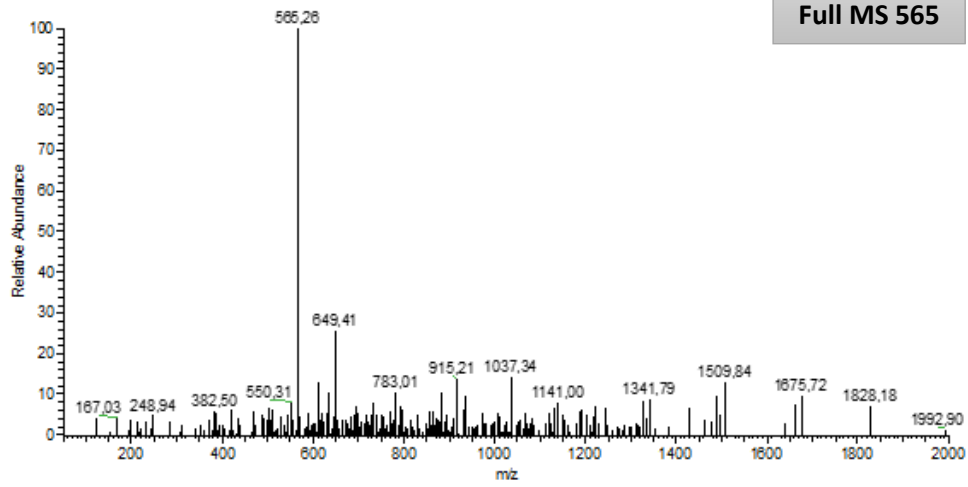
A.5.6 - Prociandina B

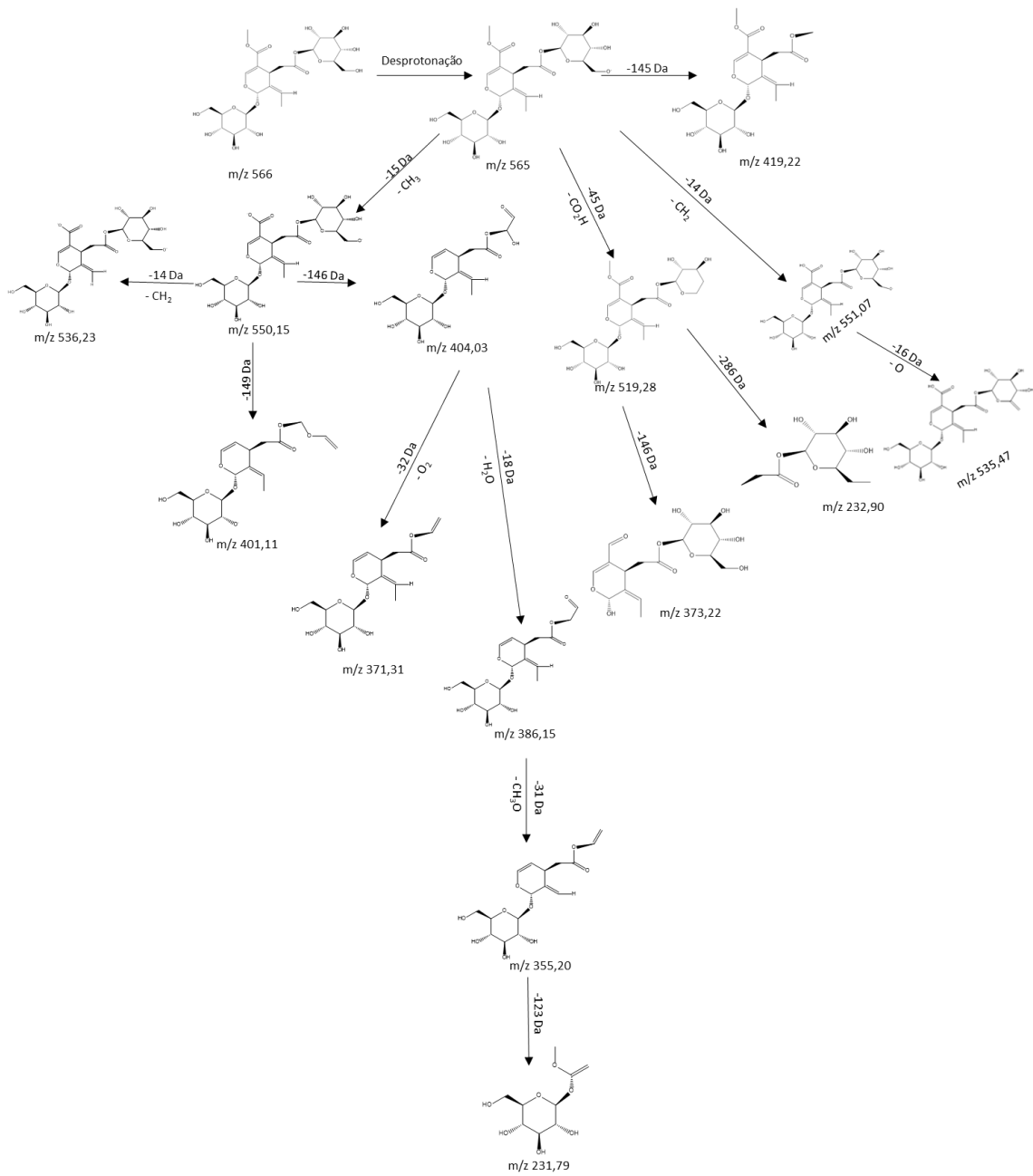
