



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CHRISTEAN SANTOS DE OLIVEIRA

**Atividade antioxidante e caracterização do perfil metabolômico
da casca, semente e polpa das variedades Margarida, Breda e
Geada do abacate (*Persea americana*)**

São Cristóvão / SE

2019

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Oliveira, Christean Santos de

O 48a Atividade antioxidante e caracterização do perfil
metabolômico da casca, semente e polpa das variedades
Margarida, Breda e Geada do abacate (*Persea americana*);
orientador Narendra Narain. – São Cristóvão, SE, 2019.
84 f.

Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

O

1. Abacateiro. 2. Fenóis. 3. Compostos bioativos. 4. Análise
cromatográfica. 5. Espectrometria de massa. I. Narain, Narendra,
orient. II. Título.

CDU: 664.8.03:634.653



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CHRISTEAN SANTOS DE OLIVEIRA

**Atividade antioxidante e caracterização do perfil metabolômico
da casca, semente e polpa das variedades Margarida, Breda e
Geada do abacate (*Persea americana*)**

Dissertação apresentado ao Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciência
e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Narendra Narain

São Cristóvão / SE

2019

CHRISTEAN SANTOS DE OLIVEIRA

**Atividade antioxidante e caracterização do perfil metabolômico da casca,
semente e polpa das variedades Margarida, Breda e Geada do abacate
(*Persea americana*)**

Dissertação de mestrado aprovada no Programa
de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos em 25 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Narendra Narain

Orientador/PROCTA - UFS

Prof^a. Dr^a. Alessandra Almeida Castro Pagani

1º Examinador/ PROCTA - UFS

Prof^a. Dr^a. Maria Terezinha Santos Leite Neta

2º Examinador/LAF-UFS

São Cristóvão – SE

2019

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Deus por ter me dado forças e saúde para poder concluir mais essa etapa da minha vida.

Agradeço aos meus pais, familiares e amigos pelo apoio e ajuda durante esse período. Obrigado professor Narendra, meu orientador, por ter me ajudado e incentivado a ingressar nessa fase de estudo que proporcionou vivenciar essa experiência importante na minha vida profissional onde consegui aprofundar meus conhecimentos assim como aprender e adquirir novas habilidades. Gostaria de agradecer ao CNPQ pelo apoio financeiro ao projeto e ao programa de mestrado da UFS.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, quero agradecer à Tamna, Taís e Juliana por ter separado um pouco do tempo de vocês para me ajudar nessa fase final do meu mestrado.

“Gerar, disseminar, preservar o conhecimento e trabalhar com outras pessoas para aplicá-los aos maiores desafios do mundo. ”

(Steve Rogers)

OLIVEIRA, C. S. **Atividade antioxidante e caracterização do perfil metabolômico da casca, semente e polpa das variedades Margarida, Breda e Geada do abacate (*Persea americana*)** [Defesa]. São Cristóvão: Programa de Pós-graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, 2019.

RESUMO

O abacate (*Persea americana*) pertencente à família *Lauraceae* é considerado uma fruta muito importante e de grande relevância comercial no mundo, devido ao seu alto conteúdo nutricional e os efeitos benéficos à saúde, sendo relacionados principalmente à fonte de nutrientes solúveis em lipídios ou fitoquímicos, possuindo um mercado consumidor mundial bastante expressivo e que chama atenção pela sua relevância econômica bastante expressiva na maioria dos estados brasileiros. Possuindo mais de 50 espécies conhecidas, o abacate tem como principais variedades brasileiras Quintal, Fortuna, Geada, Margarida e Breda. Vários estudos evidenciaram a associação inversa entre o consumo de alimentos vegetais e a prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas, dessa forma, o presente trabalho propõe traçar o perfil metabolômico do abacate, expondo a presença de compostos bioativos em sua polpa, semente e casca através de determinações clássicas de atividade antioxidante e teor de fenólicos totais onde foi constatado que os maiores valores de fenólicos encontram-se nas sementes, sendo o maior deles (83,38mg GAE/g) na variedade Margarida e flavonoides totais com valores mais baixos sendo 6,90mg QE/g o maior valor encontrado que está presente na casca da variedade Geada. Com a caracterização físico-química pôde-se observar que os maiores teores de umidade se encontram na polpa (valores em torno de 83,29%) com exceção da variedade Margarida que a semente apresentou umidade (60%) maior que a polpa (36,31%) e a casca (34,68%). O teor de sólidos solúveis com valores em torno de 9°Brix mostra o estado de maturação ótimo para colheita. O maior teor de lipídio (11,43%) foi encontrado na polpa da variedade Breda. A identificação e quantificação dos compostos bioativos através de técnicas modernas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à técnica de espectrometria de massas (LC-MS) apresentou compostos como ácido clorogênico (2,61mg/mL), catequina (1,92mg/mL) na variedade Geada e ácido succínico (2,31mg/mL) na Margarida em concentrações razoáveis despertando o interesse pelas propriedades desses compostos.

Palavras-chave: Fenólicos. Bioativos. Abacate. Cromatografia. Espectrometria.

OLIVEIRA, C. S. **Antioxidant activity and characterization of the metabolic profile of the bark, seed and pulp of Margarida, Breda and Geada varieties of avocado (*Persea americana*)** [Defense]. São Cristóvão: Programa de Pós-graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, 2019.

ABSTRACT

Avocado (*Persea americana*) belonging to the Lauraceae family is considered a very important fruit of great commercial importance in the world, due to its high nutritional content and beneficial health effects, being mainly related to the source of nutrients soluble in lipids or phytochemicals, possessing a very expressive world-wide consumer market and that calls attention for its economic relevance quite expressive in most of the Brazilian states. Possessing more than 50 known species, avocado has as main Brazilian varieties Quintal, Fortuna, Geada, Margarida and Breda. Several studies have demonstrated the inverse association between the consumption of plant foods and the prevalence of chronic noncommunicable diseases, such as cancer, diabetes, cardiovascular diseases and degenerative diseases. In this way, the present work proposes to outline the metabolic profile of avocado, exposing the presence of bioactive compounds in their pulp, seed and bark through classical determinations of antioxidant activity and total phenolic content where it was found that the highest phenolic values are found in the seeds, being the largest of them (83,38mg GAE/g)) in the Margarida variety and total flavonoids with lower values being 6.90mg QE/g the highest value found that is present in the bark of the Geada variety. With the physico-chemical characterization, it was observed that the highest moisture contents were found in the pulp (values around 83,29%), with the exception of the Margarida variety, that the seed had moisture (60%) higher than the pulp (36,31%) and bark (34,68%). The soluble solids content with values around 9°Brix shows the optimal maturation stage for harvesting. The highest lipid content (11,43%) was found in the pulp of the Breda variety. The identification and quantification of bioactive compounds using modern techniques such as high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) showed compounds such as chlorogenic acid (2,61 mg/mL), catechin (1,92 mg/mL) in the Geada variety and succinic acid (2,31 mg/mL) in Margarida at reasonable concentrations arousing interest in the properties of these compounds.

Keywords: Phenolics. Bioactive. Avocado. Chromatography. Spectrometry.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ranking brasileiro de produção de abacate em 2017 (Toneladas).	17
Figura 2 - Principais variedades do abacate (<i>Lauraceae persea americana</i>) no Brasil.	18
Figura 3 - Sazonalidade das principais variedades de abacate no Brasil.	19
Figura 6 - Estrutura genérica de compostos da classe de flavonoides.	25
Figura 7 - Classificação geral dos compostos bioativos.....	26
Figura 8 - Estruturas químicas de algumas classes de compostos fenólicos.	27
Figura 4 - Representação do funcionamento de um espectrômetro de massas.	29
Figura 5 - Representação do funcionamento de um quadrupolo de espectrômetro de massas.	30
Figura 9 - Estruturas químicas dos padrões orgânicos utilizados.....	39
Figura 10 - Resultados para o teor de fenólicos, flavonoides totais, carotenoides e clorofila em polpa casca e semente de diferentes variedades de abacates.	51
Figura 11 - Resultados para a capacidade antioxidante em polpa casca e semente de diferentes variedades de abacates.	55
Figura 12 - Espectro de massas no modo SIM da variedade Geada.	62
Figura 13 - Espectro de massas no modo SIM da variedade Margarida.	63
Figura 14 - Espectro de massas no modo SIM da variedade Breda.	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antioxidante e conteúdo fenólico de diversas variedades de abacate	23
Tabela 2 - Eventos da eluição no modo gradiente utilizado para separação de compostos fenólicos através do sistema UPLC-MS.....	38
Tabela 3 - Teor de umidade das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.....	40
Tabela 4 - Teor de sólidos solúveis das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.	41
Tabela 5 - Potencial hidrogeniônico das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda...	42
Tabela 6 - Teor de acidez das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.	43
Tabela 7 - Atividade de água das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.....	43
Tabela 8 - Teor de lipídios das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.	44
Tabela 9 - Textura das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.	45
Tabela 10 - Análise de cor das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.....	46
Tabela 11 - Teor de fenólicos totais (FT) das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.....	48
Tabela 12 - Teor de flavonoides totais das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.	49
Tabela 13 - Teor de carotenóides totais das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.	50
Tabela 14 - Teor de clorofila total das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.....	50
Tabela 15 - Atividade antioxidante de extratos etanólicos das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda através do método ABTS•.	53
Tabela 16 - Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda através do método FRAP.....	53
Tabela 17 - Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda através do método do ORAC.	54
Tabela 18 - Parâmetros do MS, curvas de calibração e coeficientes de correlação dos padrões utilizados para identificação e quantificação.....	57
Tabela 19 - Compostos fenólicos da casca, polpa e semente de diferentes variedades de abacate.	59

ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH- Dicloreto de 2,2-Azobis (2-AmidinoPropano);

Abs – Absorbância;

ABTS^{•+} - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico;

ANOVA: Análise de variância;

AOAC – *Association of Official Methods of Analysis*;

CEASA - Central Estadual de Abastecimento;

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;

FeCl₃.6H₂O – Cloreto férrico hexahidratado;

FRAP - Capacidade de redução do íon férrico (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power*);

GAE - Equivalente de ácido gálico (do inglês, *gallic acid equivalent*);

HCl – Ácido clorídrico;

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa;

min – minutos;

mg/g – miligramas/grama;

mg/mL – miligramas/mililitros;

nm – nanômetros;

ORAC- Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (do inglês, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*);

pH - Potencial hidrogeniônico;

QE - Equivalente de quercetina;

rpm - rotação por minuto;

SIM – *Select Ion Monitoring*

TE - Equivalente de Trolox;

TPTZ – 2,4,6-tripylidyl-s-triazine

UFLC - *Ultra Fast Líquid Chromatography*;

p/v - peso por volume;

°C - grau Celsius;

μmol/g - micromol por grama;

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1.	Abacate (Persea americana).....	17
2.2.	Atividade antioxidante.....	21
2.3.	Compostos bioativos.....	24
2.3.1.	Compostos fenólicos.....	24
2.4.	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	28
3.	OBJETIVOS.....	31
3.1.	Objetivo geral	31
3.2.	Objetivos específicos	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1.	Padrões analíticos e reagentes.....	32
4.2.	Matéria prima.....	32
4.3.	Procedimento experimental	33
4.3.1.	Análises físico-químicas	33
4.3.2.	Preparo dos extratos alcoólicos.....	34
4.3.3.	Determinação do teor de flavonoides totais.....	35
4.3.4.	Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	35
4.3.5.	Teor de carotenóides totais e clorofila	35
4.3.6.	Determinação de atividade antioxidante	36
4.3.7.	Identificação e quantificação dos compostos por cromatografia líquida acoplado à espectrômetro de massas	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.4.	Caracterização físico-química das diferentes variedades do abacate	40
4.3.8.	Umidade	40
4.3.9.	Sólidos Solúveis.....	41

4.3.10.	Potencial Hidrogeniônico (pH)	42
4.3.11.	Acidez titulável	42
4.3.12.	Atividade de água.....	43
4.3.13.	Teor de Lipídios	44
4.3.14.	Avaliação da textura.....	44
4.3.15.	Análise colorimétrica	45
4.5.	Compostos bioativos.....	47
4.3.16.	Fenólicos totais	47
4.3.17.	Flavonoides totais	48
4.3.18.	Carotenoides e clorofila	49
4.6.	Atividade Antioxidante.....	51
4.3.19.	ABTS• (ácido 2,2-Azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfônico)	52
4.3.20.	FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	53
4.3.21.	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	54
4.7.	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por LC-MS	55
6.	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

O abacate (*Persea americana*) pertencente à família *Lauraceae* é considerado uma fruta importante e de grande relevância comercial no mundo, devido ao seu alto conteúdo nutricional e os efeitos benéficos à saúde, sendo relacionados principalmente à fonte de nutrientes solúveis em lipídios ou fitoquímicos (ARÁUJO et al., 2018).

O abacateiro é uma árvore bastante resistente que exige poucos cuidados, a produção de sua fruta pode chegar até 600 Kg por pé. O abacate é cultivado em quase todos os estados brasileiros, principalmente no estado de São Paulo, o qual é responsável pela maior parte da produção brasileira de abacate seguida por Minas Gerais, Paraná e demais estados (IBGE, 2019). O abacate é uma fruta bastante produtiva e possui uma grande variedade de espécies encontrada em diversas partes do território nacional e apresentam composição química muito variável para cada tipo de abacate e grande concentração de lipídios, ácidos graxos e compostos bioativos (TANGO et al., 1992).

A CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil), confirma que o Brasil é o terceiro produtor mundial de frutas (2017) com uma produção de 41.023.611 toneladas, atrás somente da China (1º) e da Índia (2º). No ranking nacional de produção de frutas o abacate fica em 12º lugar no consumo dos brasileiros.

Segundo o IBGE, no ano de 2017 foram produzidos mais de 93257 toneladas de abacate no Brasil onde sua maior parte pelo estado de São Paulo.

Um levantamento feito pelos CEASAs de Pernambuco e Ceará (2017) mostrou que as variedades Breda, Fortuna, Geada, Margarida e Quintal são as mais procuradas entre os consumidores tendo como ápice de consumo no período de abril a novembro e uma procura mais regular durante os meses restantes, onde essa diminuição no consumo não é devido à substituição por outras frutas, mas sim pela ausência do produto no mercado.

Vários estudos evidenciaram a associação inversa entre o consumo de alimentos vegetais e a prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas (STEAL et al., 2008; HEIDEMANN et al., 2008; NEVEU et al., 2010). Os benefícios estão relacionados à presença de compostos bioativos com atividade antioxidante, que são capazes de neutralizar os chamados radicais livres. Essas moléculas instáveis atacam uma célula humana em média 10 vezes ao dia (AGARWAL et al., 2008), causando danos em estruturas como membranas, ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos (VALKO et al., 2004; VALKO et al., 2007).

Os antioxidantes são produtos do metabolismo secundário das plantas e têm uma utilização muito grande na indústria farmacêutica e de cosméticos, e principalmente na

indústria alimentícia, servindo como aditivos naturais em alimentos, sendo esta de grande interesse atualmente, pois os antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria despertam grande preocupação por causa das doses utilizadas e sua toxicidade (BALASUNDRAM et al., 2006). Dentre as substâncias com propriedades antioxidantes, o grupo dos compostos fenólicos, que compreendem os flavonoides e os ácidos fenólicos, são os que mais se destacam e são considerados os antioxidantes mais comuns em fontes naturais, pois estão bem distribuídas no reino vegetal, e assim, são encontrados em todas as frutas e em alguns vegetais (KARAKAYA et al., 2004).

Normalmente as frutas são consumidas *in natura*, pois assim pode-se apreciar melhor suas características de sabor, odor, textura, cor e suas propriedades nutricionais. Entretanto, as frutas são altamente perecíveis. No intuito de aumentar a sua capacidade de consumo, grande parte delas são processadas, sendo transformadas em sucos, néctares, polpas, geleias e doces, além disso, o processamento ajuda no aumento da vida útil, facilita o transporte e agrega valor ao produto (BARRET et al., 2005).

Depois que as frutas são processadas, grandes quantidades de resíduos são geradas e que muitas vezes não possuem um destino específico. Dessa forma, é necessário um tratamento para descarte para que esses subprodutos não se tornem contaminantes ambientais, o que acaba gerando custos adicionais para as empresas. Em sua maioria, esses resíduos agroindustriais são cascas, sementes e sobras da polpa após o processamento.

Diversos trabalhos têm enfatizado a presença de compostos bioativos em polpa, assim como na semente e casca do abacate, incluindo fibras, vitaminas, minerais, carotenóides, além de complexos compostos polifenólicos como as proantocianidinas (Aráujo et al., 2018), sendo esses compostos extensivamente relatados na literatura com efeitos promotores a saúde humana.

Levando em consideração que existem diferentes variedades de abacate, as quais variam de formas, tamanhos, bem como os constituintes fitoquímicos e com base no levantamento realizado, não foi encontrado estudos que avaliassem a composição química e a atividade antioxidante em diferentes variedades de abacate (Margarida, Geada e Breda) nas variadas partes do fruto (casca, polpa e semente), o que instiga mais estudos, a fim de obter melhores alternativas no aproveitamento desses subprodutos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Abacate (*Persea americana*)

O abacateiro, *Persea americana*, pertence à família Lauraceae, que engloba cerca de 50 gêneros. O abacate comercial é composto basicamente por três grupos, sendo eles Mexicana (*Persea americana* var. *Drymifolia*); Antilhana (*P. americana* var. *Americana*) e Guatemalense (*P. nubigena* var. *Guatemalensis*) (DONADIO et al., 1995).

Dados coletado pela FAO mostra que em 2017 a produção mundial de abacate foi de 6.048.508t, no Brasil a produção chegou a 213.041t sendo esse valor 8,46% maior que o ano de 2016 chegando a estar em 4º lugar na produção mundial de abacate. Segundo dados do Anuário Brasileiro de Fruticultura (2017), a produção de abacate tem demonstrado resultados expressivos para o mercado de exportação com 4.950t, sendo esse valor 6,96% maior que o ano anterior, e assim, rendendo US\$6.807.126 para economia do Brasil. Com isso, ocupando o 10º lugar no ranking de exportação de frutas no Brasil, o que demonstra a ampliação dessa cultura no setor da fruticultura (Figura 1).

Figura 1 - Ranking brasileiro de produção de abacate em 2017 (Toneladas).



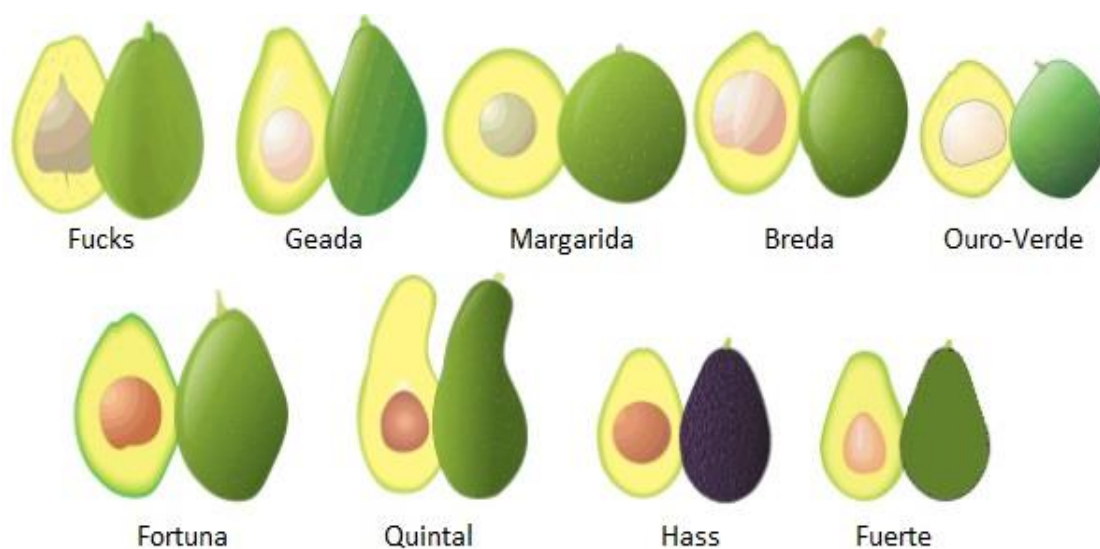
Fonte: IBGE (2019)

O abacate é uma das frutíferas que vem despertando grande interesse entre os produtores rurais e consumidores, além de apresentar importância econômica e social em quase todos os estados brasileiros (OLIVEIRA et al., 2003). Até 2017, o Brasil ocupava a quinta posição no ranking dos maiores produtores mundiais de abacate segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2017).

