

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Fábio Tomio Yamassaki

MOLÉCULAS BIOATIVAS DAS FOLHAS DE *Persea americana*

CURITIBA

2010

Fábio Tomio Yamassaki

MOLÉCULAS BIOATIVAS DAS FOLHAS DE *Persea americana*

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Selma Faria Zawadzki Baggio

CURITIBA

2010

AGRADECIMENTOS

Às Prof^{as} Dr^{as} Selma Faria Zawadzki Baggio e Juliana Bello Baron Maurer, pela acolhida, orientação e amizade demonstrada ao longo de todo o tempo do projeto.

À UFPR, pela formação e estrutura disponibilizada.

À Raquely, Luciano e Carol, que muito me ensinaram sempre com boa vontade, paciência e bom humor.

Aos colegas de laboratório Mel, Angélica, Fernando e Amanda, por um ambiente laboratorial sempre muito mais agradável.

Aos colegas da biologia, Ká, Lu, Van, Carol, Carol, André, Samuel, Jeff, Fer, Dani, Dai, Luquinhas, Levek, Flavinha, Cla, Andreas, Aninha, Dael, Turista, Barulho, Tim, Lucas e Carlinhos, pela forte amizade.

Ao Tiago, Pepino, Vini, Diegão e Toni, pelos verdadeiros momentos de felicidade e companheirismo.

Ao Fabrício, Ceusnei e Croto, os mestres.

À rapaziada do Capão, Ertão, Thiaguinho, Vitão e, Bruno que estão comigo a tempos na caminhada.

À galera do conjunto, Thiago, Juliano, André, Gian, Mi, Leo, Pira, pelos incontáveis momentos de alegria.

À minha prima Silvia, que compartilha comigo as mesmas dificuldades do biólogo; e ao Carlão.

À Thalita, Joyce e Camis, a família que eu só encontrei depois dos 20. Sempre me ensinando a ser uma pessoa melhor.

À família Makita e Yamassaki, que lutaram e lutam por um futuro melhor para todos, sempre com muita dignidade e honestidade.

Aos meus irmãos, Gustavo, Hugo e Marília pela segurança.

Aos meus pais, Mary e Roberto, pelo apoio, amor e carinho.

RESUMO

A caracterização química de compostos é uma importante etapa para a medicina fitoterápica, conferindo-lhe mais confiabilidade de atuação contra as inúmeras doenças humanas. O abacateiro, *Persea americana*, é uma planta comumente utilizada tanto como fonte nutricional, como também na medicina, apresentando inúmeras aplicações terapêuticas popularmente e cientificamente relatadas. As folhas, especificamente, são utilizadas na forma de extração aquosa do tipo decocto ou infusão. Este trabalho identificou os polissacarídeos e alguns metabólitos secundários foliares do abacateiro. E por fim, avaliou a atividade antioxidante das folhas do abacateiro. Foram feitas duas coletas (A e B), sendo que para a coleta A, as folhas foram submetidas a extrações aquosas seqüenciais, uma fria (EF) e quatro quentes (1EQ, 2EQ, 3EQ e 4EQ) para estudo dos polissacarídeos, enquanto que para a coleta B, o material foi separado em três porções: uma destinada a extração de polissacarídeos em decocto aquoso (DA), uma extração hidroalcoólica (EH) e uma infusão aquosa (IA), desta última, uma alíquota foi utilizada para análise dos polissacarídeos e denominada IAPol. Todas as amostras polissacarídicas (EF, 1EQ, 2EQ, 3EQ, 4EQ, DA e IAPol) foram analisadas em cromatografia gasosa apresentando principalmente os polissacarídeos arabinanas e arabinogalactanas. As amostras EH, IA e DA foram submetidos a caracterização de metabólitos secundários por cromatografia em camada delgada (TLC) e teste colorimétrico de fenóis totais. O resultado do TLC sugere a presença de compostos semelhantes ao ácido clorogênico e vanílico nas frações EH e IA. O teste de fenólicos totais apresentou cerca de 9,5%, 6,6% e 0,2% para EH, IA e DA, respectivamente. Para a avaliação da atividade antioxidante, fizemos o teste das frações EH, IA e DA frente ao DPPH, e os resultados mostraram que a atividade antioxidante destas três frações é dependente da concentração e que a EH possui a maior atividade, enquanto que a amostra DA, a menor.

ABSTRACT

The elucidation of chemical compounds is an important step toward herbal medicine, providing more reliability in action against numerous human diseases. The avocado, *Persea Americana*, is a plant commonly used both as a nutritional source, but also in medicine, having several therapeutic applications popularly and scientifically reported. The leaves, specifically, are used in the form of aqueous extraction as decoction or infusion. This work has identified some secondary metabolites and polysaccharides of leaves of the avocado. Finally, we evaluated the antioxidant activity of leaves of the avocado. We did two collects (A, B), for collect A, leaves were subjected to sequential extractions in water, a cold (EF), and four hot (1EQ, 2EQ, 3EQ and 4EQ), to study the polysaccharides, while for collect B, the material was separated in three parts: one for extraction of polysaccharides in aqueous decoction (DA); a hydroalcoholic extraction (EH) and; a aqueous infusion (IA), which removed an aliquot and used for analysis of polysaccharides and called IAPol. All polysaccharides samples (EF, 1EQ, 2EQ, 3EQ, 4EQ, DA e IAPol) were analyzed by gas chromatography featuring mainly polysaccharides arabinans and arabinogalactans. Samples EH, IA and DA were submitted to characterization of secondary metabolites by thin layer chromatography (TLC) and colorimetric assay of total phenolic compounds. The result of TLC suggests the presence of compounds similar to chlorogenic acid and vanillic acid in the fractions EH and IA. O teste de phenolic compounds showed about 9,5%, 6,6% and 0,2% for EH, IA and DA, respectively. To evaluate the antioxidant activity, we tested the samples EH, IA and DA in the presence of DPPH, and the results showed that the antioxidant activity of these three fractions is dependent on concentration and that EH has the higher antioxidant activity, while DA sample the smallest.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA E RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS O - EXTRAÇÃO À FRIO (T AMBIENTE); ★ - EXTRAÇÃO À QUENTE (80°C).....	33
FIGURA 2 – ESPECTRO DO INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DA, IA E EH....	36
FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DA, EH, IA E IAPol	37
FIGURA 4 – VISUALIZAÇÃO SOB UV DA TLC DAS AMOSTRAS EH, IA, DA E PADRÕES 1, 2, 3, 4, 5, 6 E 7.....	38
FIGURA 5 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO EH	40
FIGURA 6 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO IA	40
FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DA	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA NEUTRA DAS FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS	34
TABELA 2 – PERCENTAGEM DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E ÁCIDOS URÔNICOS DAS AMOSTRAS POLISSACARÍDICAS.....	35
TABELA 3 – RENDIMENTO E PERCENTAGEM DE GRUPAMENTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	37
TABELA 4 – TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AMOSTRAS DAS FOLHAS DE ABACATE	39
TABELA 5 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES BHA, BHT E ÁCIDO ASCÓRBICO (%)	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(v/v) – Volume por Volume

1EQ – Fração Polissacarídica da 1ª Extração a Quente

2EQ – Fração Polissacarídica da 2ª Extração a Quente

3EQ – Fração Polissacarídica da 3ª Extração a Quente

4EQ – Fração Polissacarídica da 4ª Extração a Quente

AA(%) – Percentagem de Atividade Antioxidante

Ad3 – Adenovírus Tipo 3

AGP – Complexo Arabinogalactana-Proteína

AVD – Aujeszky Disease Vírus

BCL – Bicuculline

BHA – Butil-Hidroxianisol

BHT – Butil-Hidroxitolueno

GABA – Ácido Gama Amino Butírico

GC – Cromatografia Gasosa

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa

DA – Fração Polissacarídica Oriunda de um Decocto Aquoso

DL₅₀ – Dose Letal 50%

DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazila

EF – Fração Polissacarídica da Extração a Frio

EH – Fração Bruta da Extração Hidroalcoólica

HSV-1 – Herpes Simplex Tipo 1

IA – Fração Bruta da Infusão Aquosa

IAPol – Fração Polissacarídica da Infusão Aquosa

IR – Radiação Infravermelho

KBr – Brometo de Potássio

PCT – Picrotoxin

PTZ – Pentylenetetrazole

RF – Tempo de Retenção

RMN C¹³ – Ressonância Magnética do Carbono 13

RMN H¹ – Ressonância Magnética do Hidrogênio 1

TFA – Ácido Trifluoroacético

TLC ou CCD – Cromatografia em Camada Delgada

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

I. Introdução	11
1. Objetivos	13
1.1. Objetivos Gerais	13
1.2. Objetivos Específicos	13
2. Revisão Bibliográfica	14
2.1. Fitoterapia	14
2.2. Compostos Vegetais	14
2.3. <i>Persea americana</i> , o abacateiro	18
II. Material e Métodos	24
1. Coleta do Material Vegetal	24
2. Extração dos Polissacarídeos	24
3. Extração dos Metabólitos Secundários	26
3.1. Obtenção do Extrato Hidroalcoólico	26
3.2. Obtenção do Extrato Aquoso	27
4. Caracterização Química	27
4.1. Composição Monossacarídica Neutra	27
4.1.1. Macroensaio	27
4.1.2. Microensaio	28
4.2. Dosagem de Carboidratos Totais	29
4.3. Dosagem de Proteínas	29
4.4. Dosagem de Ácidos Urônicos	30
4.5. Teste em Radiação Infravermelho (IR)	30

4.6. Análise dos Metabólitos Secundários.....	30
4.6.1. Dosagem de Fenólicos Totais	30
4.6.2. Cromatografia em Camada Delgada (TLC)	31
5. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	31
III. Resultados e Discussão	33
1. Caracterização Química	33
1.1. Composição Monossacarídica Neutra.....	33
1.2. Dosagens Colorimétricas	34
1.3. Teste em Radiação Infra-Vermelho (IR).....	35
1.4. Análise dos Metabólitos Secundários.....	36
1.4.1. Dosagem de Fenólicos Totais	37
1.4.2. Cromatografia em Camada Delgada (TLC)	38
2. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	39
IV. Conclusões	42
V. Referências Bibliográficas.....	43

I. Introdução

A busca por formas alternativas de combate às patologias é indispensável e constante, uma vez que, a farmacologia moderna não supre todas as necessidades terapêuticas da população. A fitoterapia se mostra como uma excelente opção para o combate a esta deficiência, geralmente mais viável, devido à grande disponibilidade e baixo valor econômico. Toda espécie de planta possui moléculas bioativas específicas (metabólitos primários e secundários), possivelmente medicinais, as quais se expressam de forma distinta em diferentes partes da planta (raiz, caule, folha, flor, semente, etc.) (RAVEN, 2007). Estas inúmeras possibilidades, aliado à ausência de conhecimentos na área, tornam a fitoterapia uma vasta e promissora linha de pesquisa. E ainda neste raciocínio, a fitoterapia se mostra como um forte aliado às políticas conservacionistas, se apresentando como um explícito exemplo do auxílio, econômico e terapêutico, que a biodiversidade proporciona ao homem.