Full MS 577

MS² 577

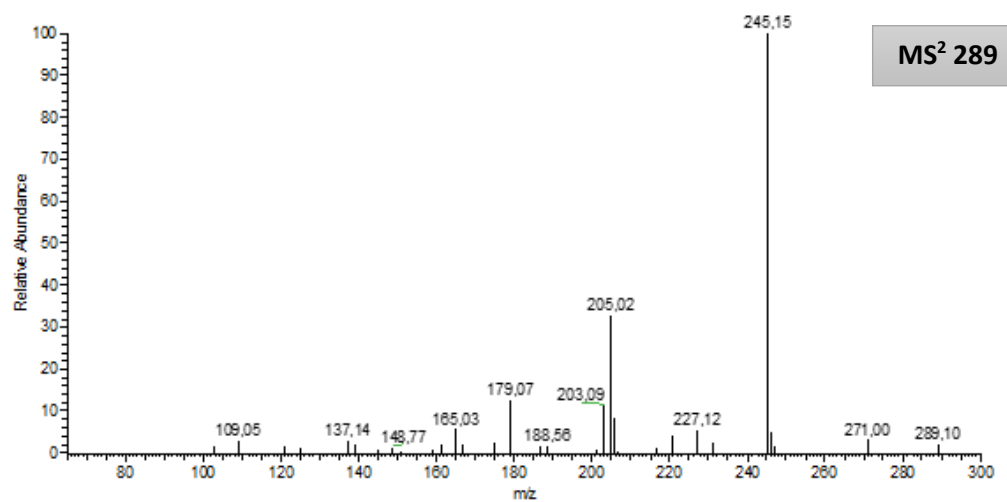
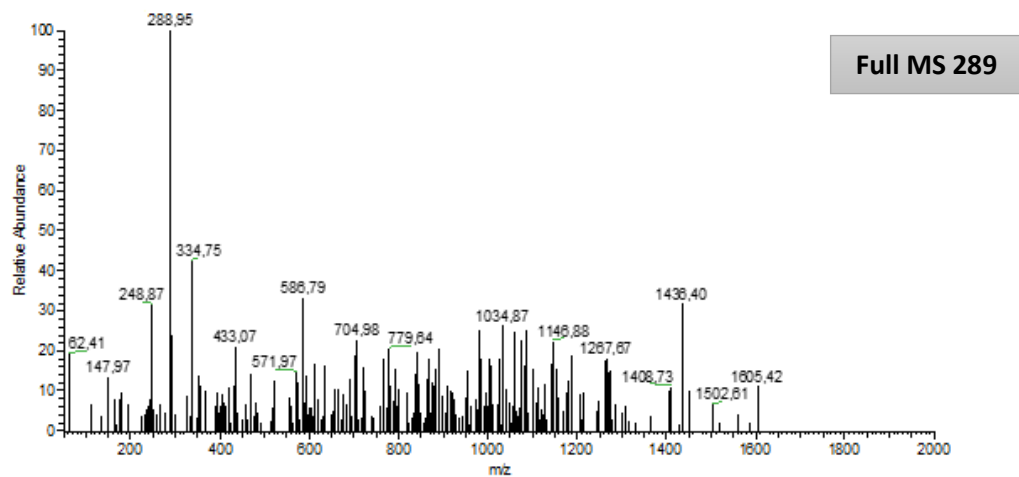