O abacateiro é uma árvore frutífera com plantios comerciais em grande número de países onde o clima varia desde temperado até subtropical e tropical. A produção brasileira de abacate está distribuída principalmente pelas regiões Sudeste, Sul e Nordeste. O cultivo na região Nordeste ainda ocupa pequenas áreas, e os estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco são os maiores produtores, sendo inferiores aos obtidos em São Paulo (AGRIANUAL et al., 2012).

Pesquisas realizadas na região nordeste por Correia et al. (2010), mostram que os principais cultivares (Figura 2) nos CEASAs de Pernambuco e Ceará são: Quintal, Fortuna, Geada e Margarida. Já em São Paulo, comercialmente são encontrados no CEAGESP as variedades Breda, Fortuna, Geada, Margarida e Quintal, de acordo com Almeida et al. (2015).

Figura 2 - Principais variedades do abacate (*Lauraceae persea americana*) no Brasil.

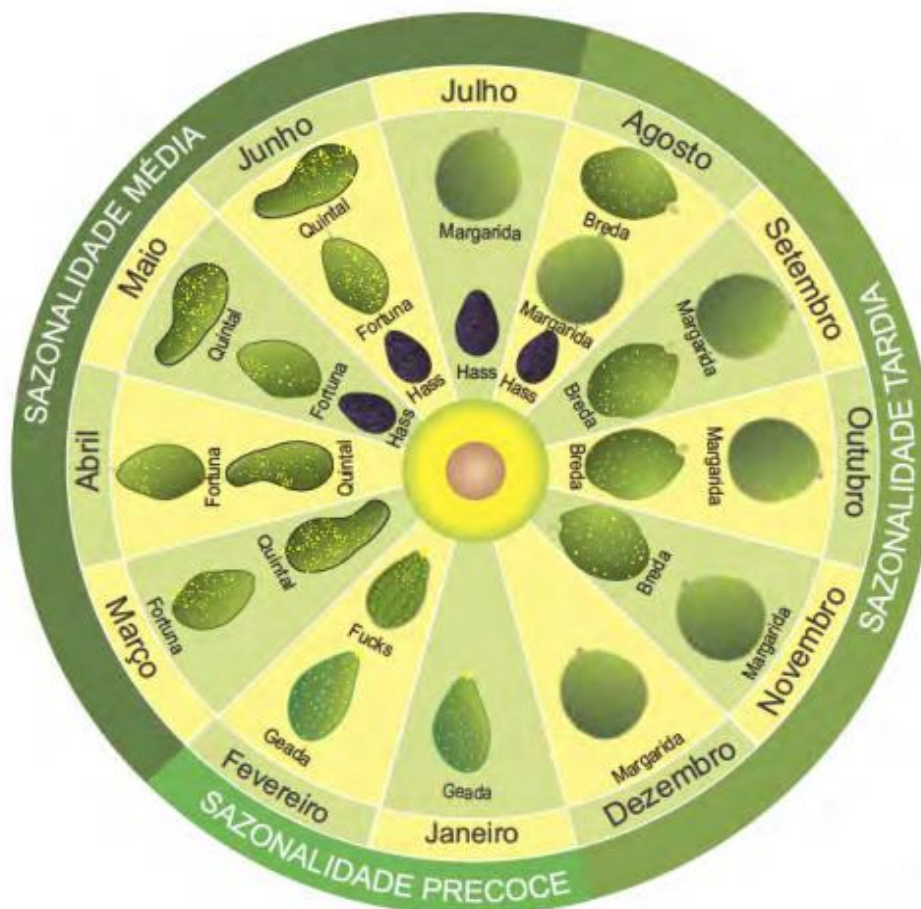


Fonte: Hortiescolha, 2017.

O abacate da variedade Geada também possui fruto piriforme, podendo ser ovalado, sem “pescoço”, com coloração verde mais claro que o Fortuna. Sua polpa é amarela, com a semente aderente, seu conteúdo de óleo é bastante baixo, por volta de 3,5% e a maturação

bastante precoce (TEIXEIRA et al., 1995; KOLLER et al., 2002). Essas características físicas e seu baixo teor de gordura faz com que a variedade Geada seja ideal para o preparo de cremes e sobremesas onde sua safra vai de novembro a fevereiro aproximadamente (Figura 3).

Figura 3- Sazonalidade das principais variedades de abacate no Brasil.



Fonte: Programa brasileiro para modernização da horticultura, 2016.

A cultivar Margarida apresenta as características da raça Guatemalense, como folhas novas com coloração arroxeada, frutos redondos e de casca rugosa, sua polpa é verde clara e o caroço é pequeno (KOLLER et al., 2002), sendo essa a variedade preferida dos compradores que fazem seu transporte por longas distâncias, por apresentar ótima resistência pós-colheita (BONELLA et al., 2013). Com teor médio de gordura, a variedade Margarida é ideal no preparo de saladas e sua safra dura em média de maio a novembro (Figura 3).

O abacate Breda é outro híbrido das raças Antilhana e Guatemalense; seus frutos são pequenos, pesam entre 150 e 250 g, possui casca verde clara, lisa, a polpa é amarela e o caroço aderente à polpa (TEIXEIRA et al., 1995; KOLLER et al., 2002; DONADIO et al., 2010). O formato da variedade Breda é arredondado, sem “pescoço” proeminente. O abacate Breda é uma das principais variedades tardias de abacate com produções que duram em média do final de agosto ao começo de janeiro (Figura 3).

Pesquisas têm demonstrado os melhores cultivares para a exploração racional numa região de produção, porque cada uma requer condições especiais de cultivo para a obtenção de características qualitativas desejáveis e de boa conservação no armazenamento, onde cada espécie de abacate se adapta melhor à determinada região e podendo assim haver uma variação na composição de bioativos de acordo com cada espécie (BRUNINI et al, 2002).

O abacate é largamente consumido *in natura*, no preparo de pratos típicos, produção de azeites, óleos essenciais, produção de frutas secas, fabricação de cosméticos entre outros e todos esses processos geram uma enorme quantidade de resíduos (casca, semente e restos de polpa), principalmente quando a escala é industrial, onde de 21% a 30% da fruta resulta nesses resíduos sólidos (LÓPEZ-COBO et al., 2016) o que representa danos significativos ao meio ambiente.

Os resíduos do abacate têm um grande potencial como fonte de compostos bioativos principalmente compostos fenólicos, possuindo capacidade antioxidante maior que frutas como a *blueberry* que é conhecida pelo seu alto poder antioxidante (AGNIESZKA et al., 2012; AYALA-ZAVALA et al., 2011; GÓMEZ et al., 2014; LÓPEZ-COBO et al., 2016). Estes resíduos são ricos em uma mistura complexa de compostos fenólicos como catequina, ácido clorogênico, ácido succínico entre outros (SOONG & BARLOW, 2004). Outros estudos mostram que os resíduos do abacate contêm compostos fenólicos como quercetina, glicosídeos, dímeros de procianidina do tipo A e do tipo B, trímeros de procianidinas do tipo A, catequina, ácido cafeoilquínico, ácido cumaroilquínico (AGNIESZKA et al., 2012; LÓPEZ-COBO et al., 2016).

Extratos de resíduos de abacate têm sido usados na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças. Atualmente, sabe-se que os extratos do resíduo do abacate possuem propriedades muito interessantes com grande potencial de aplicações apresentando atividade antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, larvicida, antiprotzoária, antidiabética, anti-hipertensiva assim como inibição de oxidação lipídica e proteica (Dabas et al., 2013; JIMÉNEZ-ARELLANES et al., 2013; LEITE et al., 2009; YASIR, DAS, & KHARYA, 2010). Existem estudos que reportam atividade anticancerígena em extratos de

resíduos de abacate para diversos tipos de câncer como de mama, pele e leucemia (LEE, YU, LEE, & LEE, 2008), além dos efeitos anti-inflamatórios mostrados por Adeyemi, Okpo, & Ogunti, (2002).

2.2. Atividade antioxidante

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais livres (ADEGOKE et al., 1998). Oxidantes são compostos produzidos pelo metabolismo normal do corpo e, se não controlados, podem provocar danos extensivos. O estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas, doenças degenerativas como Alzheimer, bem como está envolvido no processo de envelhecimento (McCORD et al., 1994; CHRISTEN et al., 2000). O balanço entre o estresse oxidativo e as funções antioxidantes dos organismos vivos parece ter um papel na carcinogênese (SHAHIDI et al., 1996). Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos (WETTASINGHE et al., 2002).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e suas estruturas químicas. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES et al., 2002). Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOARES et al., 2002; CHUN et al., 2005).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura, que absorve a 515 nm (ROGINSKY et al., 2005). Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente

no meio reacional (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). A porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente, também chamada de concentração inibitória. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua concentração eficiente e maior a sua atividade antioxidante (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998).

Outro método bastante utilizado para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Pulido et al. (2000) descreveram o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas.

Na tabela 1 estão relacionadas algumas variedades de abacate e seus respectivos conteúdos fenólicos e as atividades antioxidantes determinadas através das metodologias de ORAC e DPPH. Onde diferentes autores fizeram análises das sementes, polpas e cascas desse fruto e nota-se uma boa diferença de resultados que depende de cada variedade.

Tabela 1 - Atividade antioxidante e conteúdo fenólico de diversas variedades de abacate

	Teor de fenólicos totais (mg GAE g-1)	ORAC (μmol TE g-1)	DPPH (μmol TE g-1)	Referências
Semente				
Slimcado	19.2	229.0	128.3	(Wang et al., 2010)
Simmonds	40.2	459.3	240.2	(Wang et al., 2010)
Loretta	31.5	229.0	159.7	(Wang et al., 2010)
Choquette	33.4	348.9	157.8	(Wang et al., 2010)
Booth 7	33.4	319.8	188.1	(Vinha et al., 2013)
Booth 8	35.7	368.7	207.3	(Daiuto et al., 2014)
Tonnage	33.1	464.4	162.9	(Gómez et al., 2014)
Hass	51.6	428.8	164.6	(Calderón-Oliver et al., 2016)
Shepared	13.0	350.0	—	(Agnieszka et al., 2012)
Fuerte	69.1	—	167500	(Rodríguez-Carpena et al., 2011)
Polpa				
Slimcado	1.0	4.7	1.3	(Wang et al., 2010)
Simmonds	0.6	4.1	0.7	(Wang et al., 2010)
Loretta	1.0	3.9	0.4	(Wang et al., 2010)
Choquette	0.6	2.6	0.4	(Wang et al., 2010)
Booth 7	1.3	4.4	1.1	(Vinha et al., 2013)
Booth 8	1.2	5.1	0.6	(Daiuto et al., 2014)
Tonnage	0.8	5.6	1.0	(Gómez et al., 2014)
Hass	4.9	11.6	1.3	(Calderón-Oliver et al., 2016)
Shepared	1.2	5.0	1.4	(Agnieszka et al., 2012)
Fuerte	0.9	4.6	0.6	(Rodríguez-Carpena et al., 2011)
Casca				
Slimcado	4.6	58.2	39.7	(Wang et al., 2010)
Simmonds	7.4	226.8	84.9	(Wang et al., 2010)
Loretta	7.6	92.3	38	(Wang et al., 2010)
Choquette	13.9	174.8	90.8	(Wang et al., 2010)
Booth 7	13.2	164.9	80	(Vinha et al., 2013)
Booth 8	8.1	110.5	52.6	(Daiuto et al., 2014)
Tonnage	4.3	187.6	51.9	(Gómez et al., 2014)
Hass	12.6	631.4	189.8	(Calderón-Oliver et al., 2016)
Shepared	15.6	290.0	—	(Agnieszka et al., 2012)
Fuerte	172.2	—	199610	(Rodríguez-Carpena et al., 2011)

2.3. Compostos bioativos

Os compostos bioativos são reconhecidos por suas propriedades benéficas à saúde humana. Inúmeros estudos têm sugerido que dietas ricas em vegetais e frutas podem reduzir os riscos de incidência de muitas doenças crônicas como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (SVILAAS et al., 2004). Eles ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos e são considerados como ingredientes não nutricionais, mas vitais para a manutenção da saúde humana (PATIL et al., 2009).

Os polifenóis são os principais bioativos presentes nas frutas em geral que têm potencial de trazer benefícios à saúde (SCHRECKINGER et al., 2010). Existem mais de 8000 substâncias identificadas dentro da classe dos polifenóis onde são divididas em grupos de acordo com sua estrutura química como os ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, flavonoides e ligninas (ROSS et al., 2002). Em geral, estes compostos apresentam efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (DZIRI et al., 2012; KANG et al., 2011).

2.3.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SHAHIDI et al., 1995). São originados do metabolismo secundário das plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de estresse (infecções, radiação UV, entre outros). Possuem funções importantes como a pigmentação, crescimento vegetal, atração de polinizadores, defesa contra agressores, função antioxidante através da remoção de radicais livres formados durante a fotossíntese, entre outras (MONAGAS et al., 2005).

Em pesquisas epidemiológicas alguns flavonoides apresentam-se associados com a proteção contra doenças do envelhecimento. Isto pode ser justificado devido à sua ação antioxidante. A formação de radicais livres pelo oxigênio é supostamente a chave para o desenvolvimento de câncer e doenças coronárias, aliado à função protetora da membrana celular (SELLAPPAN et al., 2002; YILDRIM et al., 2002).

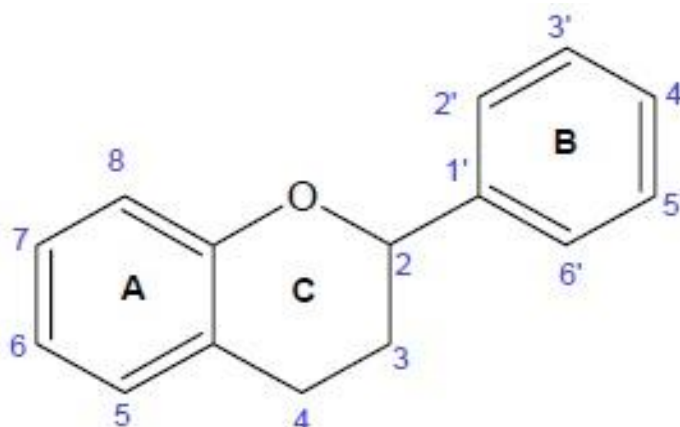
As frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha/azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares. Especialmente os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico dentre estes cita-se: as antocianinas, os flavonóis, as catequinas e os taninos (hidrolisados ou condensados) nas quais estão frequentemente presentes. Muitos destes compostos apresentam uma grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora.

Estes compostos fenólicos apresentam diversas funções de defesa para as plantas, não somente contra agentes do meio ambiente (luz, temperatura e umidade), mas para fatores internos incluindo diferenças genéticas, nutrientes, hormônios, contribuindo para a sua síntese (AHERNE & O'BRIEN, 2002; BURNS et al., 2001).

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (LEE et al., 2005).

Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais. Os denominados de flavonoides são os que apresentam a estrutura química descrita como $C_6-C_3-C_6$ (Figura 6).

Figura 4 - Estrutura genérica de compostos da classe de flavonoides.

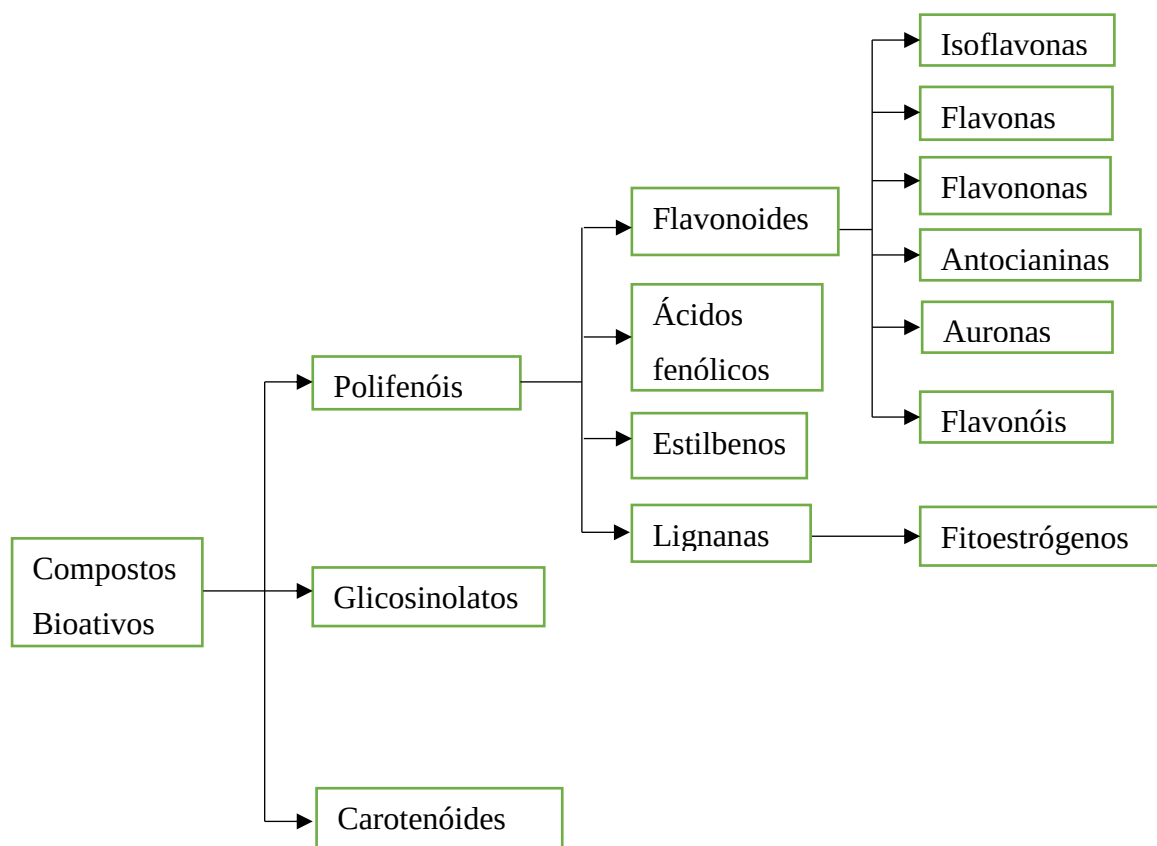


Fonte: ASSUNÇÃO et al., 2016.

Nesse grupo encontram-se as antocianinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002; MELO & GUERRA, 2002; BURNS et al., 2001).

A Figura 7 ilustra, de forma geral, como estão distribuídos e classificados os compostos fenólicos mostrando suas divisões e subdivisões.

Figura 5 - Classificação geral dos compostos bioativos.