Atualmente, plantas medicinais são cada vez mais utilizadas, tanto diretamente na produção de extratos, pomadas, xaropes e compressas, como indiretamente, no fornecimento de precursores de fármacos sintéticos (DAJOZ, 2005, LAMEIRA, 2008). Assim, pesquisas de caracterização e quantificação de compostos bioativos, auxiliam tanto no fortalecimento da fitoterapia popular, quanto à farmacologia moderna, padronizando minuciosamente a química das amostras e seus respectivos efeitos biológicos. Esta padronização é de suma importância, devido a grandes variações da expressão de determinadas moléculas nas plantas, que podem estar relacionadas com variações ambientais e/ou especificidades metodológicas de extração (TAIZ & ZEIGER, 2009). A maioria das aplicações farmacológicas está relacionada à presença de metabólitos secundários (DI STASI, 1996), entretanto, moléculas bioativas provenientes do metabolismo primário das plantas também possuem efeitos biológicos significativos, e que devem ser averiguados. Polissacarídeos, especificamente, são comprovadamente aplicáveis em diversos setores da indústria, principalmente pela sua capacidade de alterar as propriedades físico-químicas de soluções a base de água (ASPINALL, 1982). No

setor alimentício são usados como seqüestrantes de cátions, estabilizantes de cervejas, geleificantes e adoçantes não cariogênicos; na produção de etanol, como precursores para a bioconversão e produção de etanol em condições anaeróbicas (WINKELHAUSEN, 1998). Na farmacologia, estudos com polissacarídeos se concentram nos efeitos antinociceptivos, antiinflamatória, imunomoduladora e antitumorais, como na lentinana (SUZUKI, 1994). Ainda, alguns polissacarídeos são muito utilizados, na produção de papel, fibras e cosméticos (WILKIE, 1983), como também para diferenciação/agrupamento de grupos vegetais, sendo um excelente critério taxonômico (CARPITA, 1996).

Muitas doenças humanas, como malária, diabetes, disfunções cardiovasculares, e doença de Parkinson, estão sendo atribuídas ao estresse oxidativo, o qual libera inúmeros radicais livres ativos. Neste sentido, muito são os estudos de busca a novos produtos com capacidade de minimizar estes danos oxidativos. Estes produtos, chamados compostos antioxidantes atuam reagindo com os radicais livres e também na captação de oxigênio. Muitas plantas apresentam capacidade antioxidante, principalmente relacionado com compostos fenólicos e flavonóides (ASAOLU, 2010).

O abacateiro (*Persea americana*), objeto de estudo possui ampla importância medicinal/econômica determinada (SANTOS, 1988; LORENZI, 2008). No processamento industrial do abacate, geralmente, muito material como cascas, sementes, galhos, e folhas, são perdidos devido ao desconhecimento da composição química destas partes. A exploração fitoquímica destas porções pode acrescentar em novos produtos para a indústria do abacateiro (WANG, 2010). Pesquisas anteriores evidenciam inúmeras aplicações relacionadas a uma parte específica do abacateiro. A fruta (abacate), além de ser um alimento altamente nutritivo, apresenta atividade citotóxica e inseticida (OBERLIES, 1998); a semente parece ter atividade tóxica, larvicida e antifúngico (LEITE, 2009); e finalmente, as folhas, as quais possuem efeito antiviral (DE ALMEIDA, 1998), anti-inflamatório e analgésico (ADEYEMI, 2002), anticonvulsante (OJEWOLE, 2006), e regulador da glicemia, colesterolemia (BRAI, 2007) e pressão arterial (ADEBOYE, 1998; OWOLABI, 2005). Entretanto, a grande maioria destes experimentos relaciona o efeito biológico com a presença de um metabólito secundário específico da fração

testada. A total ausência de relatos sobre polissacarídeos foliares na literatura, somado aos inúmeros efeitos biológicos antes descritos, faz com que a caracterização química destes compostos se torne imprescindível. Por fim, mesmo o abacateiro sendo uma planta com muitas propriedades terapêuticas descritas, não foi encontrada nenhuma referência com relação à atividade antioxidante dos extratos aquosos e hidroalcoólicos foliares, apenas para extrações metanólicas, e outras, relacionadas às sementes, cascas e polpas do fruto. Portanto, é válido testar este potencial nas folhas do abacateiro.

1. Objetivos

1.1. Objetivos Gerais

- a. Isolar e caracterizar os polissacarídeos e metabólitos secundários provenientes das folhas de *Persea americana*.
- b. Avaliar o potencial antioxidante das folhas do abacateiro.

1.2. Objetivos Específicos

- a. Obter os polissacarídeos das folhas de *P. americana* por extrações seqüenciais, infusão e decocctos aquosos.
- b. Determinar a composição monossacarídica dos polissacarídeos foliares
- c. Obter os metabólitos secundários das folhas do abacateiro por infusão aquosa, e solução hidroalcoólica.
- d. Promover testes qualitativos e quantitativos dos metabólitos secundários.
- e. Avaliar a atividade antioxidante.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Fitoterapia

A fitoterapia folclórica (etnobotânica) foi substituída pela farmacologia moderna, uma vez que é exageradamente baseada em sintomas, fazendo com que sua ação seja menos específica quando comparada com os compostos sintéticos. Este baixo conhecimento peculiar de cada fitofármaco faz com que aumente os casos de intoxicações por mau uso do vegetal. Entretanto, outro caminho, contendo um forte componente social e cultural, especialmente em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, encontra nas plantas medicinais uma importante oportunidade de solução de problemas de saúde, por meio da produção, comercialização e utilização de fitoterápicos padronizados (DI STASI, 1996). Assim, nas últimas décadas, a fitoterapia tem sido revitalizada devido às análises mais objetivas das ciências médicas e da química farmacêutica (LAMEIRA, 2008), obtendo assim, novas substâncias com atividade farmacológica definida e com grande potencialidade de transformação em medicamentos (DI STASI, 1996). Em 2005, cerca de 57% dos medicamentos mais prescritos nos Estados Unidos continham pelo menos um composto de origem vegetal. Alguns produtos, como a digitalina, são exemplos de compostos que ainda não podem ser sintetizados e necessariamente devem ser extraídos das plantas. Dado que uma porcentagem muito baixa do conjunto das plantas foi testada no que se refere às suas propriedades alimentares, industriais ou medicinais, imagina-se as consequências enormes que pode acarretar a perda de biodiversidade (DAJOZ, 2005).

2.2. Compostos Vegetais

Os compostos vegetais são, amplamente, classificados em dois grandes grupos: os ligados diretamente ao crescimento e desenvolvimento do vegetal (metabólitos primários), e os chamados metabólitos secundários, cuja função está mais associada, à proteção contra herbivoria, à atração de polinizadores/dispersores e à competição planta-planta. Além desta diferença funcional, existe uma diferença espacial entre esses dois grupos. Se por um lado os metabólitos primários

(aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e acil lipídeos) apresentam ampla distribuição em todos grupos de vegetais, por outro, os metabólitos secundários são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas (TAIZ & ZEIGER, 2009).

A função dos metabólitos secundários, por muito tempo, ficou no desconhecimento humano, justamente por não constituírem um grupo de compostos diretamente relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta. Entretanto, atualmente, sabe-se que estes compostos realizam um papel essencial para a sobrevivência e propagação das espécies que os produzem. Muitos deles são sinais químicos que permitem à planta responder a estímulos externos. Outros funcionam na defesa da planta contra herbivoria, patógenos e competidores. Alguns fornecem proteção contra a radiação solar, enquanto outros contribuem para a polinização e dispersão de pólen e sementes (RAVEN, 2007). Estes compostos são quimicamente subdivididos em três principais grupos: compostos fenólicos, compostos nitrogenados e terpenos. Os compostos nitrogenados são farmacologicamente os mais estudados e descritos, sendo representados, principalmente pela subclasse dos alcalóides. Dentre os terpenos, os óleos essenciais são frequentemente utilizados na indústria farmacêutica, por suas propriedades desinfetantes, antibacteriana e alimentícia, como aromatizantes (ALONSO, 2004). Os compostos fenólicos variam muito com relação a sua estrutura química (podendo ser solúvel em solvente orgânico ou aquoso). Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos, fazendo parte também do metabolismo animal. Estes, no entanto, em princípio não são capazes de sintetizar o anel aromático e os compostos fenólicos, então utilizam o anel benzênico proveniente da dieta alimentar. Os compostos fenólicos são muito utilizados industrialmente na produção de resinas, corantes, explosivos (fenol, *p*-cresol, resorcinol); como reveladores fotográficos (hidroquinona, catecol e pirogallol); na produção de tintas (ácido gálico) e na indústria alimentícia, como antioxidantes (SIMÕES, 2007). São divididos em três classes: (a) derivados do ácido benzóico e cumárico; (b) flavonóides, isoflavonóides e antocianinas; e (c) taninos. No primeiro grupo (a), encontra-se, por exemplo, as cumarinas e hidroxycumarinas, que são substâncias com odor característico, e cujo efeito biológico (anticoagulante, tóxico, imunossupressor, relaxante vascular,

hipotensora, etc.) está sendo fortemente estudado. Os flavonóides (b) são compostos de grande interesse farmacológico e, são responsáveis pela coloração de frutos e flores, além de atuar na dispersão e polinização da planta. Por ultimo, os taninos (3), que são substâncias hidrossolúveis com grande importância terapêutica principalmente pela atividade de coagulação de proteínas (SIMÕES, 2007; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os metabólitos secundários não são distribuídos de forma uniforme pela planta. A sua produção ocorre num órgão ou tecido específico em determinado estágio de desenvolvimento da planta (por exemplo, durante desenvolvimentos de flores, frutos, sementes, etc.). Além disso, sua concentração na planta frequentemente varia muito ao longo de um período de 24 horas (RAVEN, 2007). Por exemplo, a fenilalanina amônia liase (PAL) é uma importante enzima, envolvida no metabolismo de vários compostos fenólicos, que possui expressão regulada por fatores externos como concentração de nutrientes, luz (efeito nos fitocromos), e infecções por fungos. Algumas cumarinas (furanocumarinas) são atóxicas até que a luz ultravioleta as ative, transformando-as em com composto de alta energia (alta citotoxicidade). Em algumas plantas, o ferimento mecânico repetitivo ou até moléculas provenientes da saliva de um herbívoro podem agir como promotores da expressão de um determinado composto (TAIZ & ZEIGER, 2009). Dependendo do método de extração, alguns componentes da planta podem ser mais ou menos expressos, o café, por exemplo, possui seus constituintes variando de acordo com o grau da torra. O ácido clorogênico reage durante a torra, produzindo compostos ácidos, lactonas e outros derivados fenólicos que contribuem para o aroma e sabor do café, acidez final e adstringência da bebida. Por outro lado, o teor de cafeína não apresenta diferenças em relação a torra (MORAIS, 2009).