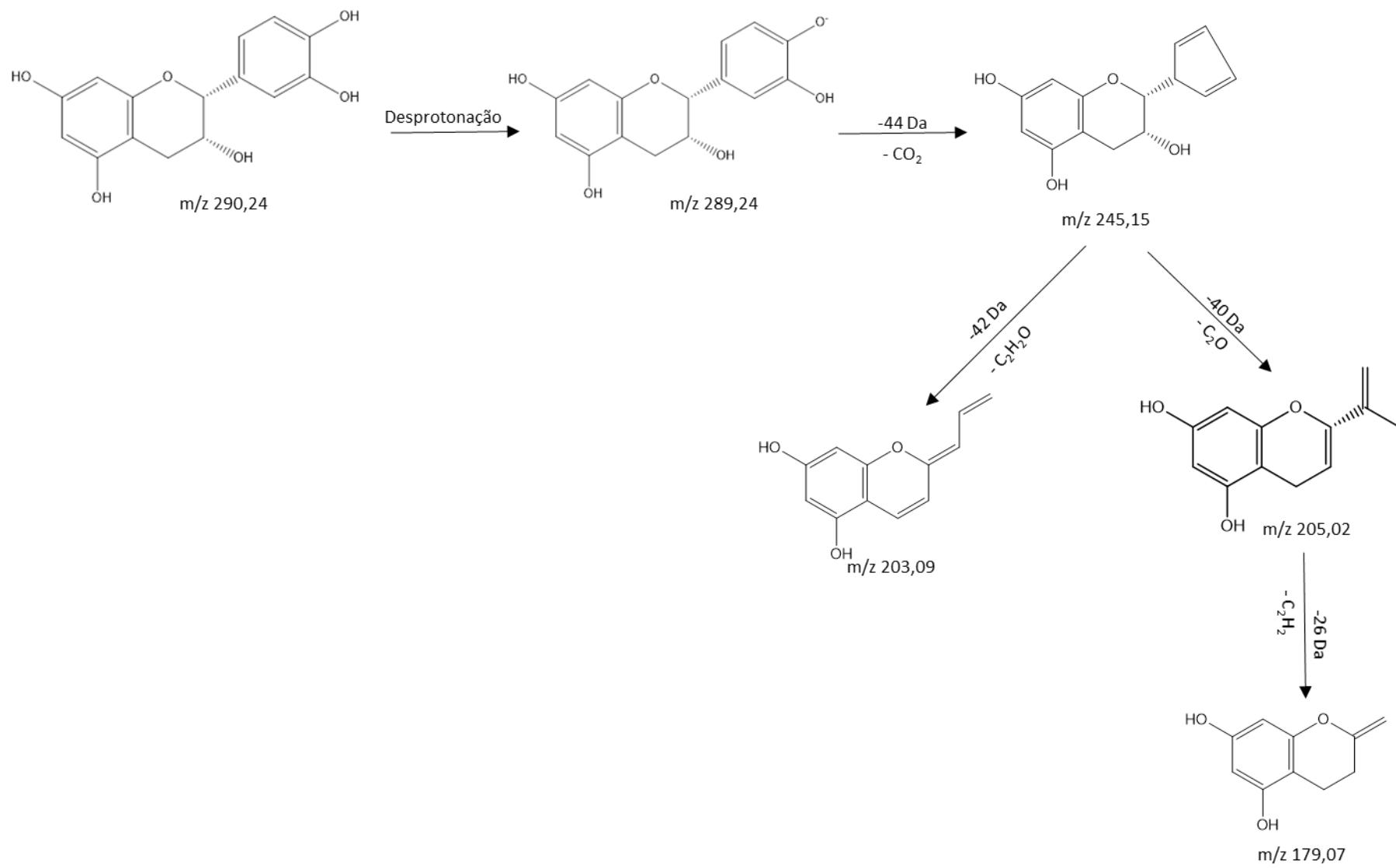
A.5.7 - 7-Glucosilo-11-metil-oleosido