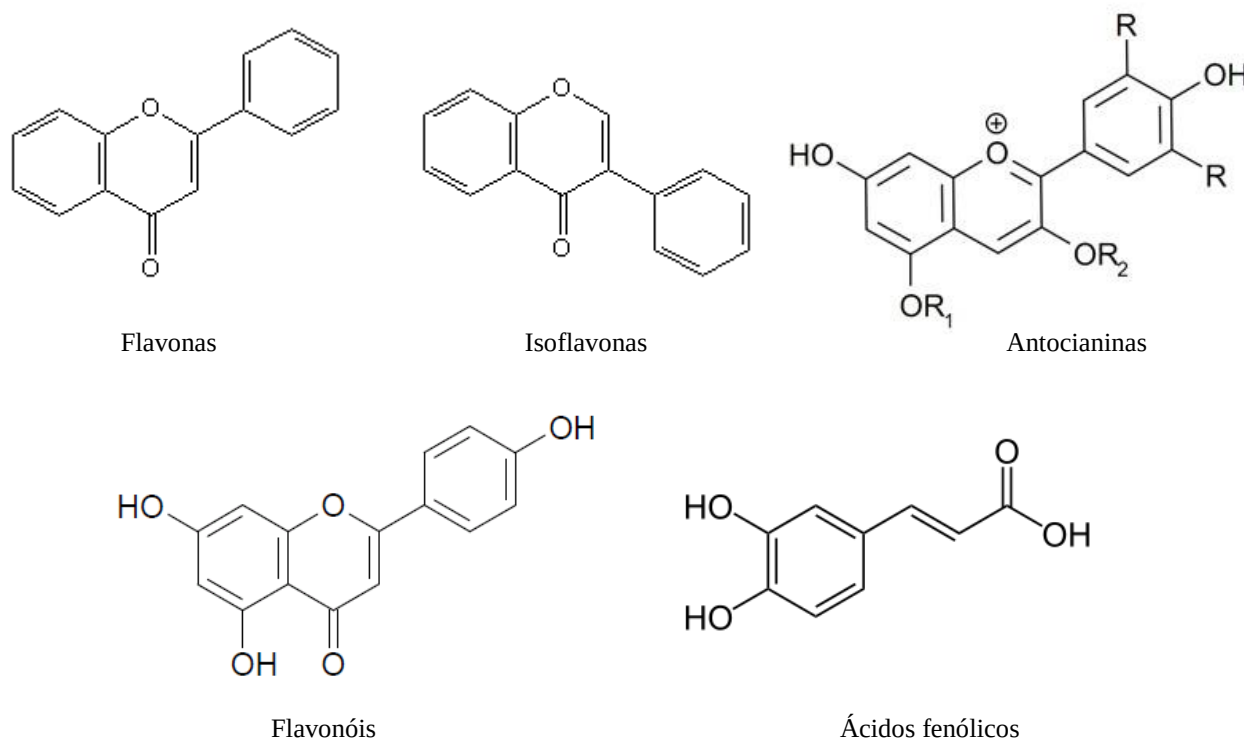


Fonte: MIYAOKA (2014).

As antocianinas (Figura 8) são um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis, amplamente distribuídos no reino vegetal. Seu espectro de cor vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura. Muitas frutas, hortaliças, folhas e flores devem sua atrativa coloração a estes pigmentos que se encontram dispersos nos vacúolos celulares (MELO & GUERRA, 2002).

As isoflavonas (Figura 8), também chamadas isoflavonoides, são compostos químicos fenólicos e estão amplamente distribuídos no reino vegetal. As concentrações destes compostos são relativamente maiores nas leguminosas e, em particular, na soja (LEE et al., 2005). As principais isoflavonas encontradas são daidzeína, genisteína e a gliciteína.

Figura 6 - Estruturas químicas de algumas classes de compostos fenólicos.



Fonte: PARK et al., 2001; Huber et al., 2008; MELO & GUERRA, 2002.

Os flavonóis e as flavonas (Figura 8) que são comumente encontrados são quercetina, campeferol, luteolina, apigenina, catequina e epicatequina e são normalmente localizados em plantas principalmente na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcares, sendo normalmente *o*-glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila (HUBER et al., 2008).

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por três carbonos ligada ao anel (Figura 8). Os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido cafeico (PARK et al., 2001).

Os poucos relatos de identificação da composição química do abacate de forma geral apontam o ácido glucônico, o ácido quínico e a epicatequina como principais compostos

presentes nessa fruta, mas pode-se encontrar também dímero epicatequina-etilo, ácido 3,4,5-Tri-O-galoilquínico, procianidina C, procianidina B, 7-Glucosilo-11-metil-oleosido, quercetina di-hexose, quercetina-O-hexose-O-pentose entre outros (ASSUNÇÃO et al., 2016).

2.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

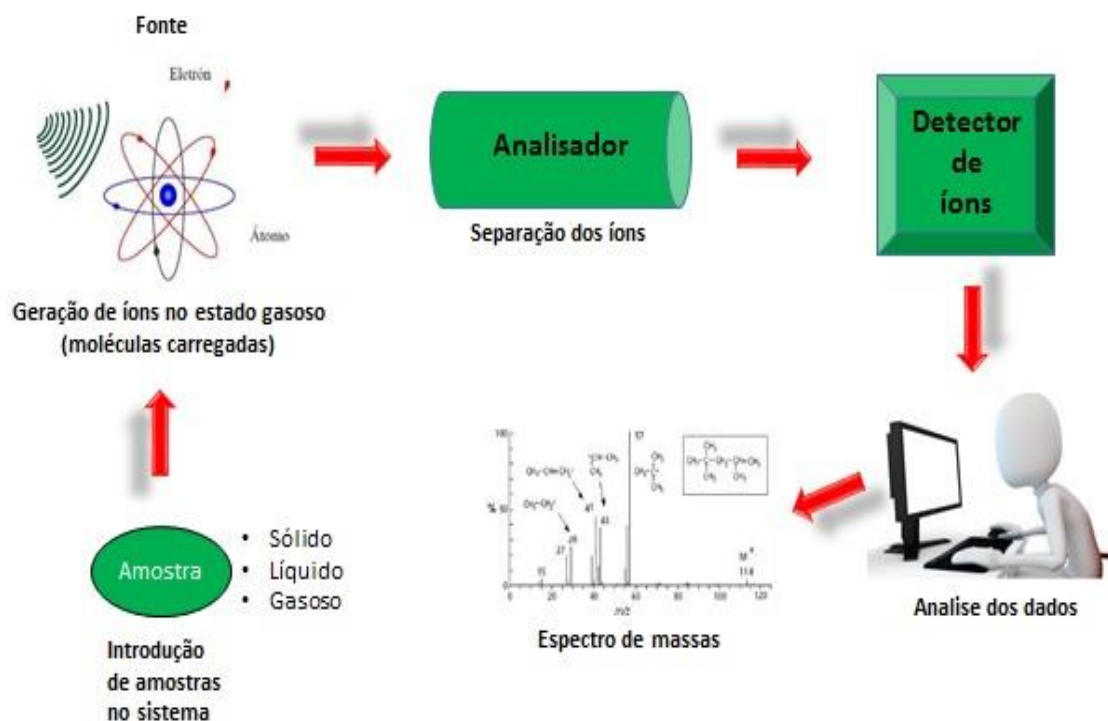
A cromatografia líquida consiste num método analítico de separação de distintas espécies químicas presentes numa amostra. A separação dos compostos é dada pela interação seletiva entre as moléculas do soluto e duas fases, uma estacionária e outra móvel (COLLINS et al., 2006).

As substâncias presentes na amostra, devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, dispõem de distintos graus de afinidade (polaridade) com as fases móvel e estacionária, fazendo com que as suas velocidades de migração sejam distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica, ou seja, a substância com maior afinidade polar com a coluna cromatográfica é aquela que elui por último e a substância que elui primeiro será a de menor afinidade polar com a fase estacionária (SKOOG et al., 2002).

As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação, especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio, dentre outras. Isto se deve, principalmente, à sua capacidade de separação dos componentes presentes nas misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas modernas.

A técnica de espectrometria de massas é uma aliada muito poderosa da cromatografia. Essas duas técnicas acopladas são uma ferramenta de alto potencial de identificação e quantificação de uma variedade muito grande de compostos das mais diversas classes. Atualmente, essa combinação de técnicas é a mais comumente utilizada por laboratórios de diversas áreas da indústria e de pesquisa. A espectrometria, de forma geral, consiste na introdução da amostra a ser analisada em uma fonte onde será ionizada, passando em seguida por um analisador que está sob vácuo e irá separar os íons formados pela fonte, logo após irá passar por um detector de íons onde o sinal é amplificado para que se possa coletar os dados e enviados para o computador que possui um software para interpretar e analisar as informações obtidas, como pode ser observado na Figura 4 (BAKER et al., 1999).

Figura 7- Representação do funcionamento de um espectrômetro de massas.



Fonte: Próprio autor

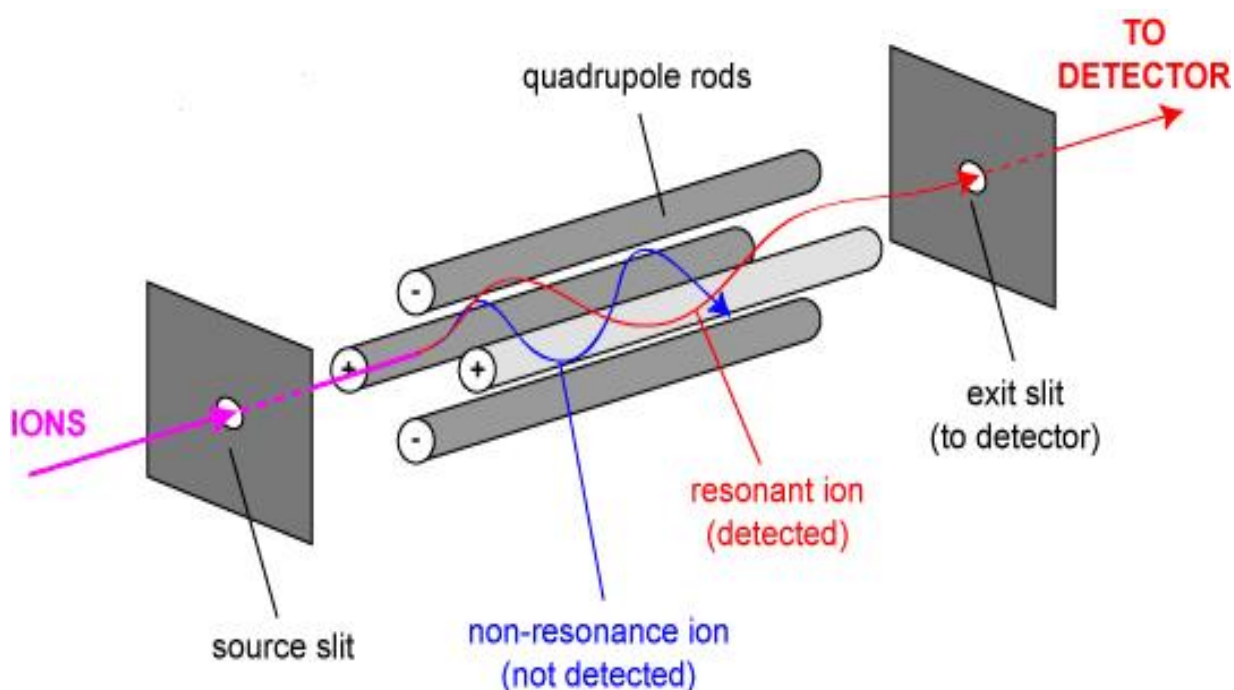
Em resumo, o princípio básico da espectrometria de massas (MS) é gerar íons de compostos inorgânicos ou orgânicos pelo método mais apropriado, separar esses íons pela sua razão massa/carga (m/z) e detectar qualitativamente e quantitativamente a abundância de seus respectivos m/z .

Existem vários tipos de analisadores que podem ser utilizados nos espectrômetros de massas sendo os mais comuns os do tipo *ion-trap*, quadrupolo e *time of flight* (TOF) (SKOOG et al., 2002). A escolha do tipo de analisador a ser utilizado dependerá do propósito da análise, dos tipos de analitos, necessidade de quantificação dos compostos, entre outros fatores.

No trabalho que está sendo apresentado, está em destaque o analisador do tipo quadrupolo. Os aparelhos quadrupolo são relativamente pequenos, robustos, simples e mais baratos e podem ser utilizados para gerar espectros do tipo “dissociações induzidas por colisões de baixa energia” (*Low-energy collision-induced dissociation*, CID MS/MS).

O quadrupolo é composto de quatro barras (Figura 5), usualmente feitas de metal, onde um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto que o outro a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua e radiofrequência é aplicada nas barras. O par positivo de barras atuará como um filtro para massas mais elevadas, enquanto que o par negativo age como um filtro para massas pequenas (NIESSEN et al., 2006). Quando se deseja obter informações estruturais ou aumentar a seletividade de métodos quantitativos, a

Figura 8- Representação do funcionamento de um quadrupolo de espectrômetro de massas.



Fonte: SKOOG (2002).

fragmentação passa a ser desejada. Nesse caso, isso ocorre em condições muito bem controladas dentro do próprio MS, em dispositivos conhecidos como Câmara de Colisão (WEBB et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar a caracterização físico-química e avaliar a composição fitoquímica e a capacidade antioxidante na semente, casca e polpa de três variedades de abacate (Margarida, Breda e Geada).

3.2. Objetivos específicos

- Determinar as características físicas das diferentes variedades de abacate;
- Avaliar a caracterização físico-química da casca, polpa e semente das diferentes variedades de abacate a partir das frutas *in natura*;
- Determinar o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais nas diversas partes do fruto;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos da casca, semente e polpa das variedades de abacate pelos métodos de ORAC, ABTS e FRAP;
- Padronizar metodologia analítica dos extratos por LC-MS para determinação e quantificação de compostos;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos e flavonoides nas diversas partes do fruto das três variedades de abacate utilizando a técnica de LC-MS;
- Comparar os dados do teor dos ácidos fenólicos e flavonoides para as variedades Margarida, Breda e Geada de abacate;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Flavor e análises Cromatográficas (LAF), pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PROCTA) da Universidade Federal de Sergipe – UFS, Brasil.

4.1. Padrões analíticos e reagentes

Todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau HPLC. A água utilizada para a fase móvel foi purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil; Direct-Q®3UV). Os solventes acetonitrila e ácido fórmico utilizado foram de grau de pureza de HPLC de 98% obtido de Sigma-Aldrich e Fluka Analytica (St. Louis, MO, EUA). Os padrões utilizados foram (Figura 9) ácido cafeico ($C_9H_8O_4$), ácido ferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$), catequina ($C_{15}H_{14}O_6$), epicatequina ($C_{15}H_{14}O_6$), ácido gálico ($C_7H_6O_5$), campeferol ($C_{15}H_{10}O_6$), naringenina ($C_{15}H_{12}O_5$), ácido *p*-cumárico ($C_9H_8O_3$), vanilina ($C_8H_8O_3$), ácido succínico ($C_4H_6O_4$) e ($C_8H_8O_4$) todos adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

Os reagentes etanol, cloreto de alumínio, carbonato de sódio, tampão de fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de ferro, Folin-Ciocalteu, fluoresceína, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-crom-2-carboxico (Trolox), radical 2,2-difenil-1-pi-crilhiazilo (DPPH), ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS⁺); Dicloreto de 2,2-azobis-2-amidinopropano (AAPH) e o reagente FRAP foram obtidos da Sigma Aldrich e Fluka Analytica (St. Louis, MO, EUA).

4.2. Matéria prima

Os frutos de abacate das variedades Margarida, Breda e Geada foram coletados aleatoriamente em fornecedores na Central Estadual de Abastecimento do estado de Aracaju/SE, nos meses entre outubro de 2017 e julho de 2018 de acordo com a temporada de cada variedade, sendo adquiridos quatro frutos por variedades. Posteriormente, os frutos foram lavados, sanitizados e despolpados manualmente para a separação das partes de interesse (casca, polpa e semente) para posterior avaliação físico-química e obtenção dos extratos. As amostras foram devidamente acondicionadas e mantidas sob refrigeração (7 °C) até o momento das análises.

4.3. Procedimento experimental

4.3.1. Análises físico-químicas

4.3.1.1. Umidade

O teor de umidade foi determinado através de um medidor de umidade por infravermelho (GEHAKA modelo IV 2500) sob leitura direta. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1.2. Acidez total titulável

A determinação foi efetuada através de titulação com solução padronizada de hidróxido de sódio, como instituído pelo Instituto Adolf Lutz (2008). Foram pesadas 5 g da amostra, as quais foram transferidas para um erlenmeyer de 125 mL com o auxílio de 50 mL de água. Foram acrescentadas 2 a 4 gotas de solução de fenolftaleína e subsequentemente a mistura titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, até coloração rósea. A acidez total titulável foi expressa em porcentagem de ácido cítrico. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1.3. Sólidos solúveis (°Brix)

A determinação foi realizada conforme protocolo determinado pela AOAC (2000). Uma alíquota de cada amostra foi colocada sobre o prisma do refratômetro (The Electron Machine Corporation, modelo DSA E-Scan), devidamente aferido com água destilada, sob o qual foi realizada leitura direta. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1.4. Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

A determinação foi executada por meio de leitura direta em pHmetro (HANNA, modelo HI 2210), segundo método proposto pelo Instituto Adolf Lutz (2008). Foram pesados 10 g da amostra em um béquer e diluídos em 100 mL de água. O conteúdo foi agitado até que as partículas se encontraram uniformemente suspensas. Com o aparelho previamente calibrado, soluções-tampão nos pHs 4 e 7, foi realizada a leitura do pH das respectivas amostras. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1.5. Textura

A determinação foi executada através de análise direta do texturômetro CT3 texture analyzer fabricado pela Brookfield e modelo CT325KG seguindo os parâmetros padrões de teste de compressão com alvo de 10 mm, *trigger load* de 4g, velocidade de 0,5 mm/s, 1 ciclo com 10 pontos/segundo e *load cell* 25g. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1.6. Cor

Determinação foi realizada por leitura direta no colorímetro fabricado pela Konica Minolta de modelo CMA177. O iluminante escolhido foi o D65, recomendado pela CIE (Comissão Internacional de Iluminação), por representar a luz média do dia.

Para a realização das análises o equipamento foi calibrado e utilizado a escala de cor CIELAB, sendo analisado os parâmetros L^* , a^* e b^* , bem como as coordenadas esféricas do ângulo Hue e Chroma. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1.7. Determinação de lipídios por extração direta em Soxhlet

Essa extração se baseia no manual de análises do Instituto Adolfo Lutz (2008) onde foram pesados 2 a 5 g da amostra em cartucho de papel de filtro e foi amarrado com fio de lã previamente desengordurado. Transferido o cartucho amarrado para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Foi mantido sob aquecimento em chapa elétrica à extração contínua por 8 horas (quatro a cinco gotas por segundo). Após retirar o cartucho de filtro amarrado, o éter foi destilado e transferido junto com o balão e resíduo extraído para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora.

O balão foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e em seguida pesado. Essa operação foi repetida à cada 30 minutos até peso constante. As análises foram realizadas em triplicata.

Para o cálculo do teor de lipídios foi utilizada a Equação 1.

$$\text{Teor de lipídios \%} = \frac{P_{t+a} - P_t}{P} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde:

P_{t+a} = massa do tubo contendo a amostra;

P_t = massa do tubo vazio;

P = massa da amostra (g).

4.3.2. Preparo dos extratos alcoólicos

As extrações foram preparadas com base na metodologia de Oliveira et al. (2008) com algumas modificações, onde 2 g de cada amostra selecionada foi extraída com 15 mL de etanol 70% por 60 minutos em ultrassom (USC-1400^a, Unique, São Paulo, Brasil) com frequência de 40 khz, a temperatura ambiente. Em seguida, os extratos foram centrifugados por 10 min a uma velocidade de 14000 rpm e o sobrenadante seco em estufa a 35 °C até

evaporação total do solvente e ressuspensos em etanol 70% com volume necessário para atingir uma concentração do extrato de 100 mg/mL, aproximadamente. Os extratos obtidos foram acondicionados em frasco âmbar devidamente identificados e armazenados em freezer a -18 °C até o momento da realização de todas as análises descritas nos próximos itens.

4.3.3. *Determinação do teor de flavonoides totais*

O teor de flavonoides totais foi determinado utilizando metodologia proposta por Gonzalez-Aguilar et al. (2007) e modificada por Moo-huchin et al. (2015), na qual 1 mL de cada amostra extraída foi misturada e equilibrada com 4 mL de água deionizada e 300 µL de 5% NaNO₂ durante 5 min. Após equilíbrio, 300 µL de uma solução metanólica de AlCl₃ a 20 mg/mL foi adicionada. A mistura foi deixada em repouso durante 30 min e depois a absorbância foi determinada a 415 nm, utilizando o espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices). Os flavonóides totais foram determinados utilizando uma curva padrão de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como miligrama equivalente de quercetina por 100 gramas de amostra.