Polissacarídeos são compostos com capacidade de emulsificar, estabilizar, encapsular, revestir, aderir, formar filmes e flocular. Devido a estas propriedades, são muito utilizados em diversas áreas da indústria, principalmente no setor alimentício, como por exemplo, o ágar, carragenana e alginato – três polissacarídeos extraídos de algas muito consumidas na alimentação global, em especial no oriente. Na produção de papel, são utilizados para dar características ao papel como espessura e tamanho; na agricultura atuam na produção de pesticidas,

fertilizantes para a formação de uma viscosidade específica para o produto; atuam também na produção de tintas, adesivos, etc (ASPINALL, 1982). Especificamente, seu uso terapêutico vem sendo geralmente relacionado a ação antitumoral. A lentinana, um composto extraído do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*), é um exemplo de polissacarídeo com propriedades antitumorais descritas. Estudos recentes buscam elucidar os mecanismos que a lentinana realiza para promover o efeito antitumoral *in vivo* (SUZUKI, 1994).

As arabinanas são polímeros formados por L-arabinose, as quais, normalmente estão presentes na forma de furanosídeos. São compostos que são extraídos de diversas partes da planta, incluindo sementes, frutos, cascas e madeira. Estruturalmente, a cadeia de principal das arabinanas são compostos por resíduos de α -L-Araf ligados (1 \rightarrow 5), a partir desta cadeia principal, são ligados outras α -L-Araf, principalmente no O-3, mas também no O-2. As arabinogalactanas são polissacarídeos divididos em dois grandes grupos. As cadeias do tipo I são denominadas de L-arabino-D-galactanas pécticas, e são caracterizados por possuir uma cadeia principal linear. Ou seja, em geral, são formados por uma cadeia linear principal de β -D-galactana ligados (1 \rightarrow 4) onde os resíduos de arabinose são ligados no O-3. Foram relatados casos de outros açúcares como xilose, glucose, ramnose e ácidos urônicos presentes nestes compostos, por outro lado, não se teve nenhum relato, até agora, sobre arabinogalactanas do tipo I ligadas a proteínas. As arabinogalactanas do tipo I são comumente encontradas em vários tipos de sementes, entretanto são poucos significantes em grãos de cereais. Arabinogalactanas do tipo II são compostos por 3,6-D-galactose ramificadas e ligadas por unidades L-arabinose. São polissacarídeos neutros que apresentam 10 a 80% de arabinose, além de outros monossacarídeos em sua composição. Sua estrutura é bem complexa, o que torna a sua caracterização química muito mais difícil. Esta grande complexidade destes tipos de polissacarídeos faz com que as arabinogalactanas do tipo II sejam um significativo critério taxonômico. Por outro lado, estes compostos são facilmente extraídos por possuírem alta solubilidade em água, e por em geral, serem abundantes nas cascas, caules, folhas e frutos das plantas. Ao contrário das arabinogalactanas do tipo I, estes compostos são comumente encontrados ligados covalentemente às proteínas (proteoglicanos),

formando complexos chamados de arabinogalactanas-proteínas ou AGPs (ASPINALL, 1982; CARNEIRO, 2000).

2.3. *Persea americana*, o abacateiro

Esta espécie, juntamente com a imbuía (*Ocotea porosa*), o louro (*Laurus nobilis*), a cânfora (*Cinnamomum camphora*) e as canelas, são pertencentes à família Lauraceae, a qual possuiu ampla distribuição principalmente tropical e subtropical. A família inclui cerca de 50 gêneros e 2500 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 25 gêneros e cerca de 400 espécies. As Lauraceae representam uma das famílias de maior destaque na composição florística de grande parte dos ecossistemas florestais, em especial da mata atlântica e em florestas da região sul do Brasil (SOUZA, 2005). O abacateiro (*Persea americana*) é uma planta arbórea, de porte médio (cerca de 8 a 20 metros), ramos abundantes, e tronco reto com cor parda. Possui uma copa ampla com folhas grandes, simples, oblongas, alternas, brilhantes na face superior e foscas na inferior, podendo ser mais avermelhadas quando novas. Flores pequenas, branco-amareladas dispostas em inflorescências do tipo cacho. Fruto comestível em forma de drupa esférica ou piriforme e de cor verde-amarelada (SANTOS, 1988; ALONSO, 2004). A polpa do abacate é oleosa, amarelada e similar a manteiga (ALONSO, 2004). Segundo a literatura, o abacateiro possuiu os seguintes componentes químicos:

a) Folhas - Triagens feitas no extrato aquoso foliar de *P. americana* demonstraram a presença de metabólitos secundários como alcalóides, taninos, saponinas e flavonóides (ADEYEMI, 2002). Já para a extração metanólica, alcalóides, cumarinas, triterpenos (ADEBOYE, 1998). Ainda sobre os compostos do extrato metanólico, se destacam a presença de fenóis totais ($1,22 \pm 0,52\%$) e flavonóides ($0,58 \pm 0,09\%$), além de saponinas, taninos, alcalóides, antraquinonas, triterpenos e flobataninos (ASAOLU, 2010). Contêm um óleo essencial muito variável, rico em estragol, metilchavicol (36,8%), α -pineno (16%), β -pineno (15%), metileugenol (10,3%), cineol e limoneno. Além do óleo essencial, as folhas apresentam dopaminas, serotoninas, flavonóides (quercetina, catequina, epicatequina, e cianidina), um princípio amargo (abacatina), persiteol, taninos,

persina e tiramina. (ALONSO, 2004). Duas substâncias foram caracterizadas (com análise UV e RMN C¹³ e H¹) a partir de uma fração com atividade antiviral das folhas do abacateiro (infusão aquosa), o kaempferol e a quercetina 3-O-a-D-arabinopiranosídeo (DE ALMEIDA, 1998).

b) Casca do fruto - Estudos recentes indicam que a semente possui concentrações bem maiores de flavonóis totais, quando comparados com a polpa (menor concentração) e a casca do fruto (concentração intermediária), sendo majoritariamente representados pelas procianidinas. Destes compostos, se incluem a catequina, epicatequina, dímeros tipo A e B, trímeros tipo A e B, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros (WANG, 2010).

c) Sementes - Possuem ácidos graxos (alto teor de alfa-tocoferol), proantocianidina, hidrocarbonetos, derivados esteróidais, taninos, polifenóis e uma saponina (ALONSO, 2004). Apresentam flavonóis totais em grande quantidade (WANG, 2010).

d) Flores - Grande quantidade de flavonóides como a quercetina-3-O-ramnósido, isoramnetina-3-O-glucosídeo, cumaril-kaempferol, etc. (ALONSO, 2004).

e) Raízes - Altas concentrações de stigmastan-3,5-dieno presente na extração clorofórmica das raízes do abacateiro (PÉREZ, 2009).

f) Polpa do fruto - Rico em ácidos graxos como, oléico, linoléico, palmítico, esteárico, linolênico, cáprico e mirístico. Possui também hidrocarbonetos alifáticos saturados, esqueleno, alcoóis alifáticos e terpênicos, β -sitosterol, um poliol não saturado, vitaminas A, E, aminoácidos (ácidos aspártico e glutâmico) e GABA. E também, contém fósforo, ferro, tiamina, riboflavina, niacina e ácido ascórbico (ALONSO, 2004). Apresentam a mesma composição, mas em baixos níveis, de flavonóis totais quando comparado às sementes e cascas dos frutos (WANG, 2010).

Etnofarmacologicamente, o abacateiro é utilizado para inúmeros distúrbios medicinais. O fruto parece ter propriedades carminativas e útil contra ácido úrico, enquanto chás das folhas, cascas e sementes são considerados diuréticos, antirreumáticos, carminativos, anti-anêmicos, antidiarrêicos e anti-infecciosos para os rins e bexigas, além de estimulantes da vesícula biliar, estomáquicos, emenagogos e balsâmicos (LORENZI, 2008). No Congo, o decocto da casca do caule é comumente utilizado para aliviar as crises de tosse, enquanto no México é

considerado afrodisíaco, emenagogo, preventivo contra abortos. As folhas são usadas no Brasil, Jamaica e Nigéria, no tratamento de casos de hipertensão (OWOLABI, 2005).

A infusão das folhas tem atividade espasmogênicas sobre o íleo de suínos e útero de rata, como também efeito hipotensor e depressor do sistema respiratório. O extrato etanólico de folhas do abacateiro demonstrou um efeito diurético em ratos. O fruto, submetido à infusão, demonstrou uma ação larvicida sobre mosquitos *Anopheles gambiae*, uma espécie transmissora da febre amarela. Neste experimento, a ação larvicida do fruto imaturo foi notoriamente superior à ação da rotenona, um inseticida comum. O conjunto de proantocianidinas, taninos condensados, flavonas e catequinas seriam responsáveis por uma neutralização de hemorragias induzidas por veneno da serpente *Bothrops asper*. A atividade antimicrobiana é bastante descrita principalmente relacionada aos óleos essenciais da semente do abacate. Para os estudos da ação antitumoral, os resultados indicam o fruto imaturo e a polpa como as porções mais eficientes para este tipo de tratamento. (ALONSO, 2004).

Os extratos aquosos e metanólicos das folhas de *P. americana* apresentaram ação hipoglicemiante (redução de 16 e 11% de glucose sanguínea respectivamente) e hipocolesterolemiantes (redução de 8 e 5% de colesterol totais respectivamente) em ratos. No entanto, a ação para controle do colesterol é mais complexa, dependendo de um estado mais peculiar do animal para obter efeitos regulatórios. O estudo foi realizado com ratos albinos com hipercolesterolemia induzida (concentração de glucose e colesterol total elevadas no plasma) a partir de uma dieta composta de 20% de óleo de amendoim, 0,5% de colesterol e 0,25% de ácido cólico. Estes ratos foram submetidos a um tratamento com os extratos aquosos e metanólicos por oito semanas (BRAI, 2007).

Compostos foliares do abacateiro exibiram uma ação antiviral (viruestática e virucida). Ao contrário da extração etanólica, as extrações aquosa e metanólica apresentaram grande inibição da replicação de três vírus distintos: AVD (Aujeszky Disease Vírus ou doença do porco), HSV-1 (Herpes Simplex tipo 1), e Ad3 (Adenovírus tipo 3). Em altas concentrações, as extrações apresentaram efeito tóxico contra HSV-1 e AVD (DE ALMEIDA, 1998).

Testes em camundongos evidenciaram os efeitos analgésico e anti-inflamatório de extrações aquosas das folhas de *Persea americana*. Sob as condições dos experimentos, os extratos foram comparados com fármacos sintéticos comuns. No primeiro teste da ação analgésica (contagem do número de contorções em camundongos), 1600mg/kg de extrato aquoso teve efeito similar a 100mg/kg de ácido acetil salicílico, já no segundo teste (teste sobre placa quente), a ação de 800mg/kg de extrato foi comparada com 2mg/kg de morfina. Um terceiro teste (teste de formalina) indicou que 800mg/kg do extrato teve um efeito analgésico superior à 100mg/kg de ácido acetil salicílico. Neste teste, a dor era causada pela adição de formalina (região subcutânea da pata), e mensurada através da contagem do tempo gasto com lambidas e mordidas no local. Para a ação anti-inflamatória, a diminuição do edema provocado pela adição de carragenana na pata do animal foi analisada e, 800mg/kg de extrato aquoso teve ação de diminuição do edema semelhante a 10 mg/kg de indometacina, embora este último tenha uma ação mais imediata (ADEYEMI, 2002).