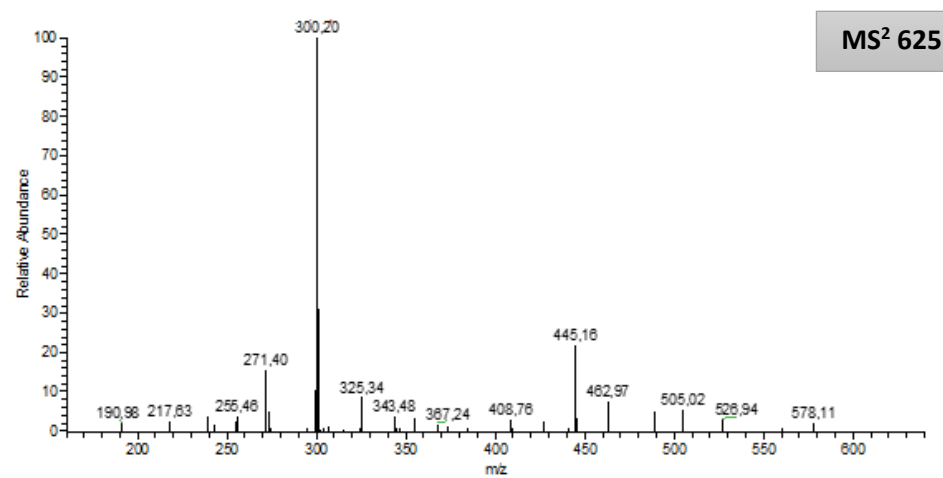
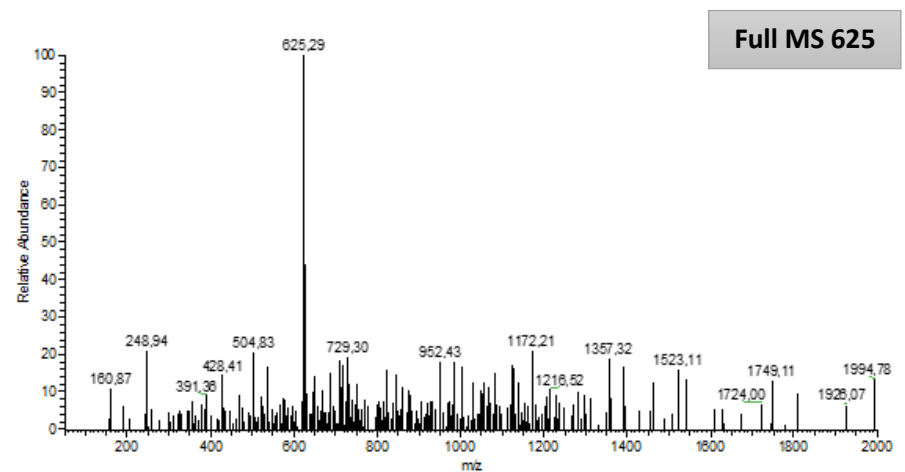


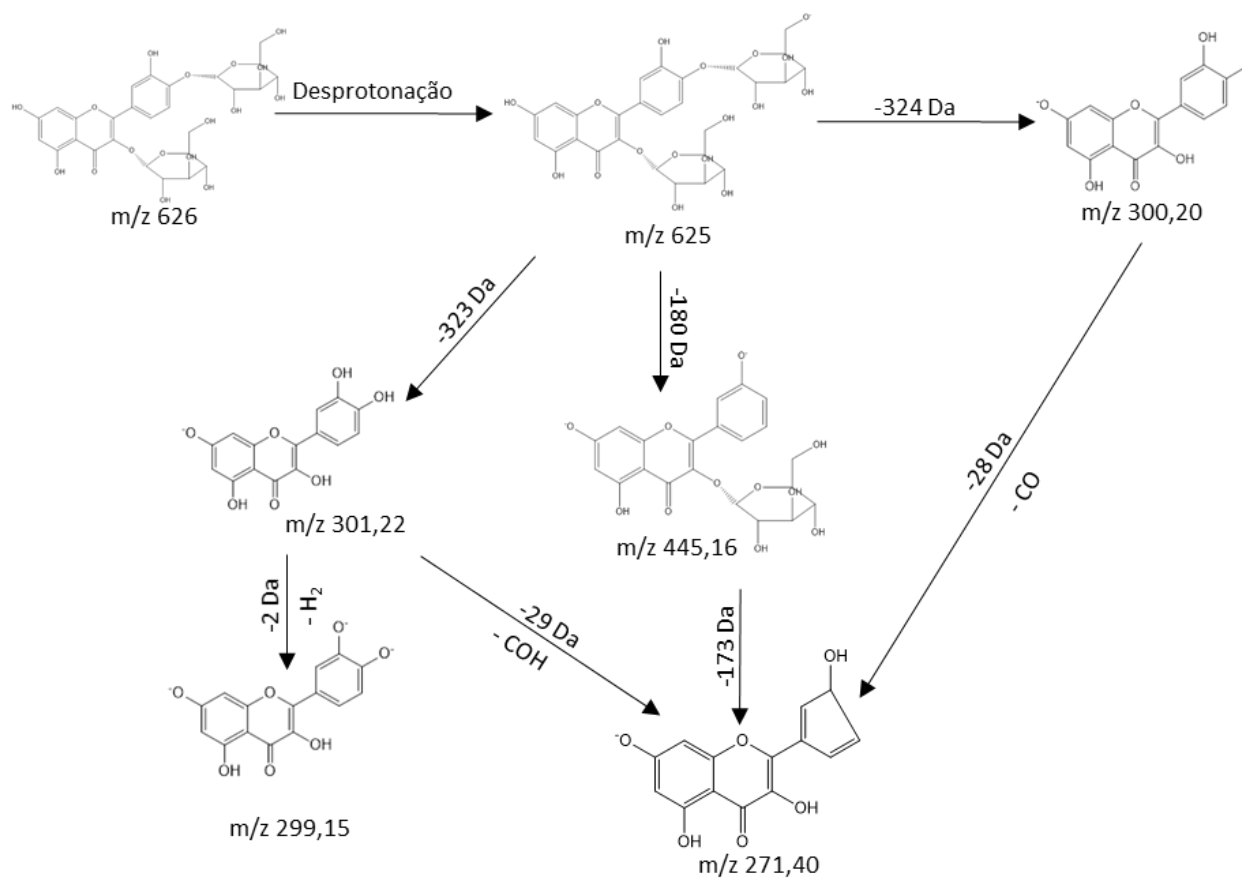
A.5.8 - Epicatequina





A.5.9 - Quercetina di-hexose





A.5.10 - Quercetina – O-hexose-O-pentose