4.3.4. *Determinação do teor de compostos fenólicos totais*

O teor de fenólicos totais foi determinado segundo metodologia proposta por Shetty et al. (1995) adaptada por Shori et al. (2014). Onde, 1 mL dos extratos foram transferidos para tubos de ensaio, aos quais foi adicionado 1 mL de solução de etanol a 95%, 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 1 N. Posteriormente, 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 5% foi adicionado seguido de homogeneização. As misturas foram mantidas em câmara escura por 60 minutos, ao final dos quais, foram novamente homogeneizadas. A absorbância de 725 nm foi convertida em fenólicos totais e expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico por 100 gramas (mg GAE/100g) de amostra. A curva de calibração foi estabelecida utilizando várias concentrações de ácido gálico como padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.5. *Teor de carotenóides totais e clorofila*

A determinação de carotenoides totais foi baseada na metodologia apresentada por Lichtenthaler (1987), onde foram pesados 2 g da amostra que em seguida, transferida para um almofariz, adicionado 0,2 g de carbonato de cálcio e 7 mL de acetona a 80% e homogeneizado. O extrato foi diretamente no balão volumétrico âmbar de 25 mL e lavado o

resíduo do papel de filtro duas vezes com acetona a 80%, o balão foi aferido com o mesmo solvente. As análises foram realizadas em triplicata.

O teor de clorofila foi estimado a partir da leitura do extrato filtrado em espectrofotômetro a 646,8 e 663,2nm para a determinação do conteúdo de clorofila a (Ca) e clorofila b (Cb), respectivamente, de acordo com as seguintes Equações 2,3 e 4.

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = 21,50 \times A_{646,8} - 5,10 \times A_{663,2} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\text{Clorofila T (mg/g amostras)} = 7,15 \times A_{663,2} + 18,71 \times A_{646,8} \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde:

A= absorbância.

Para a determinação do teor de carotenóides foi estimado a partir da leitura do extrato filtrado em espectrofotômetro a 646,8 e 663,2 e 470nm. A concentração foi estimada de acordo com a Equação 5:

$$\text{Carotenóides (mg/g)} = [1000 \times A_{470} - (1,82 \times \text{Ca} - 104,96 \times \text{Cb})]/198 \quad \text{Eq. (5)}$$

4.3.6. Determinação de atividade antioxidante

4.3.6.1. ABTS• (ácido 2,2-Azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfônico)

A análise foi conduzida segundo metodologia proposta por Moo-Huchin et al. (2014) com alterações. O cátion ABTS• foi gerado pela interação de 19,2 mg de ABTS dissolvida em 5 mL de água destilada e de 88 µL de 0,0378 g/mL de persulfato de potássio. A solução foi incubada no escuro à temperatura ambiente por um período de 16 horas. O radical ABTS• ativo foi diluído em etanol até atingir uma absorbância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Após a adição de 30 µL de amostra ou padrão a 2970 µL de solução ABTS• diluída, as absorbâncias foram registradas 6 minutos após a mistura a um comprimento de onda de 734nm. A curva de calibração foi preparada utilizando-se trolox como padrão e os resultados foram expressos em µmol equivalentes de trolox/100g de extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.6.2. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

O ensaio FRAP foi realizado de acordo com a metodologia de Thaipong et al. (2006). As soluções de estoque incluíram 300 mmol de tampão acetato (3,1 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 16 mL de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), pH 3,6, 10 mmol de TPTZ (2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine) em 40 mmol de HCl

e 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. A solução de trabalho foi preparada misturando-se 25 mL do tampão acetato, 2,5 mL da solução de TPTZ e 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Os extratos da polpa, casca e semente do abacate (150 μL) reagem com 2850 μL de FRAP e a solução incubada no escuro por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 593 nm. A curva de calibração utilizará soluções de 20 a 800 μmol de trolox e os resultados expressos em $\mu\text{mol TE/g}$ de extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.6.3. ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

O procedimento ORAC foi realizado através de metodologia proposta por Thaipong et al. (2006) com alterações. Para a análise 1,5 mL de solução de trabalho fluoresceína foi acrescido de 0,75 mL da amostra e agitado em vortex por um minuto. Em seguida, a solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Por fim, foi adicionado 0,75 mL da solução de AAPH, agitado em vortex e feita à leitura nas condições de fluorescência no espectrofotômetro: excitação a 485 nm e emissão a 520 nm. A diminuição da fluorescência foi monitorada cineticamente a cada 10 minutos por 24 horas e a curva de calibração foi preparada utilizando-se entre 0 a 50 mmol de trolox. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.7. *Identificação e quantificação dos compostos por cromatografia líquida acoplado à espectrômetro de massas*

Os extratos obtidos no item 4.3.2 foram analisados em um cromatógrafo líquido UPLC Acquity Class H (Waters) acoplado detector PDA e espectrômetro de massas do tipo quadrupolo simples (QDa).

As condições cromatográficas que foram utilizadas foram baseadas em ANDRADE et al. (2017) onde a identificação de polifenóis no UPLC, os extratos foram separados e analisados em uma coluna Ascentis Phenyl (15 cm x 4,6 mm, 5 μm ; Supelco analitical). A fase móvel foi constituída de: solução A (água deionizada com 0,1 % de ácido fórmico) e solução B (acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico) com vazão de 0,35 mL/min, sob temperatura de 40 °C e volume de injeção de 5 μL . A eluição foi realizada em modo gradiente, de acordo com os seguintes eventos apresentados na Tabela 1.

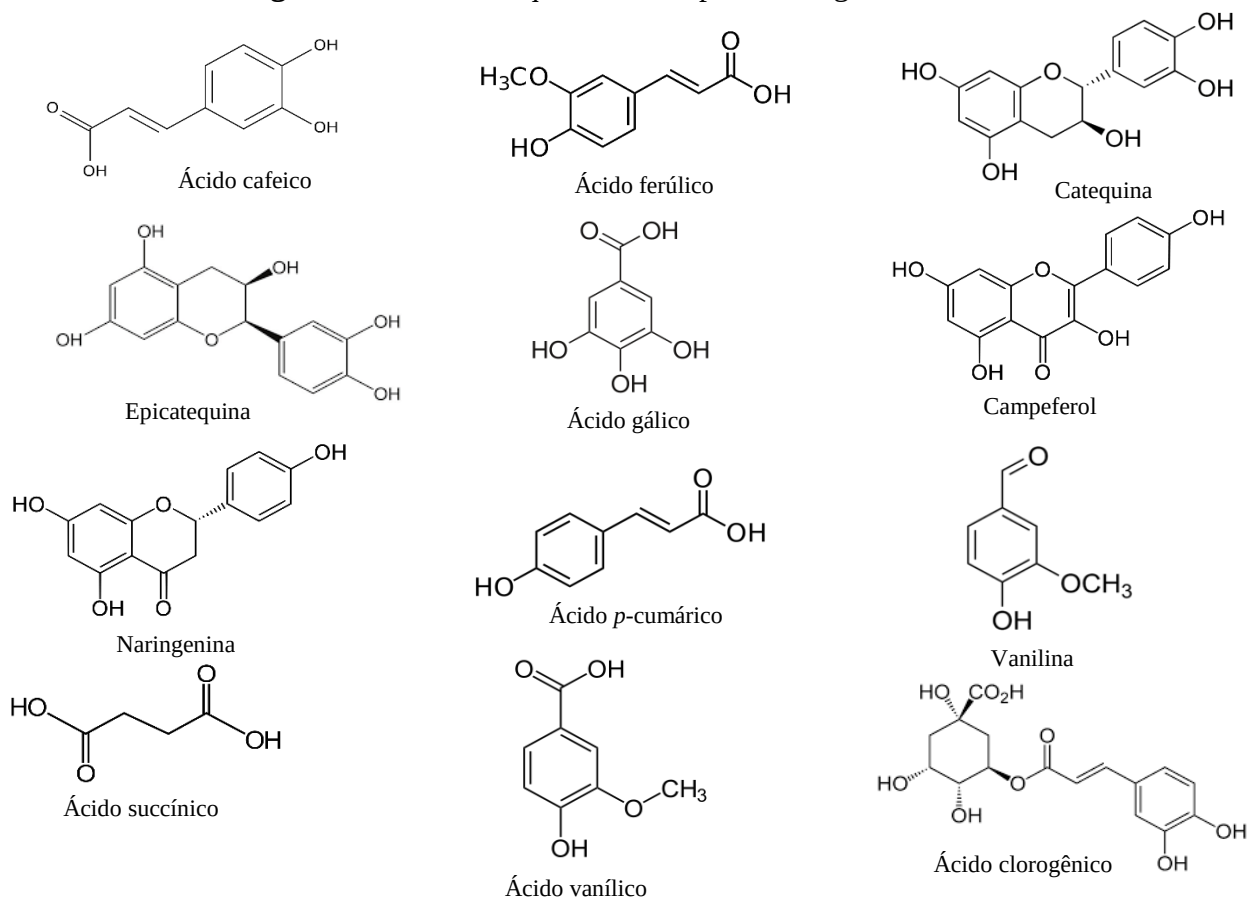
Tabela 2 - Eventos da eluição no modo gradiente utilizado para separação de compostos fenólicos através do sistema UPLC-MS.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
	(H ₂ O + 0,1% ácido fórmico)	(ACN + 0,1% ácido fórmico)
0,0	100	0
15,0	75	25
25,0	60	40
35,0	50	50
45,0	30	70
55,0	0	100
60,0	100	0

Fonte: Próprio autor.

No MS foi utilizado o modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) que é altamente seletivo e foi usado para monitorar íons específicos dos compostos de interesse, onde foi comparado o íon na solução padrão com o íon no extrato analisado potencializando o poder de identificação e quantificação do equipamento.

Através do modo SIM foram observados os íons específicos e seus respectivos tempos de retenção para cada composto ao qual foi identificado mediante comparação com padrões e espectros presentes na literatura, dentre vários os compostos analisados por meio de inserção direta no modo negativo, os seguintes padrões de flavonoides e ácidos fenólicos foram investigados (figura 9) ácido cafeico (m/z 179) (C₉H₈O₄), ácido ferúlico (m/z 193) (C₁₀H₁₀O₄), catequina (m/z 289) (C₁₅H₁₄O₆), epicatequina (m/z 289) (C₁₅H₁₄O₆), ácido gálico (m/z 169) (C₇H₆O₅), ácido clorogênico (m/z 353) (C₁₆H₁₈O₉), campeferol (m/z 285) (C₁₅H₁₀O₆), naringenina (m/z 259) (C₁₅H₁₂O₅), ácido *p*-cumárico (m/z 163) (C₉H₈O₃), vanilina (m/z 151) (C₈H₈O₃), ácido succínico (m/z 117) (C₄H₆O₄) e ácido vanílico (m/z 167) (C₈H₈O₄).

Figura 9 - Estruturas químicas dos padrões orgânicos utilizados.

Fonte: Sigma-Aldrich, 2019.

A quantificação foi realizada a partir de curvas de calibração construídas para cada um dos padrões citados acima e as respectivas concentrações foram determinadas através das áreas das bandas dos compostos alvo em função da curva de calibração (ANDRADE et al., 2017). A faixa de concentração da curva foi de 0,02 à 1mg/mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4. Caracterização físico-química das diferentes variedades do abacate

4.3.8. Umidade

Conforme os dados apresentados na Tabela 2, pode-se observar que os teores de umidade variaram de 34,68 a 83,29%, onde os teores tanto nas frações dos frutos, quanto entre as variedades estudadas apresentaram diferenças significativas. Com os resultados deste estudo, podem ser notados que a variedade Geada apresentou maiores teores de umidade (83,29, 72,24 e 71,83%) para a polpa, semente e casca, respectivamente quando comparado às demais variedades. De uma forma geral, as polpas apresentaram uma maior percentagem de umidade (83,29% e 76,15%), seguidas da semente (72,24% e 57,42%), com exceção da variedade Margarida, onde a semente (60%) teve a maior teor de umidade. Fato este também foi observado no estudo de Daiuto et al. (2014) que ao avaliarem a variedade Hass relataram um alto teor de umidade, principalmente na semente enfatizando que essa fração do fruto pode conter maior teor quando comparado a polpa.

Outros estudos também têm apresentado variação nesse parâmetro como para as variedades Algarvias (70,83%), Brasil (69,85%), Espanha (80,25%) entre outras indicando maiores teores de umidade na polpa de abacate (VINHA et al., 2013; DAIUTO et al., 2014; RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011). Além disso, Anthony (2018) relatou que a semente de abacate da variedade Nigeriana contém 13,09% de teor de umidade sendo esse inferior ao encontrado nas variedades desse estudo que apresentam pelo menos 57,42% de umidade nas sementes.

Tabela 3 - Teor de umidade das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedade	Teor de umidade (%)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	36,31 ± 4,13 ^{bC}	60,00 ± 3,09 ^{aB}	34,68 ± 3,84 ^{bC}
Geada	83,29 ± 0,33 ^{aA}	72,24 ± 0,59 ^{bA}	71,83 ± 1,96 ^{bA}
Breda	76,15 ± 2,08 ^{aB}	57,42 ± 0,46 ^{bB}	51,28 ± 1,92 ^{cB}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobresscritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Fonte: Próprio autor.

4.3.9. Sólidos Solúveis

A Tabela 3 apresenta os dados do teor de sólidos solúveis, a qual demonstrou uma variação de 5,16 a 10,81 °Brix, com destaque para a variedade Margarida que apresentou maior teor em relação às demais variedades, no entanto não diferindo significativamente, em nível de 5% de significância, em relação às diferentes partes do fruto analisada. Já às demais cultivares estudada, os abacates da variedade Geada apresentou maior concentração (8,14 °Brix) na fração semente, assim como para a cultivar Breda (10,56 °Brix), porém não diferindo da polpa (9,84 °Brix).

Considerando que na casca do abacate Algarvio (3,01 °Brix) contém menor teor de sólidos solúveis totais em comparação com a polpa e semente, os analitos estão em seu período ideal de maturação, segundo Santos et al. (2014) onde valores de sólidos solúveis 8 °Brix na casca e polpa indicam a condição ideal de maturação do abacate e esse número tende a aumentar como consequência do metabolismo respiratório, que é intensificado após a colheita,

Tabela 4 - Teor de sólidos solúveis das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedade	Teor de sólidos solúveis (°Brix)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	9,70 ± 0,63 ^{aA}	10,21±0,27 ^{aA}	10,81±0,41 ^{aA}
Geada	5,16 ± 0,50 ^{bB}	8,14 ± 0,30 ^{aB}	5,73 ± 0,45 ^{bC}
Breda	9,84 ± 0,73 ^{aA}	10,56 ± 0,55 ^{aA}	7,96 ± 0,03 ^{bB}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão,

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobrescritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Próprio autor.

O teor de sólidos solúveis encontrado na polpa e nas demais partes do fruto das diferentes variedades analisadas nesse estudo tem em média o valor de 8,12 °Brix, sendo esse valor próximo dos resultados apresentados por Borges et al, (2016) que ao analisar as variedades Breda e Margarida obtiveram resultados de 8,12 °Brix e 7°Brix respectivamente em suas polpas.

4.3.10. Potencial Hidrogeniônico (pH)

Para os valores de pH, conforme a Tabela 4, os resultados encontrados foram de 6,02 a 7,36, sendo observado diferenças significativas entre as partes do fruto analisada. Verifica-se que as três variedades estudadas apresentam valores em torno de 7, sendo que a variedade Breda mostrou os valores mais baixos tanto na polpa quanto na sua casca. Com relação às variações entre as cultivares, o pH apresentou-se semelhante entre a polpa (7,36 e 7,33) e a casca (7,09 e 7,01) principalmente para Margarida e Geada, respectivamente. Valores estes semelhantes encontrados por Borges et al, (2016) que encontrou pH de 6,46 nas polpas da variedade Breda e 6,73 na polpa da variedade Margarida. Os resultados encontrados se assemelham aos de Salgado et al. (2008), Gouveia et al. (2015) e Oliveira et al. (2013) que analisaram as variedades Margarida, Breda, Hass, Quintal, Fortuna e Ouro verde encontrando pH próximos ao neutro nas polpas e cascas.

Tabela 5 - Potencial hidrogeniônico das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedade	Potencial hidrogeniônico (pH)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	7,36 ± 0,13 ^{aA}	6,02 ± 0,26 ^{bB}	7,09 ± 0,07 ^{aA}
Geada	7,33 ± 0,36 ^{aA}	6,75 ± 0,15 ^{cA}	7,01 ± 0,10 ^{bA}
Breda	6,03 ± 0,47 ^{cB}	6,53 ± 0,10 ^{aA}	6,33 ± 0,04 ^{bB}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobrescritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Próprio autor.

4.3.11. Acidez titulável

A análise da acidez titulável média mostrou que a polpa e resíduos do abacate possuem baixa porcentagem de acidez onde a polpa da variedade Breda apresentou o maior valor contendo apenas 0,86% de ácido cítrico (Tabela 5). Da mesma forma, Borges et al. (2016) encontrou 0,53% na variedade Breda e 1,34% na variedade Margarida e segundo Vinha et al., (2013), a polpa da fruta Algarvia continha 1,07%. Em geral como pode-se observar na Tabela 5, as polpas dos abacates possuem maior teor de acidez com exceção da variedade Margarida apresentando 0,50% de ácido cítrico na semente e valores aproximados na polpa (0,33%) e na casca (0,34%). O menor teor encontrado foi na casca da variedade Geada (0,15%). Estudos realizados por Vieites et al. (2012) afirmam que o teor de acidez do abacate está diretamente

relacionado ao pico respiratório da fruta, onde há uma diminuição desses valores após esse pico respiratório.

Tabela 6 - Teor de acidez das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedade	Teor de acidez (% ácido cítrico)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	0,33 ± 0,04 ^{bB}	0,50 ± 0,02 ^{aA}	0,34 ± 0,01 ^{bB}
Geada	0,28 ± 0,02 ^{aB}	0,25 ± 0,02 ^{aB}	0,15 ± 0,01 ^{bC}
Breda	0,86 ± 0,12 ^{aA}	0,19 ± 0,02 ^{cC}	0,41 ± 0,03 ^{bA}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobresscritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Próprio autor.

4.3.12. Atividade de água

Os resultados da atividade da água são próximos de 1 (Tabela 6) em todas as partes das variedades de frutas do abacate, indicando que há uma alta disponibilidade de água livre. Assim, o abacate é suscetível a reações de deterioração oxidativa, enzimática e microbiológica (NOGUEIRA-DE-ALMEIDA et al., 2018). Como esses fatores influenciadores afetam diretamente a qualidade sensorial ou sanitária dos alimentos, a atividade de água é outro parâmetro a ser utilizado para controlar a qualidade do abacate.

Tabela 7 - Atividade de água das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedade	Atividade de água		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	0,986 ± 0,000 ^{cC}	0,991 ± 0,000 ^{aA}	0,990 ± 0,000 ^{bC}
Geada	0,997 ± 0,000 ^{bA}	0,992 ± 0,000 ^{cA}	0,999 ± 0,000 ^{aA}
Breda	0,991 ± 0,000 ^{aB}	0,988 ± 0,000 ^{bB}	0,991 ± 0,000 ^{aB}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão,

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobresscritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$ em cada experimento de cada linha.

Fonte: Próprio autor.

4.3.13. Teor de Lipídios

A Tabela 7 apresenta os resultados do conteúdo lipídico que variaram em torno de 2,76 a 11,43%, sendo que dentre as variedades de abacate analisada a polpa referente a cultivar Breda mostrou um maior teor com 11,43% em comparação com outras variedades. O que está de acordo ao relatado em outros estudos realizados por Gouveia et al. (2015) e Borges et al. (2016) que encontraram valores de 15,08% e 15,81%, respectivamente. Resultados semelhantes também foram demonstrados para a polpa da variedade Margarida (8,7%), os quais apresentaram resultados próximos encontrado no estudo de Oliveira et al, (2013) com 8,7% e Jorge et al. (2014) com 8,4%.