A ação anticonvulsante do extrato foliar foi testada em camundongos e, se mostrou positivamente ativo, atenuando e até inibindo os efeitos de algumas substâncias indutoras de convulsões previamente descritas, PTZ-pentylentetrazole, PCT - picrotoxin e BCL – bicuculline, sempre comparando o extrato com dois anticonvulsantes comuns, fenobarbitona e diazepam. A ação anticonvulsante foi observada a partir das diminuições de espasmos ou convulsões no camundongo (OJEWOLE, 2006).

As folhas do abacateiro demonstram ser um efetivo instrumento etnobotânico para o tratamento e gestão de problemas causados pela hipertensão arterial. O extrato aquoso possui ação vasorelaxante, a qual se deve, provavelmente, pela inibição do fluxo de Ca^{++} pelos canais voltagem dependentes e dependentes de fatores relaxantes derivados do endotélio vascular. O teste foi feito a partir de anéis de aorta isolados de ratos. Estes anéis foram previamente contraídos com noradrenalina, seguido de adição do extrato aquoso. A ação vasorelaxante foi observada comparando a dilatação do anel da aorta do extrato com diversos vasorelaxantes sintéticos comuns (OWOLABI, 2005).

Extrações aquosas e metanólicas das folhas do abacateiro demonstraram atividade hipotensiva dose dependente quanto testados em camundongos. No entanto, seu efeito é rápido e passageiro, não ultrapassando 3 minutos, o que pode ser devido ao acelerado metabolismo dos animais testados. Os extratos eram administrados pela via intravenosa e a pressão, então, era mensurada com auxílio de um cateter acoplado a artéria carótida. Não foram observadas diferenças significativas entre a ação hipotensiva do extrato aquoso e metanólico (ADEBOYE, 1998).

Compostos provenientes do fruto verde demonstraram citotoxicidade contra seis linhagens específicas de tumores humanos, além de desempenharem um efeito inseticida mais potente que a rotenona (inseticida anteriormente descrito e comumente utilizado) contra larvas do mosquito da febre amarela, *Aedes sp* (OBERLIES, 1998).

As sementes de *Persea americana*, sob extração hexanólica e metanólica, exibiram efeitos tóxicos contra *Artemia salina*, larvicida contra *Aedes aegypti* e antifúngico contra cepas de *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia pachydermatis*. Extratos hexânicos demonstraram possuir compostos mais eficientes, na toxicidade para o crustáceo (*Artemia salina*), e na inibição do crescimento de larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Enquanto que a extração metanólica se mostrou mais efetivo contra as três leveduras estudadas (LEITE, 2009).

Extratos provenientes da raiz do abacateiro apresentaram componentes com grande capacidade antifúngica, inibindo o crescimento micelial (em até 100%) do oomicete *Phytophthora cinnamomi*. Ainda, pode-se caracterizar por TLC e GC-MS, a principal molécula presente nestes extratos antifúngicos, stigmastan-3,5-dieno (PÉREZ, 2009).

De acordo com testes realizados por WANG, 2010, as sementes, cascas e polpa do fruto do abacateiro apresentam potenciais antioxidantes. E para todas as análises, as sementes apresentaram maior capacidade antioxidante, enquanto que a polpa teve a menor. Este maior potencial pode ser relacionado com a maior concentração de compostos fenólicos (principalmente procianidinas) presentes na

semente, sugerindo que as procianidinas são compostos que contribuem bastante na capacidade antioxidante do material estudado (WANG, 2010).

Foi demonstrado que o extrato metanólico das folhas de *Persea americana* tem potencial antioxidante, sendo também comparado com *Cnidoscopus aconitifolius*, ácido ascórbico, quercetina e, BHA. A ação antioxidante foi mensurada pelos métodos DPPH e óxido nítrico. As folhas do abacateiro apresentaram atividade bem maior quando comparada com *Cnidoscopus aconitifolius*, no entanto, a ação antioxidante foi menor em relação ao ácido ascórbico, quercetina e BHA (ASAOLU, 2010).

Os frutos, em geral, são bem tolerados pelo consumo humano. Foram documentados poucos casos de intoxicações associadas, geralmente, à presença de látex no abacate. A partir do extrato aquoso do fruto aplicado em ratos, foi feito o teste de dose letal 50%, DL_{50} , e para a administração oral, 12,5g/kg; já para a intraperitonal, 8,83g/kg. Em um teste de toxicidade, um grupo de caprinos, que estavam amamentando as crias, foram alimentados diariamente com folhas frescas de *P. americana* e sofreram atrofia dos ductos lactíferos com necrose do epitélio acinar e conseqüente redução da produção de leite. Outro ensaio com caprinos demonstrou que a ingestão diária das folhas pode causar lesões nos miocárdios, provavelmente relacionado com a substância denominada persina (ALONSO, 2004).

II. Material e Métodos

1. Coleta do Material Vegetal

Foram realizadas duas coletas de folhas de *P. americana*, a primeira (1ª coleta) foi destinada a uma análise dos polissacarídeos e a segunda (2ª coleta), foi destinada principalmente à obtenção dos extratos brutos para a caracterização de metabólitos secundários e atividade antioxidante. A metodologia de obtenção das amostras variou de acordo com o tipo e objetivo específicos para os extratos.

A 1ª coleta foi realizada em julho de 2009 em um condomínio situado na Rua Luiz Ronaldo Canalli, 3025, (S-25,461462, O-49,3322) bairro Campo Comprido, Curitiba – PR, por Letícia Moraes Pak. As folhas de *P. americana* escolhidas eram adultas (nem em desenvolvimento/pequenas e avermelhadas, nem em processo de morte/ressecadas) e íntegras (ausência de injúrias ou parasitas). Estas folhas foram destinadas às extrações sequenciais dos polissacarídeos.

O abacateiro escolhido para a 2ª coleta está localizado no Centro Politécnico UFPR, Curitiba-PR, Brasil. Rua Coronel Francisco H. Santos, 100, CEP 81530-000 (S-25,447015, O-49,233134). A coleta foi realizada no dia 22 de outubro de 2010, às 10h de uma manhã com aproximadamente 15°C. As folhas foram coletadas sob os mesmos parâmetros da primeira coleta, folhas adultas e íntegras. A porcentagem de umidade foi estimada em aproximadamente 65,5%. Estas folhas foram destinadas a obtenção de três extratos diferentes: um decocto aquoso, uma infusão aquosa e um hidroalcoólico.

2. Extração dos Polissacarídeos

As folhas coletadas foram esterilizadas através de lavagens utilizando etanol 70% e H₂O destilada. O processo teve como objetivo retirar as contaminações que se depositaram sobre o material vegetal, bem como alguns possíveis parasitas.

O material foi seco na estufa (a 40°C) por vários dias sempre quantificando o peso diariamente. Quando o peso não sofreu alteração, foi calculado a porcentagem

de umidade, e as folhas foram retiradas da estufa e trituradas em processador de alimentos.

O material pulverizado resultante foi inativado enzimaticamente com solução metanol/água destilada 2:1 (v/v), sob refluxo (fervura por 40min) e posteriormente, filtrado em um filtro de pano. O volume de solução utilizado foi o suficiente para cobrir o material dentro de um balão volumétrico e foi descartado após a filtração em um pano. O resíduo foi totalmente seco à temperatura ambiente e submetido à deslipidificação, que foi realizada com a adição de solução tolueno/etanol 2:1 (v/v), também sob refluxo (fervura por 20min). O material foi filtrado (em filtro de pano), a porção solúvel descartada e o resíduo seco por vários dias (à temperatura ambiente) e pesado antes de serem submetidos às extrações aquosas. O solvente (solução tolueno/etanol 2:1) promove a retirada da fração lipofílica ou apolar (principalmente clorofila) do material vegetal.

A precipitação etanólica para a obtenção das frações polissacarídicas foi realizada adicionando etanol em um volume três vezes maior que o volume do extrato, resultando em uma solução etanol/extração aquosa 3:1 (v/v). O material foi resfriado em geladeira comum por alguns dias, otimizando assim, o processo de agregação das moléculas, e possibilitando a posterior filtragem (filtro de pano) das amostras.

As extrações dos polissacarídeos presentes nas folhas do abacateiro foram realizadas de três formas:

1. Extrações aquosas sequenciais:

A primeira extração (470 g de material moído) foi à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), com adição de H_2O destilada e agitado por quatro horas. Posteriormente, o material foi submetido a quatro extrações aquosas sequenciais a quente (80°C) e também agitadas periodicamente por quatro horas. Após a filtração em pano, os filtrados foram submetidos à precipitação etanólica. Assim, após a liofilização, foram obtidas cinco frações polissacarídicas oriundas das extrações seqüenciais, são elas: EF – extração aquosa a frio; 1EQ; 2EQ; 3EQ; 4EQ – 1ª, 2ª, 3ª e 4ª extrações aquosas a quente, respectivamente.

2. Infusão:

Água destilada fervente (500 mL) foi adicionada a 100 g de folhas secas e pulverizadas (2ª coleta). A solução ficou mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, mimetizando a forma popular comum de extrações aquosas (infusão) e então filtrada e liofilizada. Com o objetivo de identificar a presença de polissacarídeos na forma popularmente utilizada, procedeu-se a solubilização de uma alíquota deste material liofilizado, seguida a da precipitação com etanol para análise dos monossacarídeos em cromatografia gasosa. Esta fração foi denominada IAPol.

3. Decocção:

Água destilada fervente (500 mL) foi adicionada a 100 g de folhas secas e pulverizadas (2ª coleta). A solução foi mantida em banho fervente por 5 minutos e, após isso, 10 minutos em repouso. O material foi filtrado em pano e ao filtrado foi adicionado três volumes de etanol, que após liofilização originou a fração DA.

3. Extração dos Metabólitos Secundários

As folhas da 2ª coleta não passaram pela fase de deslipidificação e inativação enzimática conforme feito nas folhas da primeira coleta. Estes processos poderiam causar a perda dos metabólitos secundários presentes nas folhas. Então, as folhas foram apenas esterilizadas em etanol e H₂O destilada, a secas a 40°C, e a moídas em processador de alimentos.

3.1. Obtenção do Extrato Hidroalcoólico

A extração hidroalcoólica foi realizada com adição de 500mL de etanol 70% sobre 100g das folhas secas e moídas. O frasco permaneceu à temperatura ambiente, por quatro dias, no escuro, com agitação ocasional. Após esse tempo, a solução foi filtrada, seca em rotaevaporador e liofilizada. Esta fração, denominada EH, foi destinada aos testes de metabólitos secundários, fenóis totais e atividade antioxidante.

3.2. Obtenção do Extrato Aquoso

O extrato bruto aquoso por infusão foi obtido pela adição de 500mL de água destilada (100°C) a 100g das folhas secas. A solução ficou mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, mimetizando a forma popular comum de extrações aquosas (infusão) e então filtrada e liofilizada, originando a fração IA.

4. Caracterização Química

4.1. Composição Monossacarídica Neutra

As frações obtidas das extrações para polissacarídeos foram submetidas à análise de monossacarídeos neutros. Para isso, as amostras foram derivatizadas até acetatos de alditóis (hidrólise, redução e acetilação), pois somente um composto volátil e solúvel em clorofórmio (CHCl_3) pode ser analisado em cromatografia gasosa. Foram utilizados dois métodos para a derivatização das amostras. O primeiro método, chamado de macroensaio (WOLFROM & THOMPSON, 1963; WOLFROM & THOMPSON, 1963) e o microensaio (ALBERSHEIM et al, 1967),

4.1.1. Macroensaio

a. Hidrólise Ácida Total – Aproximadamente 10mg de cada amostra foi colocada em tubos de hidrólise, os quais permaneceram no interior da estufa (100°C) sob ação de 1mL do reagente ácido trifluoroacético (TFA) 2M, por 8h. Após a hidrólise, as amostras foram transferidas para vidros de relógio e secas à temperatura ambiente

b. Redução – As amostras foram solubilizadas com H_2O destilada e reduzidas pela adição de borohidreto de sódio (NaBH_4). Após o pH da solução atingir 9 foi acrescentada resina catiônica até que o pH atingir 7, indicando a remoção dos íons Na^+ . Posteriormente à filtração (algodão) e secagem, as amostras sofreram sucessivas lavagens com metanol (1mL) intercaladas por secagens até que todo o ácido bórico seja eliminado.

c. Acetilação – Foi adicionado 1mL de anidrido acético ($C_4H_6O_3$) e 1mL de piridina (C_5H_5N) nas amostras, as quais foram agitadas e mantidas em repouso *overnight* sob temperatura ambiente. As amostras foram extraídas com clorofórmio ($CHCl_3$) e lavadas cinco vezes com sulfato de cobre $Cu(SO_4)$ 5%, o qual atua na retirada da piridina. A ausência da piridina foi observada pela mudança na coloração da fase aquosa da solução de azul escuro (cor do sulfato de cobre com piridina) para azul claro (cor do sulfato de cobre). Diversas lavagens com H_2O destilada, da mesma forma que com o sulfato de cobre, faz com que a fase aquosa seja diluída até que todo o sulfato de cobre seja retirado (azul claro → translúcido). Com o auxílio de uma pipeta pasteur, a fase clorofórmica (inferior) foi retirada e transferida a um tubo para análise em cromatografia gasosa.

4.1.2. Microensaio

Para o microensaio (ALBERSHEIM et al, 1967), a derivatização ocorreu com algumas alterações no protocolo. Principalmente com relação ao tempo e à quantidade de reagentes que cada método necessita. A hidrólise foi realizada com aproximadamente 100 μ L de TFA 2,5 M em 200 μ g de amostra em estufa ($100^\circ C$) por 2 horas. O produto da hidrólise foi seco (em N_2) e então foi adicionando 50 μ L de hidróxido de amônio (NH_4OH) 1M, seguido de 50 μ L de solução de borohidreto de sódio 1M em hidróxido de amônio 2M, para a redução. A seguir o ácido bórico foi retirado através de quatro lavagens com metanol, intercaladas por secagem usando nitrogênio gasoso. O material seco, foi acetilado com anidrido acético (250 μ L) por 2,5 horas a $100^\circ C$, e então solubilizado em 2mL de H_2O destilada, interrompendo a reação de acetilação. Na seqüência, 1mL de clorofórmio foi adicionado para a extração dos monossacarídeos acetilados. O material foi lavado sucessivamente com H_2O destilada e a fase clorofórmica foi secada.

As amostras derivatizadas até acetatos de alditóis foram analisadas por cromatografia gasosa, pelo equipamento Thermo. Os tempos de retenções foram comparados com a mistura padrão (sugar mix) de acetato de alditóis, possibilitando

a identificação dos monossacarídeos neutros e a relação molar foi obtida pela comparação das áreas de cada monossacarídeo.

4.2. Dosagem de Carboidratos Totais

A dosagem foi realizada através do método adaptado de DUBOIS *et al.* (1956). O princípio deste método baseia-se na ação do ácido sulfúrico sobre o carboidrato, retirando duas moléculas de água formando o hidroximetilfurfural (para as hexoses) e o furfural (para as pentoses), os quais reagem com o fenol formando um complexo colorido. Em cada amostra, foi adicionado fenol 5% e ácido sulfúrico (H₂SO₄) PA, e posteriormente colocadas na estufa (100°C) por 10min. Os tubos foram mantidos em banho de gelo para cessar a reação e então a solução foi transferida para a placa de 96 poços para leitura a 490nm, em sistema Epoch espectrofotômetro multivolume, modelo ELX800 com leitor de absorbância em microplacas, da Biotek. Cada amostra foi feita em duplicata e as concentrações relativas foram calculadas, comparando os valores de absorbância das amostras com os valores da curva padrão (D-glucose em concentrações que variaram de 0,4µg a 40µg/40µL).

4.3. Dosagem de Proteínas

Foi utilizado o Método de Bradford (BRADFORD, 1976), com albumina bovina para a construção da curva padrão, em concentrações de 0,4 a 40µg/40µL. O método baseia-se no princípio da formação de um complexo pela ligação entre o corante (*Coomassie Brilliant Blue G 250*) e a proteína.

O reagente de proteínas foi adicionado à amostra, e posteriormente à agitação, uma porção de cada solução foi transferida para a placa de 96 poços. Para cada amostra, triplicatas foram feitas e lidas em comprimento de onda de 595nm, no espectrofotômetro Epoch.

4.4. Dosagem de Ácidos Urônicos

Foi utilizado o método do *m* - hidroxibifenil descrito por FILIZETTI-COZZ & CARPITA (1991) para esta determinação. A leitura foi feita a 520 nm, em espectrofotômetro Epoch. A percentagem de ácido urônico foi calculada a partir de uma curva de calibração utilizando concentrações que variam de 1 a 40µg/µL de ácido D-glucurônico.

4.5. Teste em Radiação Infravermelho (IR)

Trata-se de um teste de caracterização estrutural dos compostos a partir da identificação de ligações químicas específicas de cada molécula. Esta identificação foi feita a partir da relação comprimento de onda de absorção e tipo de ligação. Para este teste, uma quantidade de cada amostra foi liofilizada um dia antes da análise, pois a amostra deve estar bem seca. No dia da análise, foram feitas três pastilhas de análise em IR. Cada pastilha foi feita com uma pequena quantidade das amostras misturadas e moídas com KBr, e posteriormente submetido à compressão de 8ton por alguns segundos. As pastilhas foram então colocadas na máquina de radiação infravermelho modelo Excalibur FTS 3500GX da BIORAD. Para uma melhor análise, cada pastilha deve estar íntegra e menos espessas possível, facilitando a passagem da radiação. Foram feitas análises de três amostras, EH, IA e DA.

4.6. Análise dos Metabólitos Secundários

Foram feitos dois testes: um teste quantitativo de fenólicos totais e; um teste qualitativo dos metabólitos secundários através de cromatografia em camada delgada (CCD ou TLC). Optamos por realizar o teste de fenóis totais, pois são compostos comumente relacionados à atividade antioxidante de plantas.

4.6.1. Dosagem de Fenólicos Totais

Metodologia adaptada de Folin-Ciocalteu (McDONALD, 2001) em que as absorbâncias de três amostras (EH, IA e DA) foram comparadas ao padrão de ácido

gálico ($1\mu\text{g/mL}$ a $50\mu\text{g/mL}$). Neste método, $250\mu\text{L}$ de uma solução 1mg/mL das amostras foram adicionados a $1,25\text{mL}$ de reagente de Folin-Ciocalteu 10% e a 1mL de carbonato de Sódio 7,5%. Mantido em banho maria, 50°C , por 5 minutos. Todas as amostras, assim como as diversas concentrações de padrões, foram analisadas em triplicatas. A leitura foi feita no Espectrofotômetro Epoch em comprimento de onda de 760nm .

4.6.2. Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

A cromatografia em camada delgada (CCD ou TLC) é uma técnica muito utilizada para a separação de misturas. Logo, pode ser utilizada para a caracterização de amostras quando comparados com compostos padrões. Para este teste, utilizamos uma placa de sílica como fase estacionária e uma solução clorofórmio:metanol:ácido acético 90:10:1 (v:v:v) como fase móvel. Esta fase móvel foi colocada em uma cuba e a placa de sílica em cima na posição vertical. Quando a fase móvel chegou a $8,5\text{ cm}$ do início, a placa foi retirada da cuba e seca. Após a secagem, a placa foi visualizada sob a luz UV (254nm), possibilitando a marcação das bandas. A partir destas bandas foi possível realizar o cálculo de tempo de retenção das amostras. Os tempos de retenção (RF) das cinco amostras (EH, IA, DA, EF e 1EQ) foram calculados dividindo o comprimento percorrido por cada composto (início até banda) por $8,5$ (comprimento total). Os RFs das amostras foram comparados com os de sete padrões (ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido cafêico, e ácido ferulico).

5. Avaliação da Atividade Antioxidante

Para o teste da atividade antioxidante das amostras, foi utilizado o método de redução da concentração do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), segundo MORAIS, 2009. Neste teste, a redução DPPH (diminuição da absorbância) caracteriza a ação antioxidante de constituintes da amostra. Foram feitas sete soluções das amostras com a concentração variando de $10\mu\text{g/mL}$ a $640\mu\text{g/mL}$. Foram adicionados $100\mu\text{L}$ de solução DPPH 1mM (em metanol) a $300\mu\text{L}$ de cada

uma das soluções (sete concentrações). As análises das amostras foram feitas todas em triplicatas. O branco de cada amostra foi feito com adição de 100µL de etanol ao invés de DPPH. Para o branco do método (absorbância controle) foi adicionado 300µL de etanol e 100µL de DPPH 1mM. Após a adição de DPPH, os tubos foram agitados mecanicamente e mantidos em repouso no escuro por 20 minutos. Após este tempo, 200µL de cada tubo foi transferido para a placa de 96 poços e analisado em comprimento de onda de 515nm, no Espectrofotômetro Epoch. A atividade antioxidante (%) das amostras foi obtida pela fórmula $AA(\%) = \frac{ABS_{controle} - (ABS_{amostra} - ABS_{br\ amostra})}{ABS_{controle}} \times 100$, e comparada com três padrões de antioxidantes comuns, o BHT (butil-hidroxitolueno), o BHA (butil-hidroxianisol) e o ácido ascórbico (vitamina C) os quais estavam em concentração de 160µg/mL.