Além disso, é possível observar que o teor lipídico variou entre as variedades independentes das partes das frutas, sendo que a cultivar Breda se sobressaiu em relação às demais. Com estes dados, é possível notar que os abacates Breda mostram grande potencial para a produção de óleo devido ao seu conteúdo lipídico nas diversas frações do fruto, o qual pode ser usado diretamente ou em produtos processados, aumentando assim o leque de opções para o aproveitamento desses subprodutos (casca e semente), os quais são usualmente descartados. Abacates têm diferentes conteúdos lipídicos de acordo com cada variedade. Essas diferenças podem ser causadas por fatores genéticos específicos (espécies), culturas, solo e clima.

Tabela 8 - Teor de lipídios das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedade	Teor de lipídios (%)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	8,54 ± 0,04 ^{aB}	5,34 ± 0,09 ^{cB}	8,06 ± 0,05 ^{bB}
Geada	2,76 ± 0,05 ^{cC}	3,73 ± 0,01 ^{aC}	3,22 ± 0,83 ^{bC}
Breda	11,43 ± 0,46 ^{aA}	8,21 ± 0,31 ^{cA}	9,36 ± 0,25 ^{bA}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão,

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobrescritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Próprio autor.

4.3.14. Avaliação da textura

A textura, denominado também como firmeza, corresponde como uma importante característica física, para a avaliação de frutos e vegetais, uma vez que, quanto maior o valor de firmeza mais elevada é a vida de prateleira deste vegetal. Sendo esta característica

associada não só a composição e estrutura da presença das paredes celulares, mas também em relação com a manutenção de sua integridade (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A propriedade da textura em percepção da forma e presença de partículas se relaciona à energia necessária para desintegrar um produto semissólido a fim de que possa ser ingerido resultado do grau de dureza da fruta (BRANDT et al., 2015). Dessa forma, foi avaliada a textura das polpas e cascas das diferentes variedades de abacate como pode ser observado na (Tabela 8).

Tabela 9 - Textura das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedade	Textura (N)	
	Polpa	Casca
Margarida	0,17 ± 0,01 ^{bB}	2,84 ± 0,11 ^{aB}
Geada	0,26 ± 0,01 ^{bA}	4,42 ± 0,13 ^{aA}
Breda	0,18 ± 0,01 ^{bB}	2,85 ± 0,34 ^{aB}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobrescritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Próprio autor.

Conforme os dados observam-se que, em geral, as polpas das três variedades de abacate analisadas possuem valor de textura mais baixo variando entre 0,17 a 0,26 N, quando comparados aos resultados das cascas que apresentaram valores em torno de 2,84 a 4,42 N, sendo que a variedade Geada revelou maior resistência à penetração em relação as demais cultivares, resultado semelhante também observado para a casca desta variedade. Com esses resultados observa-se que o abacate em si não mostra resistência a forças incidentes em sua superfície tendo uma textura com dureza muito baixa fazendo com que seja uma fruta muito propícia a deformações ao sofrer pressões aplicadas em seu corpo, sendo bastante vulnerável a quedas ou impactos sofridos.

4.3.15. Análise colorimétrica

A Tabela 9 apresenta os parâmetros colorimétricos da polpa e casca das variedades Margarida, Geada e Breda expressos pelo sistema de coordenadas retangulares (L^* , a^* e b^*). A coordenada L^* que representa a luminosidade, apresentou valores variando em torno de 29,56 a 30, 87 para as diferentes polpas de abacate, no entanto, estatisticamente não apresentaram

diferenças significativas. Já para as amostras da casca a variedade Breda indica uma maior luminosidade com 46,79, sendo assim, a casca é mais escura que a polpa (29,56). Para a coordenada a^* , que indica a intensidade da cor vermelha (valores positivos) e verde (valores negativos), os resultados obtidos para a polpa das diferentes variedades apresentaram valores positivos com variação de 3,94 a 4,45 indicando estarem mais próximos da cor verde. Para as amostras da casca os resultados foram negativos em torno de -7,88 a -9,91, indicando a cor predominante verde.

Tabela 10 - Análise de cor das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Parâmetros	Variedades		
Colorimétricos	Polpa		
	Margarida	Geada	Breda
L*	30,87 ± 0,48a	29,97 ± 1,63a	29,56 ± 0,55a
a*	4,23 ± 0,23a	3,94 ± 0,24ab	4,45 ± 0,02c
b*	22,85 ± 1,12a	22,67 ± 0,61a	24,32 ± 0,22a
Chroma	22,72 ± 1,71a	23,00 ± 0,64a	24,72 ± 0,22a
Hue (°)	74,64 ± 0,55b	36,57 ± 0,15a	79,64 ± 0,05a
	Casca		
	Margarida	Geada	Breda
L*	43,30 ± 1,63b	36,57 ± 0,15c	46,79 ± 0,84a
a*	-9,78 ± 0,41b	-7,88 ± 0,22a	-9,91 ± 0,45b
b*	33,55 ± 1,20a	17,79 ± 0,21b	35,52 ± 0,85a
Chroma	33,96 ± 2,06a	19,45 ± 0,28b	36,89 ± 0,70a
Hue (°)	110,08 ± 4,52ab	113,88 ± 0,35a	105,61 ± 1,03b

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobrescritas minúsculas iguais na mesma linha, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Próprio autor.

Enquanto, para a coordena b^* que representa a cor amarela e azul para valores positivos e negativos, respectivamente, os valores das polpas estudadas apresentaram resultados de 22,67 a 24,32, demonstrando estarem próximos da cor amarela, no entanto não houve diferença significativa entre as variedades. Já a casca apresentou uma maior variação entre as variedades, onde a casca do abacate Geada (17,79) indica uma coloração mais amarelada,

quando comparado às outras variedades Margarida (33,55) e Breda (35,52), as quais estatisticamente não diferiram significativamente.

Com relação ao valor da cromaticidade (*Chroma*), a qual indica a intensidade da cor ou saturação em relação ao branco, os valores para a polpa dos abacates ficaram em torno de 22,72 a 24,72 indicando uma cor mais saturada, embora não terem apresentado diferença significativa, vale salientar que a variedade Margarida (22,72) é a polpa menos brilhante que as outras polpas. Em relação aos valores observados para as cascas dos abacates, a cultivar Geada (19,45) indicou ter uma casca mais brilhante em comparação a Breda (36,89) e Margarida (33,96).

Para o ângulo Hue, as diferentes polpas de abacates apresentaram tonalidades com média de 36,57 a 79,64 o que indicam estarem próximos do ângulo de 90°, sendo representado pela cor amarela, para as cascas os resultados ficaram por volta de 105,61 a 113,88 demonstrando também estarem aproximados da cor amarelada, no entanto, as polpas apresentam cores mais intensa por estarem mais perto do eixo 0, principalmente a variedade Geada.

4.5. Compostos bioativos

4.3.16. Fenólicos totais

A Tabela 10 apresenta o teor de fenólicos totais presentes nas amostras de casca, polpa e semente de abacate das variedades Margarida, Geada e Breda.

De acordo com os dados apresentados, observa-se que houve diferença significativa, a nível de 5% de significância, do conteúdo de fenólicos totais presentes nas diferentes variedades de abacate com relação aos resíduos (casca e semente) e polpa.

Observa-se que as sementes apresentaram o maior conteúdo de fenólicos totais (33,03 a 83,38 mg GAE/g) com relação às cascas (23,06 a 55,57 mg GAE/g) e às polpas (0,22 a 0,40), independente da variedade do abacate. Wang et al. (2010) estudaram oito variedades de abacate e reportaram que todas as variedades o conteúdo de fenólicos totais foi maior na semente, confirmando ao que foi obtido neste trabalho.

A análise pelo método de Folin-Ciocalteu do conteúdo fenólico total foi maior (83,38 mg GAE/g) na semente da variedade Margarida sendo esse valor mais elevado que os da semente da variedade Hass (60,82 mg GAE/g) e Fuerte (69,12 mg GAE/g), encontrados por Rodríguez-Carpena et al. (2011), o que instiga ainda mais o interesse na variedade Margarida, por ser uma boa fonte de compostos fenólicos comparado aos principais abacates utilizados para comercialização.

Tabela 11 - Teor de fenólicos totais (FT) das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedade	Fenólicos totais (mg GAE/g)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	0,40 ± 0,05 ^{cA}	83,38 ± 2,46 ^{aA}	42,84 ± 1,76 ^{bB}
Geada	0,22 ± 0,01 ^{cB}	74,04 ± 1,48 ^{aB}	55,57 ± 1,23 ^{bA}
Breda	0,39 ± 0,03 ^{cA}	33,03 ± 0,08 ^{aC}	23,06 ± 0,77 ^{bC}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobresscritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. FT—com Folin-Ciocalteu expresso como mg/g equivalentes ao ácido gálico.

Fonte: Próprio autor.

Estudos prévios relataram que as variedades Hass (51,60 mg GAE/g), Algarvia (704,0 mg/100g) e Hass brasileira (57,30 mg GAE/g) tiveram maior teor de fenólicos totais em relação à parte da polpa (WANG et al., 2010; VINHA et al., 2013; DAIUTO et al., 2014). Isto pode estar relacionado ao teor genético da variedade de frutos que influencia diretamente a presença desses metabólitos, assim como temperatura, sazonalidade, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, adição de nutrientes entre outros (GOBBO-NETO E LOPES, 2007).

4.3.17. Flavonoides totais

Os compostos polifenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante de um alimento e a maioria desses compostos é encontrada em frutas e derivados (Karakaya, 2004), A Tabela 11 mostra o teor de flavonoides totais das diversas variedades de abacate.

Tabela 12 - Teor de flavonoides totais das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedades	Flavonoides totais (mg QE/g)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	1,03 ± 0,18 ^{bA}	2,71 ± 0,08 ^{aA}	1,31 ± 0,13 ^{bC}
Geada	0,15 ± 0,04 ^{cB}	1,46 ± 0,12 ^{bB}	6,90 ± 0,23 ^{aA}
Breda	0,23 ± 0,01 ^{bB}	3,38 ± 0,03 ^{aA}	4,57 ± 0,85 ^{aB}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobresscritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. QE – expresso como mg/g equivalentes a Quercetina.

Fonte: Próprio autor.

O método de extração dos teores totais de flavonoides sugerido por Gonzalez et al, (2007) mostrou que, entre todos os abacates analisados, os maiores teores foram encontrados nas cascas sendo o da variedade Geada (6,90 mg QE/g). O valor mais alto com exceção da variedade Margarida que apresentou teor mais alto na semente (2,71 mg QE/g) seguido pela casca (1,31 mg QE/g) e polpa (0,40 mg QE/g), Vinha et al. (2013) reportaram que na casca da variedade Algarvia apresentou o valor 0,44 mg QE/g de teor de flavonoides.

De acordo com os resultados, as amostras revelam uma composição fenólica significativamente mais rica em compostos fenólicos simples do que em flavonoides. Assim como os resíduos (casca e semente) apresentaram um teor maior de fenólicos e flavonoides com relação à polpa, o que está de acordo com os dados descritos na literatura.

4.3.18. Carotenoides e clorofila

A partir dos dados apresentados na Tabela 12 para o conteúdo de carotenoides e na Tabela 13 para o teor de clorofila, observou-se que as maiores concentrações (5,92 mg/g) e (11,01 mg/g), foram de carotenóides e clorofila, respectivamente, e os quais estão localizadas na casca da variedade Margarida em relação às variedades Geada e Breda. Estudos anteriores corroboram esse resultado mostrando que a casca é a parte que se encontra os maiores teores desses fitoconstituintes, que segundo Wang et al. (2010) os autores relatam que dentre as oito variedades de abacate avaliadas, o teor de clorofila total chega a ser nove vezes mais alto na casca do que na semente e polpa, assim como o teor de carotenoides totais, o qual atinge oito vezes mais na casca comparado as demais partes do fruto analisada.

Tabela 13 - Teor de carotenóides totais das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedade	Teor de carotenoides totais (mg/g β -caroteno)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	4,02 $\pm$ 0,03 ^{bAB}	2,95 $\pm$ 0,06 ^{cB}	5,98 $\pm$ 0,05 ^{aA}
Geada	3,07 $\pm$ 0,67 ^{bB}	2,55 $\pm$ 0,32 ^{bB}	5,24 $\pm$ 0,57 ^{aA}
Breda	4,79 $\pm$ 0,33 ^{bA}	3,96 $\pm$ 0,52 ^{bA}	5,92 $\pm$ 0,21 ^{aA}

Valores determinados em triplicata (n=3) $\pm$ desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobrescritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com Viana e Kiehl (2010), os pigmentos de clorofila são influenciados pelo estado nutricional das plantas, ou seja, é diretamente proporcional ao fato da planta ser adequadamente suprida com seus respectivos nutrientes onde os carotenoides podem realizar funções durante a fotossíntese, como absorção de luz e ação fotoprotetora e prevenção do dano foto-oxidativo às moléculas de clorofila (Raven et al., 2007).

Tabela 14 - Teor de clorofila total das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda.

Variedades	Teor de clorofila total (mg/g)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	6,09 $\pm$ 0,14 ^{bB}	2,92 $\pm$ 0,07 ^{cB}	11,01 $\pm$ 0,10 ^{aA}
Geada	5,38 $\pm$ 1,05 ^{bB}	1,50 $\pm$ 0,23 ^{cB}	9,43 $\pm$ 1,08 ^{aA}
Breda	8,08 $\pm$ 0,32 ^{bA}	6,34 $\pm$ 1,30 ^{bA}	10,74 $\pm$ 0,46 ^{aA}

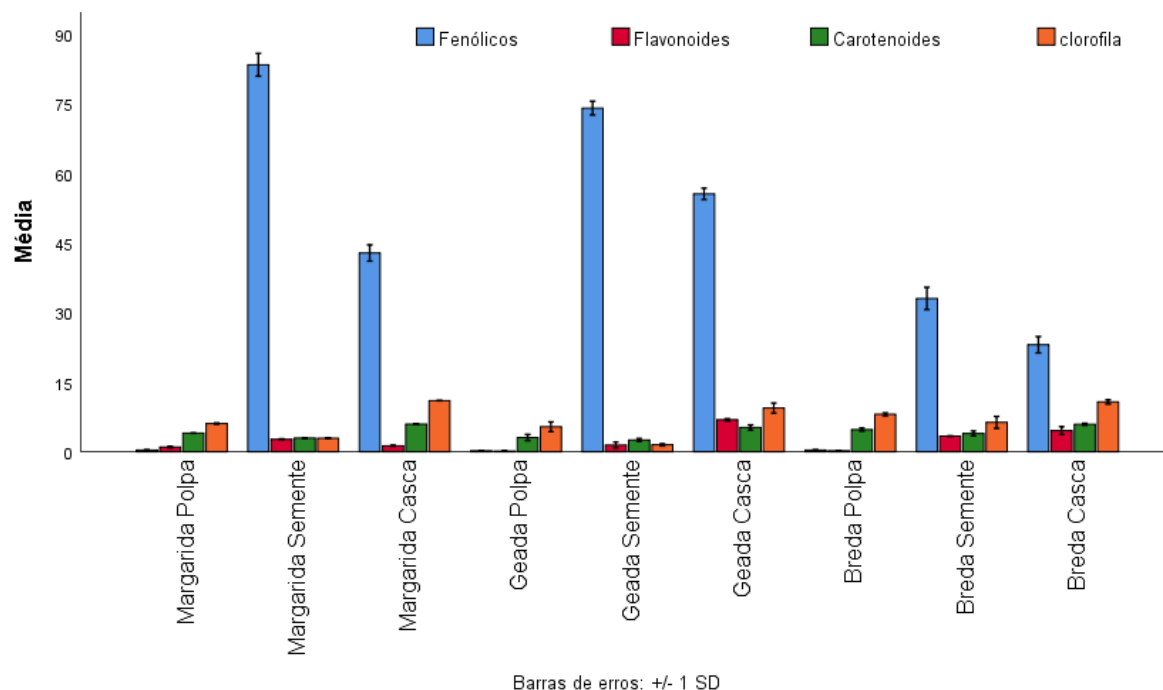
Valores determinados em triplicata (n=3) $\pm$ desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobrescritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Próprio autor.

Para uma melhor compreensão e visualização dos resultados aqui discutidos, na Figura 10 está a representação dos resultados para a avaliação dos compostos bioativos das variedades de abacate estudadas no presente trabalho.

Figura 10 - Resultados para o teor de fenólicos, flavonoides totais, carotenoides e clorofila em polpa casca e semente de diferentes variedades de abacates.



Resultados expressos em: Fenólicos - com Folin-Ciocalteu (mg/g equivalentes ao ácido gálico); Flavonoides – mg/g equivalentes a Quercetina; Carotenoides - mg/g β -caroteno; Clorofila total: mg/g.

Fonte: Próprio autor.

4.6. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante da polpa, semente e casca das diferentes variedades de frutos foram avaliadas por diferentes ensaios não-biológicos tais como ABTS, FRAP e ORAC. O ensaio de sequestro do radical ABTS foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante total dos polifenóis através da medida da redução do radical cátion como a porcentagem de inibição (CHEN et al., 2008).

Para medir o potencial de redução, foi usado o ensaio rápido e confiável de FRAP, onde o antioxidante reage com um complexo FPTZ férrico e produz um complexo de TPTZ ferroso colorido por um redutor em pH baixo (PULIDO et al., 2000). A inibição oxidativa induzida foi determinada por ensaio ORAC e mostra a atividade antioxidante de quebra de cadeia radical por transferência de hidrogênio (Ou et al., 2001; Karadag et al., 2009). O 2,2'-Azobis-(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH), solúvel em água, tem sido amplamente utilizado como iniciador de radicais livres e causador de hemólise nas membranas celulares

(Fadda et al., 2013). Assim, esses métodos são amplamente aceitos para determinar o potencial antioxidante dos extratos vegetais (Murugan et al., 2016).

4.3.19. ABTS• (*ácido 2,2-Azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfônico*)

A Tabela 14 apresenta os resultados referente à atividade antioxidante através do radical ABTS•, os quais apresentaram diferença significativa entre as diferentes partes do fruto estudada, bem como entre as diversas variedades. Conforme os dados verificam-se que as sementes, principalmente da variedade Geada, apresentaram maior atividade com 14,90 $\mu\text{mol TE/g}$, seguido da variedade Breda (6,83 $\mu\text{mol TE/g}$).

De acordo com Moo-Huchin et al. (2014) ao avaliar diversos frutos tropicais os autores revelaram que a capacidade antioxidante medida através da captura do radical livre ABTS• mostrou que as sementes apresentavam os maiores valores para atividade antioxidante. Outros estudos também relatam melhores resultados em casca de abacates como, Rodríguez-Carpena et al. (2011) relatam igualmente que a semente da Variedade Hass possui maior atividade antioxidante (7,89 $\mu\text{mol TE/g}$) que a casca (7,40 $\mu\text{mol TE/g}$) e a polpa (94,05 $\mu\text{mol TE/g}$) no entanto, já na variedade Fuerte a casca apresentou a maior atividade (18,58 $\mu\text{mol TE/g}$) logo após a semente (12,16 $\mu\text{mol TE/g}$) e a polpa (0,78 $\mu\text{mol TE/g}$).

Entre as polpas, a maior atividade foi detectada na variedade Breda (0,62 $\mu\text{mol TE/g}$), sendo a Geada a de menor valor (0,12 $\mu\text{mol TE/g}$). De maneira geral, das três variedades de abacate analisados nesse estudo a Margarida foi a que teve menor atividade antioxidante em todas as partes analisadas na fruta.

Com esses resultados (Tabela 14) e com estudos anteriores fica claro que a polpa é a parte menos interessante na avaliação de captura de radical livre ABTS• apresentando valores baixíssimos nas análises.

Tabela 15 - Atividade antioxidante de extratos etanólicos das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda através do método ABTS•.