III. Resultados e Discussão

1. Caracterização Química

1.1. Composição Monossacarídica Neutra

A composição monossacarídica neutra foi determinada, primariamente, nas frações obtidas nas extrações aquosas sequenciais, segundo a Figura 1, a qual também está mostrando os rendimentos obtidos em cada extração.

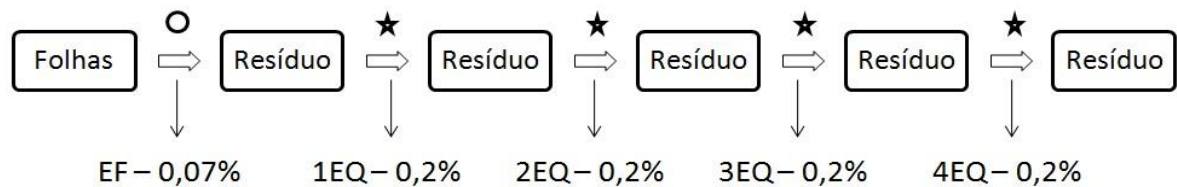


FIGURA 1 – FLUXOGRAMA E RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS ○ - EXTRAÇÃO À FRIO (T AMBIENTE); ★ - EXTRAÇÃO À QUENTE (80°C)

Conforme a Tabela 1, polissacarídeos das cinco amostras da primeira coleta apresentaram grande quantidade de arabinose e galactose (em média 47% de toda porção monossacarídica neutra), sugerindo a presença de arabinogalactana nas folhas do abacateiro. Comparando as metodologias de derivatização para análise em cromatografia gasosa, pode-se observar que os resultados do método de microensaio (ALBERSHEIM et al., 1967) são equivalentes aos apresentados pelo macroensaio (WOLFROM & THOMPSON, 1963; WOLFROM & THOMPSON, 1963), com a vantagem de necessitar de menos amostra, reagentes e tempo.

Com o objetivo de analisar a presença ou não de polissacarídeos nas frações decocto e infusão, as amostras DA e IAPol foram submetidas às análises da composição monossacarídica neutra e, os resultados estão representados também na Tabela 1. Observou-se para estas duas amostras a presença de arabinose como principal monossacarídeo, indicando a presença de arabinana como componente polissacarídico foliar do abacateiro. Esta diferença entre os resultados da primeira para a segunda coleta sugere que as arabinogalactanas não foram extraídas pelos métodos de decocção (5 minutos) e infusão (10 minutos) aplicados a segunda

coleta. Para as amostras da primeira extração, o tempo de extração foi de 4 horas, por outro lado para a segunda coleta, o tempo foi bem menor. Possivelmente o tempo de extração tenha influência na solubilidade das arabinogalactanas.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA NEUTRA DAS FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS

Fração	Derivatização (Método)	Monossacarídeo (% molar)							
		Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
EF	○	5	-	4	13	5	10	41	22
	□	4	1	5	15	6	8	40	21
1EQ	○	6	1	6	13	9	25	25	15
	□	5	-	10	22	14	9	25	15
2EQ	○	9	1	8	20	8	13	28	13
	□	5	2	15	30	12	8	15	13
3EQ	○	6	-	23	19	4	8	27	13
	□	5	-	18	23	6	8	29	11
4EQ	○	7	1	7	18	4	18	35	10
	□	4	-	13	25	5	7	37	9
IAPol	○	-	3	-	75	4	2	6	10
DA	○	-	1	-	78	4	2	10	5

○ Método de Wolfrom & Thompson; □ Método de Albersheim

1.2. Dosagens Colorimétricas

Foram realizadas dosagens colorimétricas para quantificar carboidratos totais, proteínas e ácidos urônicos e os resultados estão demonstrados na tabela 2. A quantidade de carboidratos totais variou pouco, variando de 27,43 a 39,67%, sendo que a 2ª extração quente (2EQ) obteve maior percentagem. A concentração de proteínas foi maior para a primeira extração, amostra EF (41,27%), diminuindo

gradativamente até a amostra 4EQ (8,28%), sugerindo que proteínas são mais extraídas nas primeiras extrações. Por outro lado, a dosagem de ácidos urônicos mostrou menor concentração (2,58%) para a primeira extração (EF), aumentando gradualmente até as últimas amostras (3EQ e 4EQ). Estes resultados, sugerem que os ácidos urônicos são melhores extraídos nas últimas extrações sequenciais.

TABELA 2 – PERCENTAGEM DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E ÁCIDOS URÔNICOS DAS AMOSTRAS POLISSACARÍDICAS

Amostra	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Ácidos Urônicos (%)
EF	27,62	41,272	2,58
1EQ	38,03	31,92	3,24
2EQ	39,67	14,85	7,75
3EQ	27,43	10,79	12,10
4EQ	32,46	8,28	11,22

1.3. Teste em Radiação Infra-Vermelho (IR)

Os espectros obtidos no teste IR estão demonstrados na Figura 2. Por comparação dos espectros das três amostras (EH, IA e DA) com espectros de lignina, foi possível estimar a presença destes compostos nas amostras. Segundo XU, 2006, e BOERIU, 2004, as ligninas, em geral, possuem bandas características de grupamentos hidroxilas, CH, aromáticos, carbonil/carboxil, anéis siringil e guaiacil. Foi observado nos espectros das amostras uma ampla banda em 3396cm^{-1} , característico do grupamento hidroxila (OH) em alcoóis e fenólicos; uma banda em 2930cm^{-1} , de grupamentos CH em compostos alifáticos ou aromáticos. As bandas em 1609 , 1520 e 1440 cm^{-1} também foram localizados nos espectros e, são peculiares de compostos aromáticos. Na amostra DA, uma banda 1323cm^{-1} pode indicar a presença de anel siringil. Por fim, foram encontradas algumas bandas características de carboidratos (1101 , 1082 e 1023 cm^{-1}), indicando a presença destes compostos nas amostras. A presença de lignina nas amostras pode ser mais bem elucidada através de uma maior separação, seguida de novas análises químicas. A separação pode ser realizada por várias extrações com diferentes

solventes e aumento gradual de polaridade. E a elucidação química pode ser feita por novas análises de IR, RMN C^{13} ou H^1 , ou cromatográficas.

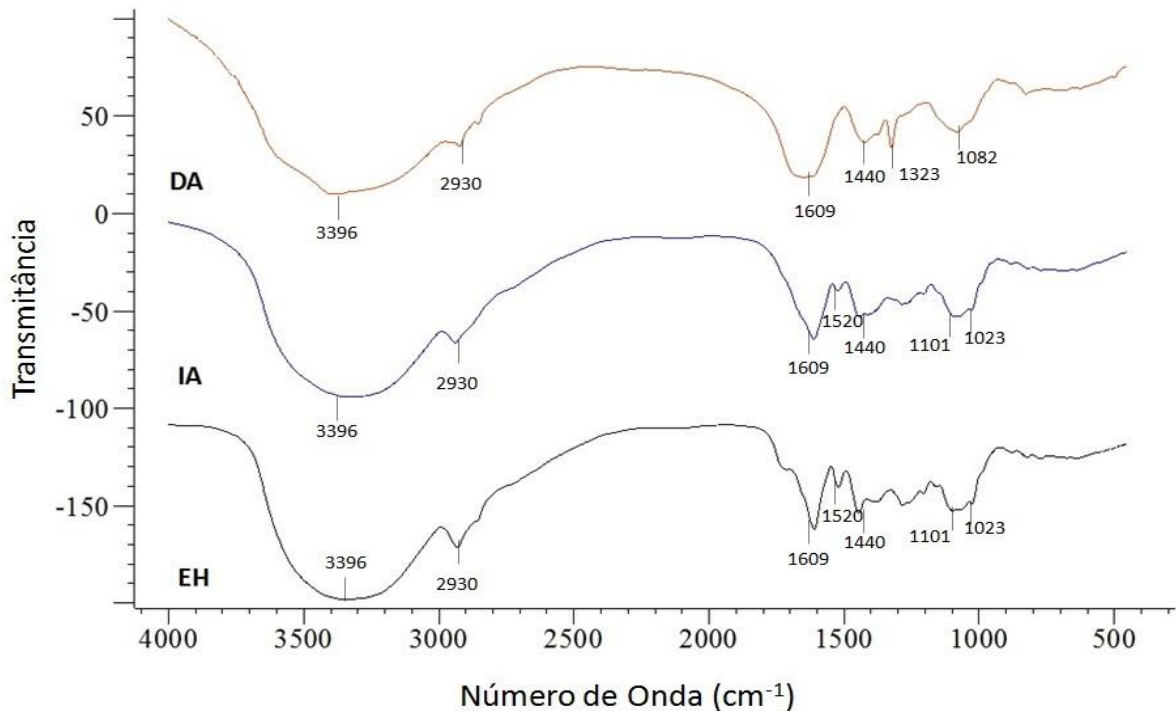


FIGURA 2 – ESPECTRO DO INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DA, IA E EH

1.4. Análise dos Metabólitos Secundários

Para as análises químicas de metabólitos secundários e atividade antioxidante dos extratos, foram feitas extrações das folhas (umidade - 65,5%) conforme o fluxograma mostrado na figura 3. Os rendimentos das frações obtidas (EH, IA e DA) foram calculados e estão na tabela 3. Comparando o extrato hidroalcoólico (EH) e a infusão aquosa (IA), foi possível observar uma equivalência com relação à eficácia da extração, baseando-se no rendimento. O rendimento da amostra EH fora levemente maior que o da IA, 12,1% e 11% respectivamente. Já para a fração polissacarídica DA, o rendimento ficou em torno de 1%.

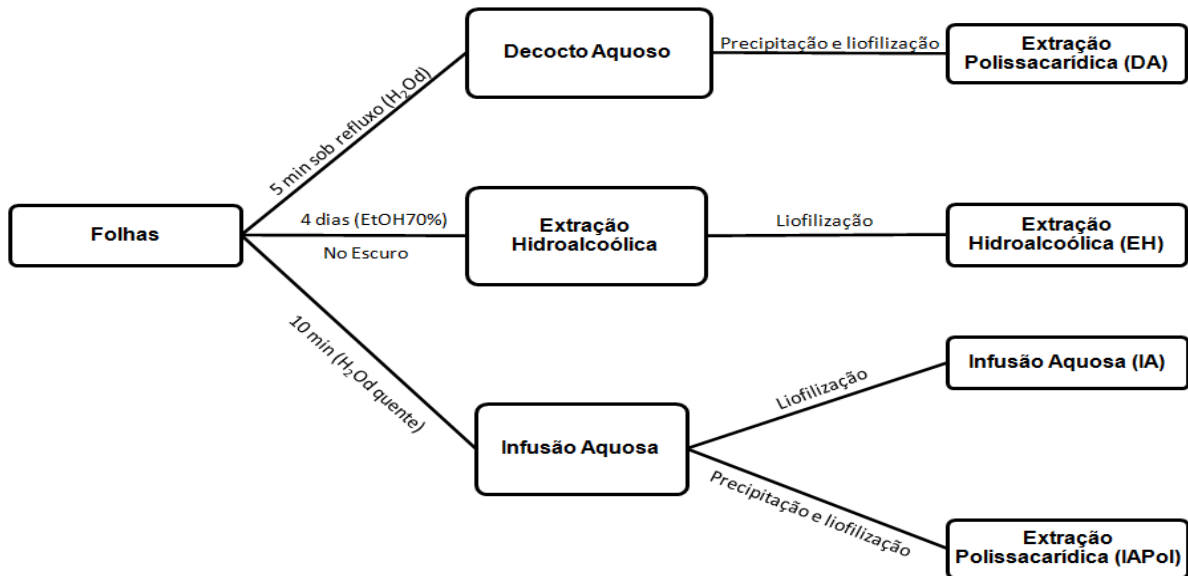


FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DA, EH, IA E IAPol

1.4.1. Dosagem de Fenólicos Totais

Foi realizada a dosagem de grupos fenólicos totais para as amostras EH, IA e DA e, as percentagens estão mostradas na tabela 3. É possível observar que a amostra (EH) mostrou maior concentração de compostos fenólicos 9,5%, quando comparado com a amostra (IA) que obteve 6,6%. Sugerindo que a extração hidroalcoólica seja mais eficiente na retirada destes compostos. Já para o extrato polissacarídico, a percentagem de fenólicos totais foi próxima a zero.