Variedade	ABTS• (μmol TE/g)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	0,33± 0,04 ^{bB}	4,07 ± 0,21 ^{aC}	4,45 ± 0,34 ^{aC}
Geada	0,12 ± 0,00 ^{cC}	14,90 ± 0,16 ^{aA}	6,27 ± 0,12 ^{bB}
Breda	0,62 ± 0,03 ^{cA}	6,83 ± 0,14 ^{bB}	11,19 ± 1,72 ^{aA}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobresscritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. TE – expresso como μmol Trolox/100g de amostra.

Fonte: Próprio autor.

4.3.20. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

A Tabela 15 apresenta os resultados da análise da atividade antioxidante através do método de redução do ferro proposto por Thaipong et al. (2006) onde foi observado que as sementes mostraram os maiores valores com a variedade Geada (859,28 μmol TE/g) sendo superior à variedade Margarida (421,44 μmol TE/g) e à variedade Breda (322,11 μmol TE/g) respectivamente.

Soog et al. (2004) ao realizar estudo com diversas frutas, enfatiza que dentre a polpa e as partes não convencionais de consumo, a semente obteve o quarto maior valor na determinação de FRAP (1484,01 μmol TE/g) com valores abaixo representando pela polpa, sendo o menor valor reportado (9,6 μmol TE/g) dentre as frutas analisadas.

Tabela 16 - Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda através do método FRAP.

Variedades	FRAP (μmol TE/g)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	21,21 ± 0,69 ^{cB}	401,45 ± 39,31 ^{aB}	276,20 ± 12,75 ^{bB}
Geada	13,28 ± 1,85 ^{cB}	859,27 ± 5,71 ^{aA}	545,62 ± 7,10 ^{bA}
Breda	148,56 ± 7,85 ^{cA}	322,11 ± 35,55 ^{aB}	263,45 ± 1,55 ^{bB}

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abc} Valores médios seguidos por diferentes letras sobresscritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. TE – expresso como μmol Trolox/g de amostra.

Fonte: Próprio autor.

As polpas das variedades Margarida (21,21 $\mu\text{mol TE/g}$) e Breda (148,56 $\mu\text{mol TE/g}$) apresentaram atividade antioxidante com valores semelhantes e superiores ao da variedade Geada (13,28 $\mu\text{mol TE/g}$). Os teores determinados nas cascas (Tabela 15), apesar de serem menores que os das sementes, se mostram bastante relevantes com 545,62 $\mu\text{mol TE/g}$ na variedade Geada, 282,95 $\mu\text{mol TE/g}$ na variedade Margarida e 263,45 $\mu\text{mol TE/g}$ na variedade Breda,

4.3.21. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

A capacidade de absorção de radicais de oxigênio foi medida através de metodologia proposta por Thaipong et al, (2006) e os resultados encontrados estão expostos na Tabela 16, onde fica comprovado que a semente é a parte do abacate que apresenta a maior atividade antioxidante sendo a variedade Geada (1768,26 $\mu\text{mol TE/g}$) com o maior potencial acima das variedades Margarida (1739,42 $\mu\text{mol TE/g}$) e Breda (486,98 $\mu\text{mol TE/g}$), Agnieszka-Kosińska et al. (2012) reporta valores de ORAC obtidos na semente de 2101,15 $\mu\text{mol TE/g}$ e 3500,20 $\mu\text{mol TE/g}$ nas variedades Hass e Shepard, respectivamente.

Tabela 17 - Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das variedades de abacate Margarida, Geada e Breda através do método do ORAC.

Variedades	ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$)		
	Polpa	Semente	Casca
Margarida	505,59 $\pm$ 20,67 ^{cA}	1739,42 $\pm$ 17,58 ^{aA}	1022,53 $\pm$ 32,76 ^{bB}
Geada	156,58 $\pm$ 23,11 ^{cB}	1768,26 $\pm$ 12,31 ^{aA}	1582,98 $\pm$ 17,45 ^{bA}
Breda	166,29 $\pm$ 25,18 ^{cB}	486,98 $\pm$ 8,81 ^{aB}	353,86 $\pm$ 5,93 ^{bC}

Valores determinados em triplicata (n=3) $\pm$ desvio padrão.

abc Valores médios seguidos por diferentes letras sobrescritas minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. TE– expresso como $\mu\text{mol Trolox/100g}$ de amostra.

Fonte: Próprio autor.

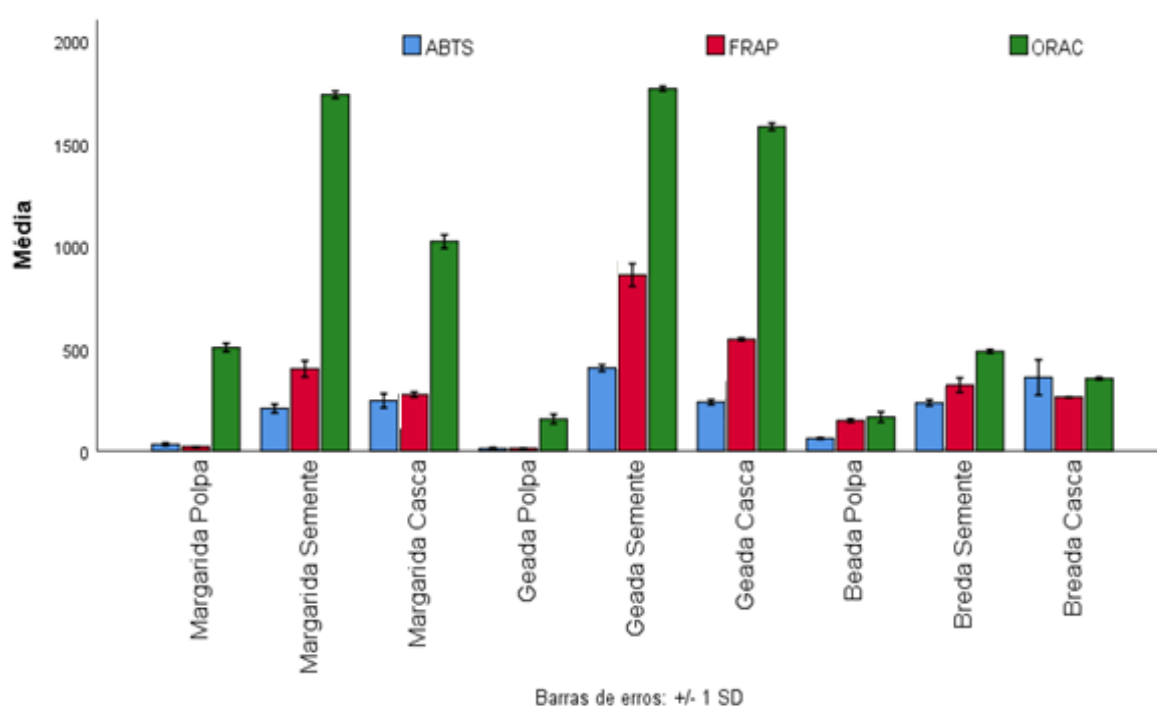
As cascas mostram valores expressivos de capacidade antioxidante (Tabela 16), sendo a variedade Geada maior (1582,98 $\mu\text{mol TE/g}$) que a Margarida (1022,53 $\mu\text{mol TE/g}$) e a Breda (353,86 $\mu\text{mol TE/g}$). Dentre as variedades estudadas, a cultivar Breda foi o que mostrou menor capacidade antioxidante tanto na polpa quanto na casca e semente.

Vale salientar, que compostos bioativos de sementes de abacate agem como doadores de hidrogênio ou elétron e agentes redutores e podem desempenhar um papel significativo contra

o estresse oxidativo, impedindo a oxidação lipídica através de uma reação de quebra de cadeia (Amarowicz, 2007).

Para uma melhor observação quanto à capacidade antioxidante nas diferentes amostras, fica evidente pela Figura 11 que os resultados para as três variedades apresentaram variação quanto aos métodos utilizados, o que deve ser levado em consideração que cada ensaio apresenta um mecanismo de ação.

Figura 11 - Resultados para a capacidade antioxidante em polpa casca e semente de diferentes variedades de abacates.



Resultados expressos para ABTS, FRAP e ORAC das variedades Margarida, Geada e Breda como $\mu\text{mol Trolox/g}$ de amostra.

Fonte: Próprio autor.

4.7. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por LC-MS

A Tabela 17 apresenta as curvas analíticas e coeficientes de correlação para a determinação de compostos fenólicos por LC-MS. Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas e análise das retas (ver APÊNDICES de A à M). Foi possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo. Os coeficientes de correlação (r^2) foram maiores que 0,99, estando de acordo com as orientações da ANVISA (2003) e do INMETRO (2011) que recomendam r^2 igual a 0,99 e

acima de 0,90, respectivamente, O que comprova que o método de UPLC utilizado fornece boa linearidade e adequação para a análise de ácidos fenólicos e flavonoides em amostras de abacate.

Tabela 18 - Parâmetros do MS, curvas de calibração e coeficientes de correlação dos padrões utilizados para identificação e quantificação.

Compostos	Formula molecular	Polaridade de ionização	Fragmentos (m/z)	Energia de colisão (eV)	Tempo de retenção (min)	Equação de calibração*	Coeficiente de correlação (r ²)
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	Negativo	179	15	20,913	Y=1,08e+007X+4,78e+004	0,9956
Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Negativo	289	15	19,364	Y=1,45e+007X+2,68e+004	0,9946
Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Negativo	353	15	18,483	Y=1,15e+007X+2,28e+004	0,9913
Ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	Negativo	163	15	24,53	Y=5,42e+006X+1,04e+004	0,9977
Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Negativo	289	15	20,537	Y=1,35e+007X+4,76e+004	0,9962
Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Negativo	193	15	25,448	Y=1,01e+006X+4,43e+003	0,9963
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	Negativo	169	15	12,522	Y=1,22e+007X+3,59e+004	0,9929
Campeferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Negativo	285	15	35,16	Y=-1,21e+008 X ² +3,73e+007X+4,05e+004	0,9987
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Negativo	259	15	10,336	Y=-1,51e+007X ² +1,43e+006X-1,29e+004	0,9971
Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	Negativo	167	15	21,332	Y=4,52e+005X ² +3,14e+004X+6,12e+001	0,9987
Vanilina	C ₈ H ₈ O ₃	Negativo	151	15	25,071	Y=7,82e+005X-2,17e+003	0,9958
Ácido succínico	C ₄ H ₆ O ₄	Negativo	117	15	10,291	Y=-7,20e+006X ² +2,32e+006X+2,51e+003	0,9963

* Y é o valor da área do pico, X é a concentração do composto padrão.

Os resultados da determinação dos compostos fenólicos individuais presentes nas cascas, polpas e sementes das variedades dos abacates (Margarida, Geada e Breda) são apresentados na Tabela 18. Foi possível identificar doze compostos ao total, os quais apresentaram variações no teor quantitativo, conforme as variedades e as partes do fruto estudado, fornecendo importantes informações na caracterização do perfil fenólico permitindo determinar a presença de compostos de interesse para a aplicação nas diversas áreas com foco aos efeitos benéficos a saúde.

Dentre os compostos analisados a vanilina foi identificado somente na polpa da variedade Margarida em uma concentração de 0,04 mg/mL. Da mesma forma Hurtado-Fernandez et al. (2011) ao analisar doze variedades de abacate encontraram a vanilina apenas nas polpas de duas variedades, a saber Colin V33 (0,021 mg/mL) e Sir Prize (0,062 mg/mL), estando estes valores próximos ao encontrado neste estudo.

A naringenina foi encontrada apenas nas cascas das variedades Margarida e Breda, mas em concentrações que não puderam ser quantificadas, pois estavam abaixo do limite de quantificação (NQ), assim como o ácido gálico, o qual não pôde ser quantificado, no entanto foram identificados em todos os extratos analisados com exceção da polpa e semente da variedade Margarida. Outros estudos reportaram presença da naringenina na polpa das variedades Colin V33, Pinkerton e Sir Prize bem como o ácido gálico na polpa da variedade Sir Prize (HURTADO-FERNANDEZ et al., 2011).

Os compostos ácidos clorogênico e vanílico não foram identificados nas polpas, independente das variedades. Igualmente, López-Cobo et al. (2016) não identificaram a presença destes ácidos nas polpas dos abacates apenas nas sementes e cascas. Soares et al. (2012) analisando as variedades Wagner e Prince encontraram ácido vanílico (0,60 mg/g) e ácido clorogênico (0,79 mg/g) em suas sementes, respectivamente.

Foi possível observar que o ácido cafeíco não foi identificado em nenhuma variedade da semente analisada e sua presença nas outras partes analisadas (polpa e casca) está abaixo do limite de quantificação. Em contrapartida, outras variedades apresentam esse composto em sua semente como nas variedades Wagner (0,24 mg/g) e Prince (0,61 mg/g), assim como nas polpas da variedade Harvest (0,46 mg/g), Lamb Hass (0,54 mg/g), Pinkerton (0,58 mg/g), Sir Prize (0,58 mg/g) e Tacambaro (0,27 mg/g) (LÓPEZ-COBO et al., 2016; HURTADO-FERNANDEZ et al., 2011).

Tabela 19 - Compostos fenólicos da casca, polpa e semente de diferentes variedades de abacate.

Compostos Fenólicos	Margarida (mg/mL)			Geada (mg/mL)			Breda (mg/mL)		
	Polpa	Semente	Casca	Polpa	Semente	Casca	Polpa	Semente	Casca
Catequina	NQ	0,20 ± 0,01 ^d	NQ	NQ	1,92 ± 0,02 ^a	0,96 ± 0,01 ^b	NQ	0,45 ± 0,01 ^c	NQ
Epicatequina	NQ	0,02 ± 0,00 ^f	0,28 ± 0,01 ^d	NQ	0,03 ± 0,01 ^e	1,59 ± 0,01 ^a	NQ	0,31 ± 0,01 ^c	0,47 ± 0,01 ^b
Campeferol	0,02 ± 0,01 ^a	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Naringenina	NI	NI	NQ	NI	NI	NI	NI	NI	NQ
Ácido succínico	1,19 ± 0,01 ^e	0,09 ± 0,00 ^h	2,31 ± 0,01 ^a	1,50 ± 0,01 ^d	0,93 ± 0,02 ^f	1,76 ± 0,13 ^c	0,11 ± 0,01 ^h	0,28 ± 0,01 ^g	1,84 ± 0,01 ^b
Ácido ferúlico	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,76 ± 0,01 ^a
Ácido gálico	NI	NI	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Ácido clorogênico	NI	0,18 ± 0,01 ^a	0,50 ± 0,01 ^c	NI	0,09 ± 0,01 ^e	2,61 ± 0,02 ^a	NI	1,74 ± 0,03 ^b	1,75 ± 0,05 ^b
Ácido cafeico	NQ	NI	NQ	NI	NI	NQ	NQ	NI	NQ
Ácido vanílico	NI	0,08 ± 0,00 ^d	0,09 ± 0,00 ^c	NI	0,16 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,00 ^e	NI	0,19 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^e
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,06 ± 0,00 ^a	NI	NQ	NQ	NQ	0,01 ± 0,00 ^d	0,04 ± 0,01 ^b	NQ	0,03 ± 0,02 ^c
Vanilina	0,04 ± 0,01 ^a	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Σ <i>Compostos Fenólicos</i>	1,31 ± 0,03	1,14 ± 0,02	3,18 ± 0,03	1,50 ± 0,01	3,13 ± 0,07	7,00 ± 0,17	0,15 ± 0,02	2,97 ± 0,07	4,92 ± 0,11

Valores determinados em triplicata (n=3) ± desvio padrão.

^{abcdefgh} Valores médios seguidos por diferentes letras sobrescritas iguais na mesma linha, indicam diferença estatisticamente significativa p < 0,05 pelo teste de Tukey.

NI = Não Identificado; NQ = Não Quantificado pois está abaixo do Limite de Quantificação (0,009±0,002 mg/mL).

Fonte: Próprio autor.

Quanto ao ácido succínico se destaca por ser um dos compostos com uma das maiores concentrações dos analitos (2,311 mg/mL) e por estar presente em todas as espécies de abacate analisadas em quantidades consideravelmente relevantes, principalmente nas cascas.

Da mesma forma, Elena et al. (2011) ao analisarem 13 variedades de abacateiro na Espanha utilizando o método UHPLC-ESI(-)-TOF-MS observaram que o ácido succínico apresentou maior teor em todas as diferentes cultivares de frutos em comparação com outros compostos. Entre as diferentes cultivares, a variedade Colin V33 tem o máximo ácido succínico (171,09 mg/kg de amostra seca).

O ácido succínico é um ácido orgânico dicarboxílico que participa do metabolismo energético em todas as células animais e vegetais como um intermediário do ciclo de Krebs (Weger et al., 2016). É um antioxidante natural que é utilizado em uma série de aplicações na indústria como preparação de solventes, vernizes, perfumes, na fabricação de tintas e corantes, plastificantes e poliésteres. Na indústria alimentícia ele é utilizado na produção de bebidas como refrigerantes e cerveja servindo como aromatizante e neutralizante, assim como suplemento nutricional (Matrka et al., 2017), Já na indústria de medicamentos é aplicado na preparação de agente que combatem a ulcera e de protetores contra a radiação, Ainda há estudos em andamento que sugerem que esse composto estimula o sistema nervoso, melhora o sistema imunológico e tem impacto positivo no coração (Nagy-Szakal, 2018; Kerins, 2017).

Os compostos vanilina (0,04mg/mL) e campeferol (0,02 mg/mL) foram identificados na polpa da variedade Margarida, enquanto o ácido ferúlico foi identificado na casca de fruta Breda (0,76 mg/mL). O composto com maior concentração foi o ácido clorogênico (2,613mg/mL) encontrado na casca do abacate Geada. No entanto, quantidades menores foram observadas nas variedades casca de Margarida (0,50 mg/mL) e Breda (1,75 mg/mL). Da mesma forma Lopez-Cobo et al. (2016) relataram que a casca de abacate da Hass da Espanha possui um bom conteúdo (189,89 mg/100g de matéria seca) de ácido clorogênico que foi determinado por HPLC-DAD-QTOF-MS. A presença desse composto foi identificada somente nas cascas e sementes das amostras analisadas, estando ausente em todas as polpas.

O ácido clorogênico tem como principais fontes o café e frutas variadas onde estudos sugerem a associação do consumo desses alimentos e a prevenção de doenças mostrando uma relação inversa entre esses dois fatores podendo prevenir diabetes, doenças cardiovasculares e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Garambone et al., 2007).

A semente do abacate de variedade Geada (1,92 mg/mL) e a casca (1,592 mg/mL) continham maior catequina e epicatequina, respectivamente. A análise espectrofotométrica também revelou que a casca da variedade Geada possui maiores flavonoides totais. Da mesma

forma, os compostos catequina e epicatequina foram abundantemente encontrados nos diferentes tipos de variedades de abacate da Espanha (Elena et al. 2011).