TABELA 3 – RENDIMENTO E PERCENTAGEM DE GRUPAMENTOS FENÓLICOS TOTAIS

Amostra	Rendimento (%)	Fenólicos Totais (%)
EH – Extração Hidroalcoólica	12,1	9,5
IA – Infusão Aquosa	11	6,6
DA – Decocto Aquoso	1	0,2

1.4.2. Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

A tabela 4 mostra os tempos de retenção dos padrões e das amostras obtidas da TLC demonstrada na figura 4. Por comparação dos RFs, foi constatado que a amostra EH possui metabólitos que se comportam, sob as condições do teste, semelhantemente ao ácido clorogênico, enquanto que a infusão aquosa (IA), ao ácido clorogênico e vanílico. Já para as extrações polissacarídicas (DA e EF), os tempos de retenção foram zero, ou seja, não foi identificado nenhum composto que se comporte como um dos sete padrões. O RF do ácido vanílico é muito próximo ao RF do ácido sirínico, então para uma melhor elucidação dos metabólitos secundários das amostras, é aconselhável promover um novo teste em cromatográfica de camada delgada (TLC) utilizando uma fase móvel diferente. Esta nova fase móvel deve separar melhor os dois ácidos, possibilitando uma caracterização mais específica e correta das amostras.

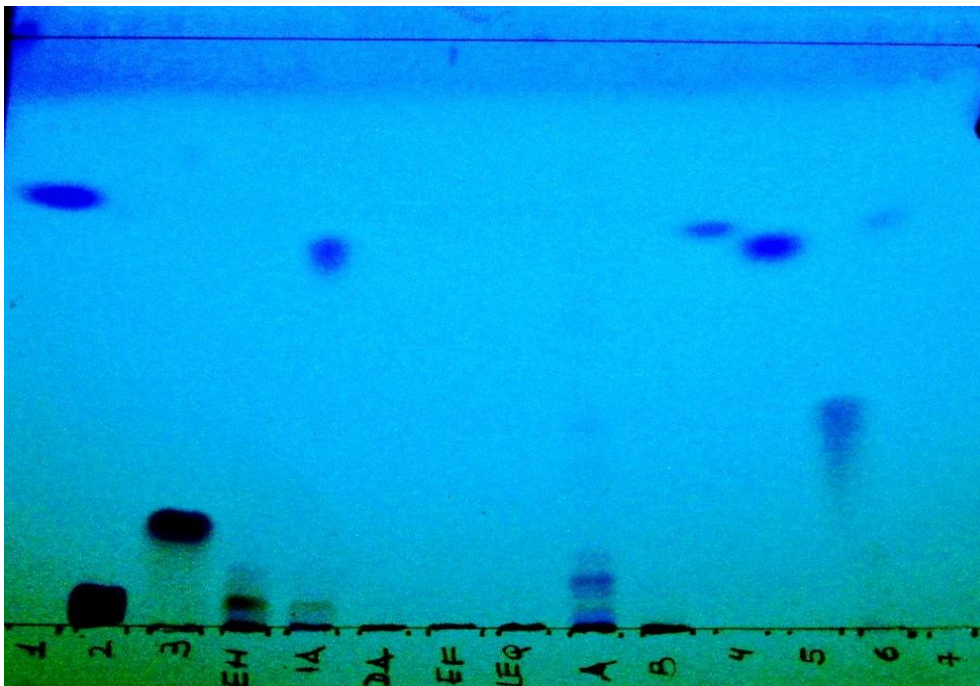


FIGURA 4 – VISUALIZAÇÃO SOB UV DA TLC DAS AMOSTRAS EH, IA, DA E PADRÕES 1, 2, 3, 4, 5, 6 E 7

TABELA 4 – TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AMOSTRAS DAS FOLHAS DE ABACATE

		Tempo de Retenção (RF)
PADRÃO	1 – Ácido Cinâmico	0,73
	2 – Ácido Clorogênico	0,05
	3 – Ácido Gálico	0,18
	4 – Ácido Siríngico	0,67
	5 – Ácido Vanílico	0,65
	6 – Ácido Cafêico	0,33
	7 – Ácido Ferúlico	0,7
AMOSTRA	EH – Extração Hidroalcoólica	0,03 e 0,08
	IA – Infusão Aquosa	0,03 e 0,62
	DA – Decocto Aquoso	0
	EF – Extração Aquosa Fria	0
	1EQ – 1ª Extração Aquosa Quente	0

2. Avaliação da Atividade Antioxidante

As percentagens de atividade antioxidante dos padrões (BHA, BHT e ácido ascórbico), para o teste em DPPH, estão representadas na tabela 5. Dentre os padrões, pode-se observar que o BHA e o BHT tiveram uma atividade antioxidante (%) levemente superior ao à atividade do ácido ascórbico (vitamina C). A absorbância controle (branco do método) foi de 1,195.

TABELA 5 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES BHA, BHT E ÁCIDO ASCÓRBICO (%)

Padrão	Atividade Antioxidante (%)
BHA	92,72
BHT	91,69
Ácido Ascórbico	83,77

O extrato hidroalcoólico (EH) apresentou uma atividade antioxidante dependente de dose, em que a alíquota de concentração 640µg/mL demonstrou um

efeito superior aos dos padrões a 160µg/mL. As percentagens foram calculadas e comparadas com os padrões na forma de um gráfico de barras (figura 5).

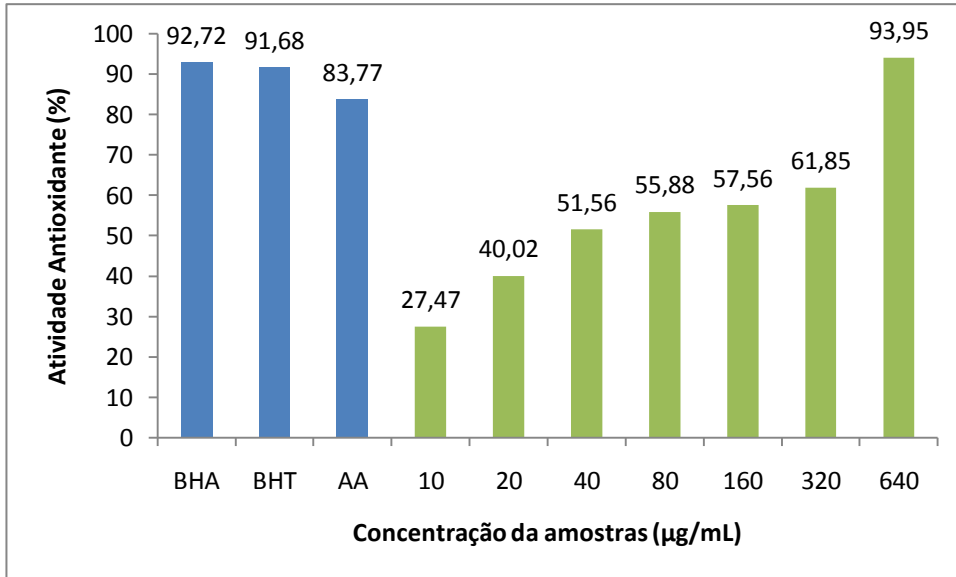


FIGURA 5 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO EH

Para a amostra IA, foi observado um aumento da atividade antioxidante de acordo com o aumento da dose testada. As percentagens calculadas variaram de 16,51% a 52,90% e, comparadas com os padrões (BHA, BHT e ácido ascórbico), como demonstrado na figura 6.

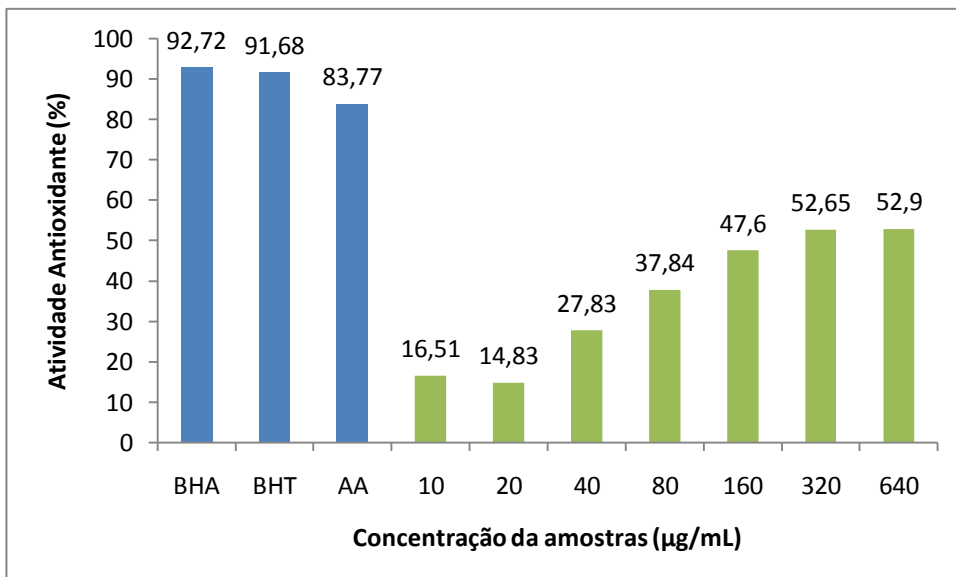


FIGURA 6 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO IA

A amostra DA, em geral, demonstrou a menor atividade antioxidante das três amostras. Como observado nas outras amostras, a atividade em DA se mostrou dependente da concentração do extrato. A representação gráfica, comparando DA com os três padrões de antioxidantes, estão mostrados na figura 7. Esta atividade antioxidante da fração DA pode ser relativo à ação de outros compostos, que não fenólicos, uma vez que o teor de fenólicos neste extrato é mínimo.

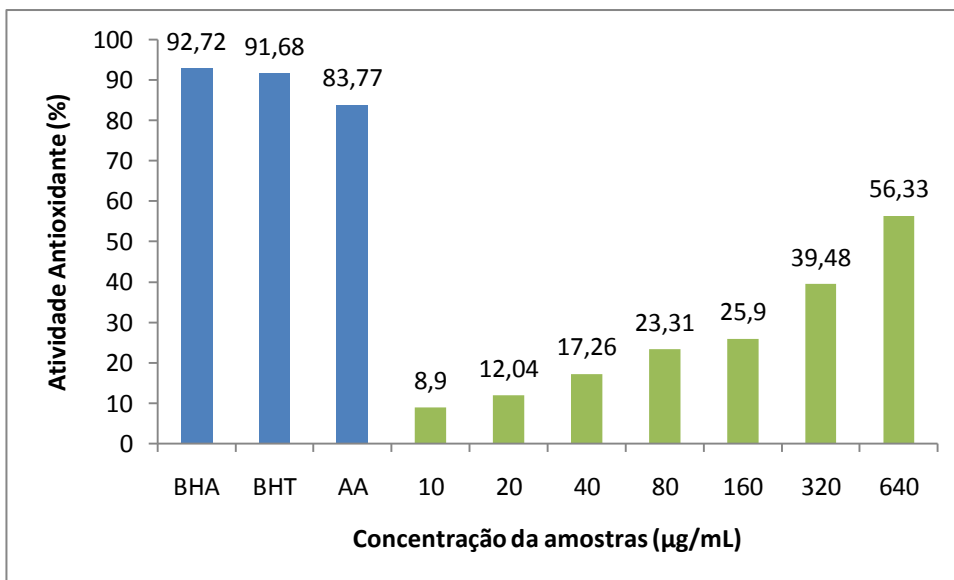


FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DA

Comparando a atividade antioxidante dos três extratos testados, verifica-se que o extrato hidroalcoólico demonstrou o maior potencial, possivelmente por apresentar maior concentração de compostos fenólicos. Estes resultados corroboram com os obtidos por McDONALD, e colaboradores, 2001, em que observaram a relação da atividade antioxidante com o conteúdo de compostos fenólicos em extratos de oliva. Na mesma linha de experimentos, DOSS e colaboradores, confirmaram que a atividade antioxidante é devido à presença de compostos fenólicos em sementes de *Canavalia gladiata* e *C. ensiformis*. Por outro lado, a concentração de fenólicos totais obtidas foi bem maior que a obtida por ASAOLU, 2010 e, curiosamente, a atividade antioxidante foi menor, sugerindo a presença de compostos antioxidantes não fenólicos nas folhas de *Persea americana*.

IV. Conclusões

- ✓ As folhas do abacateiro possuem principalmente arabinogalactana e arabinana como polissacarídeos foliar de *Persea americana*.
- ✓ As folhas do abacateiro possuem compostos secundários semelhantes ao ácido clorogênico e ao ácido vanílico, e que os extratos polissacarídicos não possuem estes metabólitos.
- ✓ O teor de fenólicos totais se mostrou maior na extração hidroalcoólica (9,47%), intermediária na infusão aquosa (6,57%), e menor na fração polissacarídica (0,23%).
- ✓ O extrato hidroalcoólico demonstrou o maior potencial antioxidante entre as amostras testadas, possivelmente pela também maior concentração de fenólicos totais.
- ✓ O extrato polissacarídico apresentou uma menor, mas relevante, atividade antioxidante. Possivelmente relacionado aos compostos não fenólicos.
- ✓ Comparando as metodologias de derivatização para análise em cromatografia gasosa, pode-se observar que o método de microensaio (ALBERSHEIM et al., 1967) demonstrou ser tão eficiente quanto o macroensaio (WOLFROM & THOMPSON, 1963; WOLFROM & THOMPSON, 1963), com a vantagem de necessitar de menos amostra, reagentes e tempo.

V. Referências Bibliográficas

Adeboye, J. O.; Fajonyomi, M. O.; Makinde, J. M.; Taiwo O. B. **A preliminary study on the hypotensive activity of *Persea americana* leaf extracts in anaesthetized normotensive rats.**, Fitoterapia, v.70, p.15-20, 1999.

Adeyemi O. O.; Okpo S. O.; Ogunti O. O. **Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extracts of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae).** Fitoterapia, v.73, p.375-380, 2002.

Alonso, J. **Tratado de fitofármacos y nutracéuticos.** Rosário, Argentina. Editora Corpus. p.69-72, 2004.

Albersheim, P.; Nevins, D.J.; English, P.D.; Karr, A. **A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography.** Carbohydrate Research, v.5, p.340-345, 1967.

Asaolu, M. F.; Asaolu, S. S.; Fakunle, J. B.; Emman-Okon, B. O.; Ajayi, E. O.; Togun, R. A. **Evaluation of *in-vitro* antioxidant activities of methanol extracts of *Persea americana* and *Cnidosculus aconitifolius*.** Pakistan Journal of Nutrition, v.9, n.11, p.1074-1077, 2010.

Aspinall, G.O. **The Polysaccharides. Volume 2.** Florida, Estados Unidos. Academic Press, INC, p.412, 1982.

Boeriu, C.G.; Bravo, D.; Gosselink, R.J.A.; van Dam, J.E.G. **Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy.** Industrial Crops and Products, v.20, p.205-218, 2004.

Bradford, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.

Brai, Bartholomew I.C.; Odetola A.A.; Agomo P.U. **Hypoglycemic and hypocholesterolemic potential of *Persea americana* leaf extracts.** Journal of Medicinal Food, v.10, p.356-360, 2007.

Carpita, N.C. **Structure and biogenesis of the cell walls of grasses.** Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology, v.47, p.445, 1996.

Carneiro, E.B.B. **Polissacarídeos ácidos de *Chorisia speciosa* St. Hil. (Bommbacaceae).** Tese de Doutorado em Bioquímica. Curitiba, Paraná. Universidade Federal do Paraná, p.2-45, 2000.

De Almeida A.P.; Costa S.S.; Miranda M.M.F.S.; Simoni I.C.; Wigg M.D.; Lagrota M.H.C. **Flavonol monoglycosides from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion.** *Phytotherapy Research*, v.12, p.562-567, 1998.

Dajoz, R. **Princípios de Ecologia. 7ª edição.** Porto Alegre, RS. Editora Artmed, p.398, 2005.

Di Stasi, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo, SP. Editora UNESP, 1996.

Doss, A.; Pugalenth, M.; Rajendrakumaran, D.; Vadivel, V. **Phenol, flavonoids and antioxidant activity of under-utilized legume seeds.** *Asian Journal of Experimental Biologic Science*, v.1, p.700-705.

Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. **Colorimetric method for determination of sugar and related substances.** *Analytical Biochemistry*, v.28, p.350-356, 1956.

Filizetti-Cozzi, T. M. C. C.; Carpita, N. C. **Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars.** *Analytical Biochemistry*, v.197, p.157-160, 1991.

Lameira, O. A.; Pereira Pinto, J.E.B. **Plantas Medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular.** Belém, PA. Editora Embrapa Amazônia Oriental, p.21-24, 2008.

Leite, J. J. G.; Brito, É. H. S.; Cordeiro R. A.; Brilhante, R. S. M.; Sidrim, J. J. C.; Bertini, L. M.; Morais, S. M.; Rocha, M. F. G. **Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, n.2, p.110-113, 2009.

Lorenzi, H.; Abreu Matos, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas, 2ª edição.** Nova Odessa, SP. Editora Instituto de Estudos da Flora, p.342-343, 2008.

McDonald, S., Prenzler, P.D.; Antolovich, M.; Robard, K. **Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts.** *Food Chemistry*, v.73, p.73-84, 2001.

Morais, S. A. L.; Aquino, F. J. T.; Nascimento, P. M.; Nascimento, E. A.; Chang, R. **Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra.** *Química Nova*, v.32, p.327-331, 2009.

Oberlies, N.H.; McLaughlin J.L.; Rogers, L.L.; Martin, J.M. **Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea Americana***. Journal of Natural Products, v.61, p.781-785, 1998.

Ojewole, J.A.O.; Amabeoku, G.J. **Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) leaf aqueous extract in mice**. Phytotherapy Research, v.20, p.696-700, 2006.

Owolabi, M.A.; Jaja, S.I.; Coker, H.A.B. **Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta**. Fitoterapia, v.76, p.567-573, 2005.

Pérez, J.D.L.S.; Lara, M.G.J.; Garciglia, R.S.; Meza, J.E.L. **Root extracts from Mexican avocado (*Persea Americana* var. *drymifolia*) inhibit the mycelial growth of the oomycete *Phytophthora cinnamomi***. European Journal of Plant Pathology, v.124, p.595-601, 2009.

Raven, Peter H.; Evert, Ray F.; Eichhorn, Susan E. **Biologia Vegetal - 7ª Edição**. Rio de Janeiro, RJ. Editora Guanabara Koogan, p.30, 2007.

Santos C.A.; Torres, K.R.; Leonart R. **Plantas Mediciniais: Herbariumm flora et scientia**. São Paulo, SP. Editora Ícone (São Paulo) – Scientia et Labor (Curitiba), p.17, 1988.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **FARMACOGNOSIA da planta ao medicamento. 6ª Edição**. Porto Alegre, RS. Editora da UFRGS; Florianópolis, SC. Editora da UFSC, p.519-556; 577-614, 2007.

Souza, V.C.; Lorenzi H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP. Editora Intituto Plantarum, p.74-75, 2005.

Suzuki, M.; Iwashiro, M.; Takatsuki, F.; Kuribayashi, K.; and Hamuro, J. **Reconstitution of anti-tumor effects of lentinan in nude mice: roles of delayed-type hypersensitivity reaction triggered by C134-positive T cell clone in the Infiltration of effector cells into tumor**. Cancer Science, v.85, p.409-417, 1994.

Taiz, L.; Zeiger, E.; **Fisiologia Vegetal - 4ª Edição**. Porto Alegre – RS. Editora Artmed, p.345-372, 2009.

Wang, W.; Gu, L.; Bostic, T. R. **Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars**. Food Chemistry, v.122, p.1193-1198, 2010.

Wilkie, K.C.B. **The hemicelluloses of grasses and cereals.** Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, v.36, p.215-264, 1979.

Winkelhausen, E.; Kuzmanova, S. **Microbial conversion of D-xylose to xylitol.** Journal of Fermentation and Bioengineering. v.86, p.1-14, 1998.

Wolfson, M.L. & Thompson, A. **Methods Carbohydrate Chemistry.** v.2, p.65-68, 1963.

Wolfson M.L. & Thompson, A. **Methods Carbohydrate Chemistry.** v.2, p.211, 1963.

Xu, F.; Sun, J.X.; Sun, R.C.; Fowler, P.; Baird, M.S. **Comparative study of organosolv lignins from wheat straw.** Industrial Crops and Products, v.23, p.180-193, 2006.