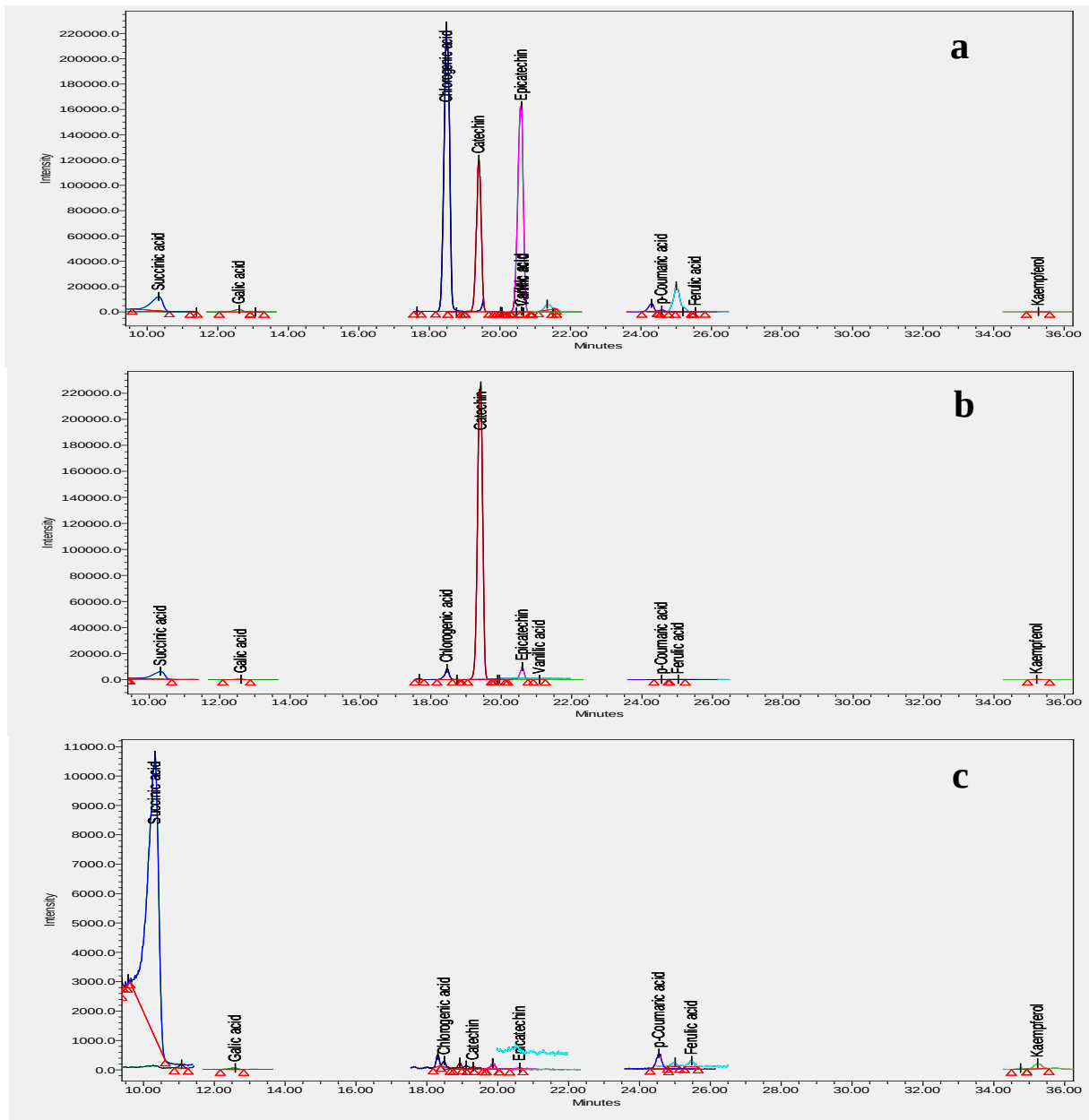
Agnieszka Kosińska et al. (2012), em seu estudo sobre o perfil de compostos fenólicos e antioxidantes de *Persea americana* Mill, das variedades Hass e Shepard, encontraram catequina e epicatequina nas amostras de casca e semente de abacate.

O ácido vanílico foi encontrado em quantidade considerável na semente de Breda (0,19 mg/mL), assim como o ácido vanílico, sendo observado na semente do abacate Hass (6,74 mg/100g de matéria seca) (Lopez-Cobo et al., 2016). Além disso, o ácido vanílico foi observado apenas na cultivar de frutas Sir Prize (6,80 mg/kg amostra seca) entre as diferentes variedades de frutas analisadas (Elena et al., 2011). Da tabela, alguns dos compostos polifenólicos de vanilina, ácido ferúlico, naringenina, ácido gálico e ácido cafeico não foram detectados na condição do instrumento atualmente disponível e apresentaram baixo nível detectado. Da mesma forma, o teor de ácido gálico não foi detectado nas 12 cultivares de abacate exceto Sir Prize (8,61 mg/kg de amostra seca), enquanto vanilina, ácido ferúlico, naringenina e ácido cafeico foram observadas apenas em algumas variedades (Elena et al. 2011). O ácido *p*-cumárico (0,06 mg/mL) foi obtido em polpa de frutas da variedade Margarida, além disso, a polpa de abacate Hass também apresentou maior conteúdo de ácido *p*-cumárico (Lopez-Cobo et al., 2016). Recentemente, Bruno et al. (2018) demonstraram a presença de compostos polifenólicos nos subprodutos de abacate de Portugal, utilizando análises HPLC-DAD/ESI-MS.

Com exceção do ácido succínico todos os compostos estão ausentes ou em concentrações muito baixas na polpa de todas as variedades mostrando que a parte mais consumida dessa fruta não possui uma presença muito forte de compostos fenólicos.

As Figuras 12, 13 e 14 apresentam os espectros de massas obtidos na análise da sequência de padrões na casca, semente e polpa das variedades de abacate (Geada, Breda e Margarida). Os extratos foram injetados com ionização negativa e no modo SIM, onde cada composto foi monitorado de forma individual e simultânea com um canal de aquisição de dados específico dos compostos que monitoram sua massa e tempo de retenção para cada um dos padrões.

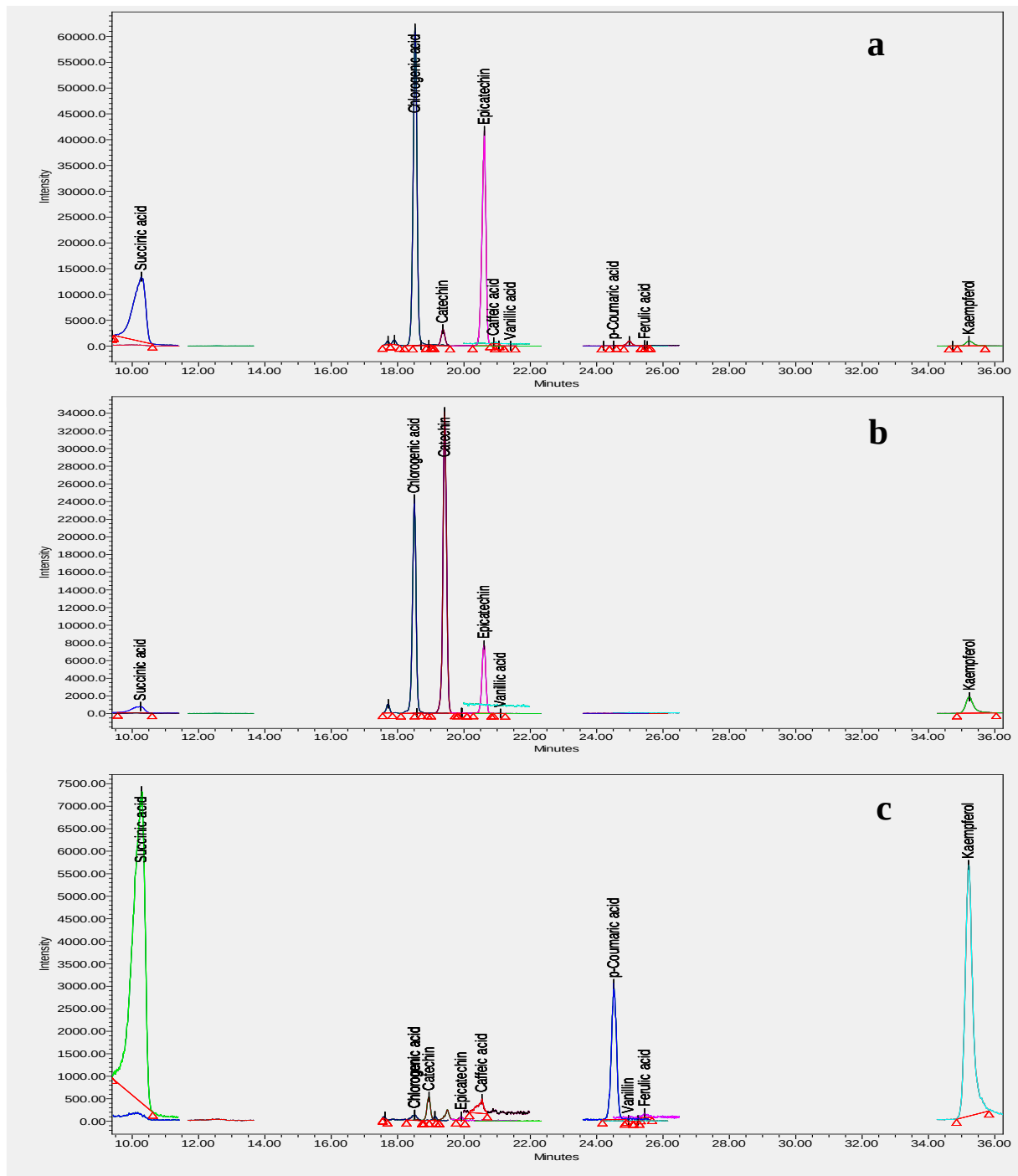
Figura 12 - Espectro de massas no modo SIM da variedade Geada.



Fonte: próprio autor

a:casca, b:semente, c:polpa

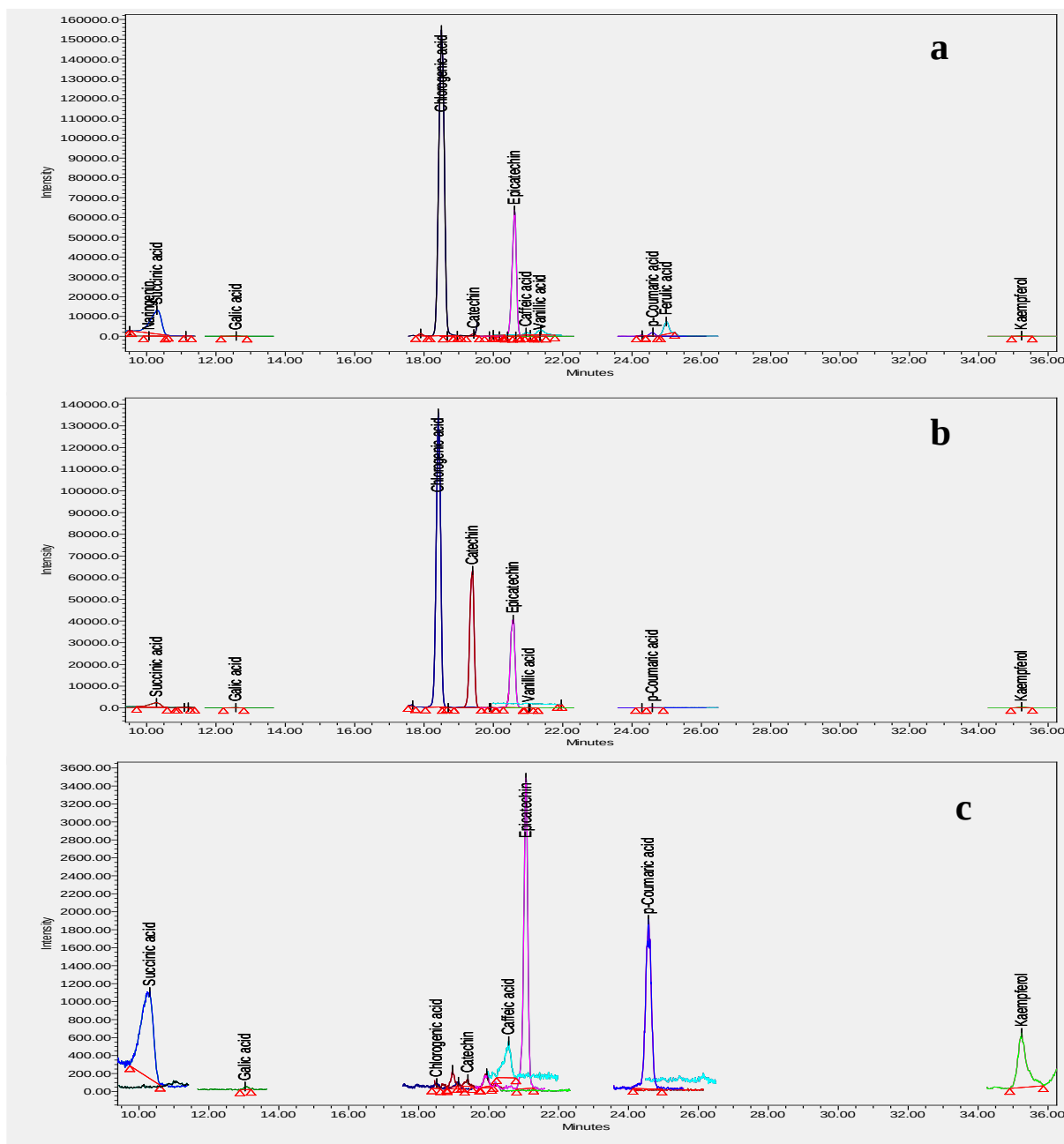
Figura 13 - Espectro de massas no modo SIM da variedade Margarida.



Fonte: próprio autor

a:casca, b:semente, c:polpa

Figura 14 - Espectro de massas no modo SIM da variedade Breda.



Fonte: próprio autor

a:casca, **b:**semente, **c:**polpa

6. CONCLUSÕES

Levando em conta as condições do trabalho desta pesquisa, conclui-se que a partir da caracterização físico-química da casca, polpa e semente das três variedades do abacate revelou que, esta fruta possui alto teor de umidade em todas as partes analisadas com exceção da variedade Margarida a qual teve os valores mais baixos principalmente na polpa (36,31%) e casca (34,68%). O maior teor de sólidos solúveis foi observado nas sementes e o menor teor na polpa da variedade Geada. O pH nas diferentes partes estudadas mostrou-se levemente ácido e com baixa acidez titulável sendo a maior na polpa da variedade Breda e menor valor na casca da variedade Geada. Os maiores teores de lipídios foram observados na polpa e nos resíduos da variedade Breda e assim esta apresenta maior potencial para extração de óleo. Com relação à textura, a casca apresentou maior rigidez em todas as variedades, além de apresentar uma maior luminosidade e proximidade à coloração verde comparando-se às polpas.

Nas sementes foram encontrados os maiores teores de fenólicos destacando as variedades Margarida e Geada sendo 83,38 mg GAE/g e 74,04 mg GAE/g, respectivamente enquanto as polpas se mostraram pobres em conteúdos fenólicos. Já para o teor de flavonoides, as cascas das variedades Breda e Geada obtiveram os melhores resultados enquanto a semente da variedade Margarida apresentou maior teor que a casca e a polpa.

Ao analisar a atividade antioxidante foi observado que as polpas de todas as variedades demonstraram os menores valores de ABTS, FRAP e ORAC, enquanto as sementes apresentaram os melhores resultados destacando-se a variedade Geada que teve o maior teor em comparação às variedades Margarida e Breda.

Após a padronização das metodologias de extração e análise de compostos fenólicos no LC-MS foi possível identificar doze compostos fenólicos, onde se destacou a presença do ácido clorogênico com uma maior concentração na casca da variedade Geada. No entanto, o ácido succínico estava presente na polpa, semente e casca de todas as variedades tendo seu maior conteúdo na casca da variedade Margarida.

A partir deste estudo pode-se afirmar que o abacate possui alto valor nutricional com características atrativas sendo boa fonte de antioxidantes naturais e assim apresenta grande potencial de aproveitamento tanto da sua polpa quanto da casca e semente.

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G.O.; KUMAR, M.N.; GOPALAKRISHNA, A.G.; VARDARAJ, M.C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. **Antioxidants and lipid oxidation in food a critical appraisal**. Journal of Food Science and Technology, v, 35, p, 283-298, 1998.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. **Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update**. Am J Reprod Immunol. 2008, 59(1):2-11.
- AGNIESZKA, K., KARAMAC, M., ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T., BARTOLOMÉ, B.; DYKES, G. A. (2012), **Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill, Peels and Seeds of Two Varieties**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 4613–4619.
- AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**, São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2012, p,124.
- AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. **Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism**, Nutrition, New York: v, 18, n, 1, p, 75-81, 2002.
- ALMEIDA, G.V. B. **Mercado Atacadista de Abacate e Avocado**, (CEAGESP) III Simpósio Nacional de Abacate e Avocado, Bauru, 2015,
- ANDRADE, J.K.S.; DENADAI, M.; OLIVEIRA, C.S.; NUNES, M.L.; NARAIN, N.; **Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region**, Food Research International, 2017.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2004 a 2015, DISPONÍVEL EM: http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eo_edicao/4/2015/03/20150301_106c8c2f1/pdf/4718_2015fruticultura.pdf, acessado em 22/08/17,
- AOAC, **Association of Official Analytical Chemists**, Official Methods of Analysis International, 17 ed, Washington, 2000,
- ARAÚJO, R.G. et al, Avocado by-products: Nutritional and functional properties, **Trends in Food Science & Technology**, 2018.

ASSUNÇÃO, A.C.M. **Atividade antioxidante da casca da pêra abacate (*Persea americana*) e identificação dos seus compostos**. Dissertação (Mestrado), Universidade De Lisboa, 2016.

AYALA-ZAVALA, J.F.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J.A.; SIDDIQUI, et al, (2011), **Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives**, Food Research International, 44(7), 1866–1874.

BAKER, J.; **Mass Spectrometry**, John Wiley & Sons, Chichester, England, 1999, 509p.

BALASUNDRAM, N. et al. **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potencial uses**, Food Chemistry, Barking, v,99, p,191-203, 2006.

BARRET, D.M.; SOMOGYI, L.P; RAMASWAMY, H.S. **Processing fruits: science and technology**, 2nd ed., Boca Raton: CRC, 2005, 841p.

BONELLA, J.A. **Classificação de abacates na CEAGESP**, José Alcides Bonella ME, 2013,

BORGES, C.D.; MENDONÇA, C.R.B.; RODRIGUES, P.V.; ALVES S.S.; DORNELES, T.S.; KRINGEL, A.L. **Características físicas e químicas de abacates das variedades Margarida e Breda**, X CIGR section IV International Technical Symposium, Outubro de 2016

BRANDT, M.A.; SKINNER, E.Z.; COLEMAN, J.A. **Texture profile method**, Journal of Food and Science, v, 28, p, 404-409, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity**, Lebensmittel-Wissenschaft & Technology, v, 28, p, 25-30, 1995.

BRUNINI, M.A. **Conservação pós-colheita de abacate através do uso de tratamentos protetores e embalagens associados a armazenamento sob baixa temperatura**, Ituverava: FAFRAM/FEI, 2002, 530p.

BURNS, J. et al. **Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification**, J, Agric, Food Chemistry, Chicago: v,49, p, 5797-5808, 2001.

CECH, N.B.; ENKE, C.G. **Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals**. Mass Spectrom, Reviews, v,20, p,362-387, 2001.

CHRISTEN, Y. **Oxidative stress and Alzheimer's disease**. American Journal of Clinical Nutrition, v, 71, n, 2, p, 621S-629S, 2000.

CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. **Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori***, Process Biochem, v, 40, p, 809-816, 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**, Editora da UNICAMP, 2006.

CORREIA, R.C.; ARAUJO, J.L.P.; MOUCO, M.A. do C.; BRAGA, C.A.; MENDONÇA, R.F. **Abacate: preferências e mercado**, CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, p21, 2010.

DABAS, D.; SHEGOG, R.M.; ZIEGLER, G.R.; LAMBERT, J.D. (2013), **Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals**, Current Pharmaceutical Design, 19(34), 6133–6140.

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

DONADIO, L.C. **Abacate para exportação: aspectos técnicos da produção**, Brasília: Frupe, MAPA, 1995, 53 p.

DONADIO, L.C.; FERRARI, L.; AVILÉS, T.C.; Abacate, In: DONADIO, L.C. **História da Fruticultura Paulista**, Jaboticabal: SBF – Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010, P 33-63.

DZIRI, S.; HASSEN, I.; FATNASSI, S.; MRABET, Y.; CASABIANCA, H.; HANCHI, B.; HOSNI, K. **Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var, *odoratissimum*)**. Journal of Functional Foods, v, 4, p, 423–432, 2012.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. **Possíveis Benefícios Do Ácido Clorogênico à Saúde**, Alim, Nutr., Araraquara; v,18, n,2, p, 229-235, abr./jun, 2007.

GÓMEZ, F.; SÁNCHEZ, S.; IRADI, M.; AZMAN, N.; ALMAJANO, M. (2014), **Avocado Seeds: Extraction Optimization and Possible Use as Antioxidant in Food**, *Antioxidants*, 3(2), 439–454.

GONZALEZ-AGUILAR, G.A.; VILLEGAS-OCHOA, M.A.; MARTINEZ-TELLEZ, M.A.; GARDEA, A.A.; AYALA-ZAVALA, J.F. **Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C**. *Journal of Food Science*, v, 72, p, 197–202, 2007.

GOUVEIA, H.L.; SCHAUN, J.S.; MASKE, A.; SCHEIK, L.K.; BORGES, C.D.; MENDONÇA, C.R.B. **Abacate da variedade Breda: características físico-químicas e teor de lipídios**. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR: ALIMENTAÇÃO E SAÚDE, 5., 2015, Bento Gonçalves, **Anais...**, Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA-RS, 2015, Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/gerenciador/painel/trabalhosversaofinal/SAL169.pdf>>, Acesso em: 17 jul, 2017.

HEIDEMANN, C.; SCHULZE, M.B.; FRANCO, O.H.; VAN DAM, R.M.; MANTZOROS, C.S.; Hu, F.B. **Dietary patterns and risk of mortality from cardiovascular disease, cancer, and all causes in a prospective cohort of women**, *Circulation*, 2008, 118(3):230-7.

HORTIESCOLHA, **Hortipedia - Abacate**, Piracicaba: Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; São Paulo: Centro de Qualidade em Horticultura da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.hortiescolha.com.br/hortipedia/produto/abacate>>, Acesso em: 7 maio 2018.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos**. *Alim, Nutr*, ISSN 0103-4235, Araraquara v,19, n,1, p, 97-108, jan./mar, 2008.

HURTADO-FERNANDEZ, E.; PACCHIAROTTA, T.; GOMEZ-ROMERO, M.; SCHOENMAKER, B.; DERKS, R.; DEELDER, A.M.; MAYBORODA, O.A.; CARRASCO-PANCORBO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. **Ultra high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry for analysis of avocado fruit metabolites: Method evaluation and applicability to the analysis of ripening degrees**. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 7723– 7738.

INSTITUTO ADOLF LUTZ, **Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz**, 4 ed, São Paulo: Instituto Adolf Lutz, 2008.

JIMÉNEZ-ARELLANES, A., LUNA-HERRERA, J., RUIZ-NICOLÁS, R., CORNEJO-GARRIDO, J., TAPIA, A., & YÉPEZ-MULIA, L. (2013). **Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds**. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13:109, 1–5.

KANG, J.; XIE, C.H.; LI, Z.M.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A.G.; WU, X.L.; WU, T. **Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities**. Food Chemistry, v, 128, p, 152–157, 2011.

KARAKAYA, S. **Bioavailability of Phenolic Compounds**. Critical Rev, Food Sci, Nutr,, Boca Raton, v, 44, n, 6, p, 453-64, 2004.

KERINS, M.J.; VASHISHT, A.A.; LIANG, B.X.; DUCKWORTH, S.J.; PRASLICKA, B.J.; WOHLSCHLEGEL, J.A.; OOI, A. **Fumarate Mediates a Chronic Proliferative Signal in Fumarate Hydratase-Inactivated Cancer Cells by Increasing Transcription and Translation of Ferritin Genes**. US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2017.

KOLLER, O.C. **Abacate: produção de mudas, instalação e manejo de pomares, colheita e pós-colheita**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2002, 145 p.

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

LANÇAS, F.M. **A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?**. Scientia Chromatographica, 2009, v, 1, n, 2.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. **Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties**. Food Chemistry, v, 91, n, 1, p, 131-137, 2005.

LEITE, J.J.G.; BRITO, É.H.S.; CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.N.; SIDRIM, J.J.C.; BERTINI, L.M.; ROCHA, M.F.G. (2009). **Chemical composition, toxicity and larvicidal**

and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42(2), 110–113.

LICHTENTHALER, H.K. **Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes.** Methods in enzymology, San Diego, v, 148, p, 362-385, 1987.

LÓPEZ-COBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; PASINI, F.; CABONI, M.F.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. (2016). **HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado.** LWT - Food Science and Technology, 73, 505–513.

MAKRIS, D.P. et al. **Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts.** Journal of Food Composition and Analysis, San Diego, v,20, p,125-132, 2007.

MATRKA, M.C.; WATANABE, M.; MURALEEDHARAN, R.; LAMBERT, P.F.; LANE, A.N.; ROMICK-ROSENDALE, L.E.; WELLS, S.I. **Overexpression of the human DEK oncogene reprograms cellular metabolism and promotes glycolysis.** US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2017.

McCORD, J.M. **Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition.** Food Technology, v, 48, n, 3, p, 106-110, 1994.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. **Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos.** Bol, SBCTA, Campinas: v,36, n, 1, p, 1-11, 2002.

MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. **Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues.** Ciência Rural, Santa Maria, v,41, n,6, p,1088-1093, jun, 2011.

MIYAOKA, M.F. **Avaliação do potencial dos fungos do gênero *rhizopus spp* na produção de substâncias bioativas com ação antioxidante utilizando diferentes substratos.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2012.

MONAGAS, M.; BARTOLOME, B.; GOMEZ-CORDOVES, C. **Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v,45, n,2, p,85–118, 2005.

MOO-HUCHIN, V.M.; ESTRADA-MOTA, I.; ESTRADA-LÉON, R.; CUEVAS-GLORY, L.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E.; VARGAS, M.de L.V.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURIDUCH, E. **Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico.** Food Chemistry, v, 152, p, 508–515, 2014.

MOO-HUCHIN, V.M.; MOO-HUCHIN, M.I.; ESTRADA-LEON, R.J.; CUEVAS-GLORY, L.; ESTRADA-MOTA, I.A.; ORTIZ-VAZQUEZ, E.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURIDUCH, E. **Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico.** Food Chemistry, v, 166, p, 17–22, 2015.

NAGY-SZAKAL, D.; BARUPAL, D.K.; LEE, B.; CHE, X.; WILLIAMS, B.L.; KAHN, E.J.R.; UKAIGWE, J.E.; BATEMAN, L.; KLIMAS, N.G.; KOMAROFF, A.L.; LEVINE, S.; MONTOYA, J.G.; PETERSON, D.L.; LEVIN, B.; HORNIG, M.; FIEHN, O.; LIPKIN, W.I. **Insights into myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome phenotypes through comprehensive metabolomics.** US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2018.

NEVEU, V.; PEREZ-JIMÉNEZ, J.; VOS, F.; CRESPIY, V.; DU CHAFFAUT, L.; MENNEN, L. **Phenol-Explorer: An online comprehensive database on polyphenol contents in foods,** Database, 2010.

NIESSEN, W.M.A. **“Liquid Chromatography-Mass Spectrometry”.** Third Edition (Chromatographic Science), Boca Raton: CRC Press, 2006.

NOGUEIRA-DE-ALMEIDA, C.A.; UED, F.V.; NOGUEIRA DE ALMEIDA, C.C.J.; ALMEIDA, A.C.F.; CIAMPO, L.A.D.; FERRAZ, I.S.; SILVA, L.F.O.; ZAMBOM, C.R.; OLIVEIRA, A.F. **Perfil nutricional e benefícios do azeite de abacate (*Persea americana*): uma revisão integrativa.** Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, v, 21, e2017214, 2018.

OLIVEIRA, M.S.; BADIALE-FURLONG E. **Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts.** World Mycotoxin Journal, 2008, 1(2): 1-10.

OLIVEIRA, A.L.; BRUNINI, M.A.; VISICATO, M.L.; SIQUEIRA, A.M.F.; VARANDA, D.B. **Atributos físicos em abacates (*Persea americana* L.) provenientes da região de Ribeirão Preto – SP.** Revista Nucleus, v,1, n,1, out./abr, 2003.

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

PARK, Y.K. et al. **Biotransformação de isoflavonas de soja,** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, Brasília: n, 20, p, 12-14, 2001.

PATIL, B.S.; JAYAPRAKASHA, GK.; CHIDAMBARAMURTHY, K.N.; VIKRAM, A.; **Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities, and challenges.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v, 57, p, 8142–8160, 2009.

Programa Brasileiro para a Modernização da Horticultura. Normas de classificação abacate *Persea americana* Mill; V, 13 N,1, 2015.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. **Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, v, 48, p, 3396-3402, 2000.

RODRÍGUEZ-CARPENA. J.G.; MORCUENDE, D.; ANDRADE, M.; KYLLI, P.; ESTEVEZ, 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.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** Food Chemistry, 2005, p235–254.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. **Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety.** Annual Review of Nutrition, v, 22, p, 19–34, 2002.

SALGADO, J.M.; DANIELI, F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; FRIAS, A.; MANSI, D.N. **O óleo de abacate (*Persea americana* Mill) como matéria-prima para a indústria alimentícia.** Food Science and Technology, v, 28, n, 1, p, 20-26, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. **A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 76, 270.

SCHRECKINGER, M.E.; LOTTON, J.; LILA, M.A.; DE MEJIA, E.G. **Berries from South America: A comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization.** Journal of Medicinal Food, v, 13, p, 233–246, 2010.

SELLAPPAN, S., AKOH, C.C.; KREWER, G. (2002) **Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2432-2438.

SHAHIDI, F. **Natural Antioxidants: An Overview in Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications.** AOCS Press: Champaign, Illinois, p, 1-11, 1996.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications,** Lancaster: Technomic, 1995, 331 p.

SHETTY, K.; CURTIS, O.F.; LEVIN, R.E.; WITKOWSKY, R.; ANG, W. **Prevention of verification associated with in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp.** Journal of Plant Physiology, v, 147, p, 447–451, 1995.

SHORI, A.B.; BABA, A.S. **Comparative antioxidant activity, proteolysis and in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibition of *Allium sativum*-yogurts made from cow and camel Milk.** Journal of Saudi Chemical Society, v, 18, p, 456–463, 2014.

SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura.** São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1998, 530p, p, 147-169.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental.** 5ª, Ed., 2002.

SOARES, S.E.; **Ácidos fenólicos como antioxidantes.** Revista de Nutrição, Campinas, 15(1):71-81, jan./abr., 2002.

SOONG, Y.Y., BARLOW, P.J. (2004). **Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds.** Food Chemistry, 88(3), 411–417.

STEAT, T.H.; MANSOOR, M.A.; WANDEL, M.; UGLEM, S.; FROLICH, W. **Changes in predictors and status of homocysteine in young male adults after a dietary intervention with vegetables, fruits and bread.** Eur J Nutr., 2008, 47(4):201-9.

SVILAAS, A. **Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans.** Journal of Nutrition, v, 134, n, 3, p, 562-567, 2004.

TANGO, J.S.; TURATTI, J.M. **Óleo de abacate, In: ABACATE – cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos.** Campinas: ITAL, 1992, p, 156-192.

TEIXEIRA, C.G. Cultura, **In: ITAL – INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (Campinas), Abacate: Cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos.** 2, Ed Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1995, Cap, 1, p, 1-54, (Frutas Tropicais).

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BURNE, D.H. **Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts.** Journal of Food Composition and Analysis, v, 19, p, 669–675, 2006.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. **Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.** Mol Cell Biochem, 2004, 266(1-2):37-56.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(1):44-84.

WANG, W.; BOSTIC, T.R.; GU, L. **Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivar.,** Food Chemistry 122 (2010) 1193–1198.

WEBB, K.; BRISTOW, T.; SARGENT, M.; STEIN, B. **Methodology for Accurate Mass Measurement of Small Molecules – Best Practice Guides.** LGC Limited, 2004.

WEGER, B.D.; WEGER, M.; GÖRLING, B.; SCHINK, A.; GOBET, C.; KEIME, C.; POSCHET, G.; JOST, B.; KRONE, N.; HELL, R.; GACHON, F.; LUY, B.; DICKMEIS, T. **Extensive Regulation of Diurnal Transcription and Metabolism by Glucocorticoids**. US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2016.

WETTASINGHE, M.; BOLLING, B.; PLHAK, L.; PARKIN, K. **Screening for Phase II Enzyme inducing and antioxidant activities of common vegetables**. Journal of Food Science, v, 67, n, 7, p, 2583-2588, 2002.

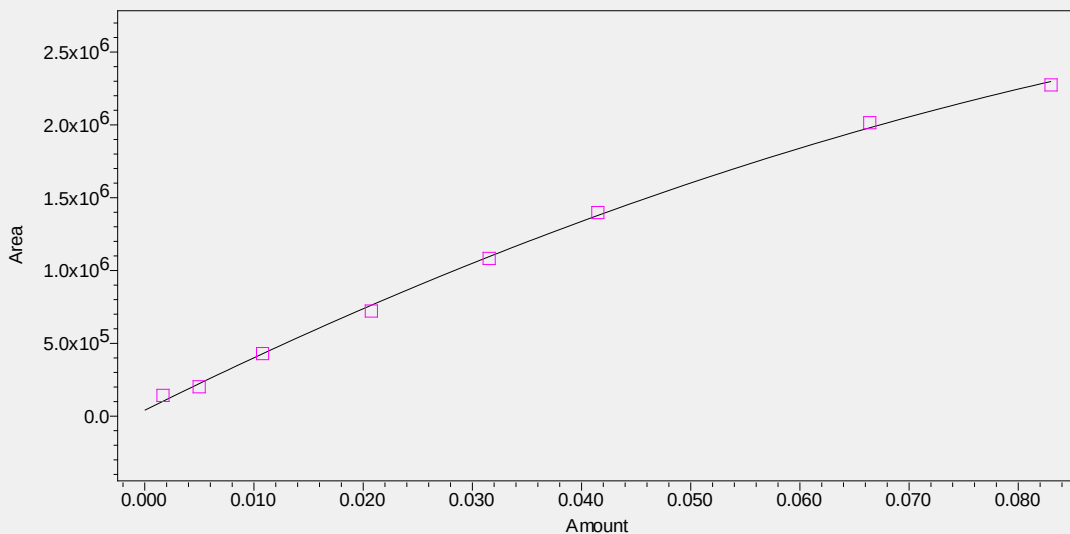
YASIR, M., DAS, S., KHARYA, M. (2010). **The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill**. Pharmacognosy Reviews, 4(7), 77.

YILDRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. **Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L, extracts**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v,49, n,8, p,4083-9, 2002.

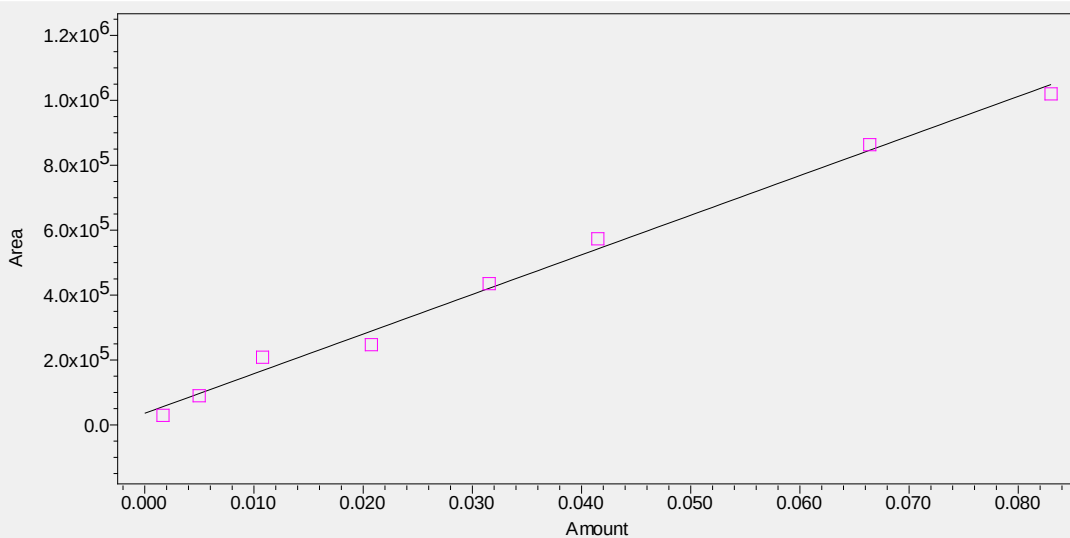
APÊNDICES

APÊNDICE A – PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRÇÕES DOS PADRÕES UTILIZADOS.

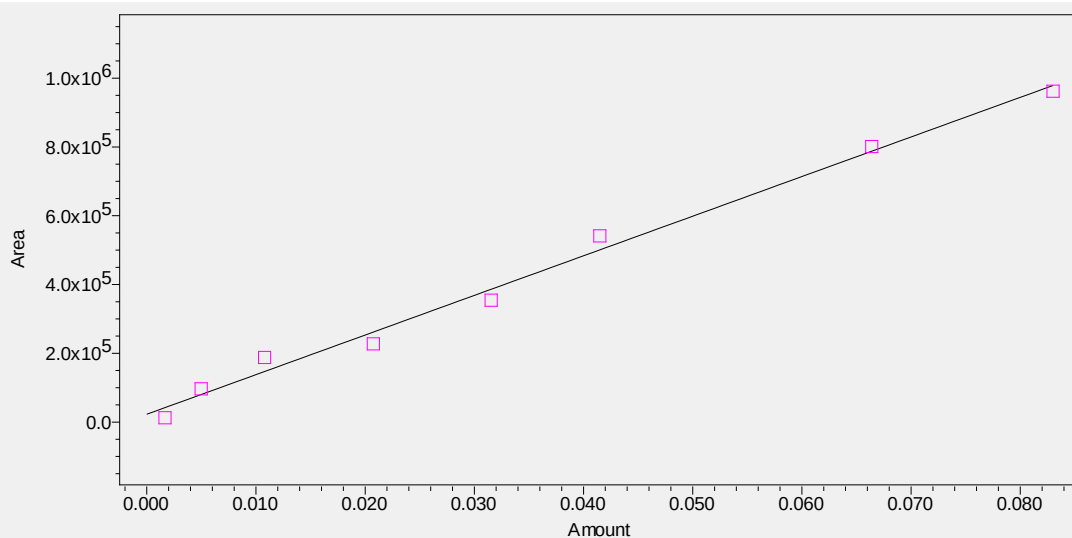
Nome	A	B	C	R	R ²	Equação	Tipo de regressão	Pontos	Unidade	Tempo de retenção
Campeferol	4,05E+04	3,73E+07	-1,21E+08	0,9993	0,9987	$Y = -1,21e+008 X^2 + 3,73e+007 X + 4,05e+004$	Quadrática (2° Ordem)	8	mg/mL	35,16
Ácido Gálico	3,59E+04	1,22E+07	0,00E+00	0,9964	0,9929	$Y = 1,22e+007 X + 3,59e+004$	Linear (1° Ordem)	8	mg/mL	12,522
Ácido Clorogênico	2,28E+04	1,15E+07	0,00E+00	0,9956	0,9913	$Y = 1,15e+007 X + 2,28e+004$	Linear (1° Ordem)	8	mg/mL	18,483
Catequina	2,68E+04	1,45E+07	0,00E+00	0,9973	0,9946	$Y = 1,45e+007 X + 2,68e+004$	Linear (1° Ordem)	8	mg/mL	19,364
Epicatequina	4,76E+04	1,35E+07	0,00E+00	0,9981	0,9962	$Y = 1,35e+007 X + 4,76e+004$	Linear (1° Ordem)	8	mg/mL	20,537
Ácido Cafeico	4,78E+04	1,08E+07	0,00E+00	0,9978	0,9956	$Y = 1,08e+007 X + 4,78e+004$	Linear (1° Ordem)	8	mg/mL	20,913
Ácido Vanílico	6,12E+01	3,14E+04	4,52E+05	0,9994	0,9987	$Y = 4,52e+005 X^2 + 3,14e+004 X + 6,12e+001$	Quadrática (2° Ordem)	8	mg/mL	21,332
Ácido Cumárico <i>p</i> -	1,04E+04	5,42E+06	0,00E+00	0,9988	0,9977	$Y = 5,42e+006 X + 1,04e+004$	Linear (1° Ordem)	8	mg/mL	24,53
Ácido Succinico	2,51E+03	2,32E+06	-7,20E+06	0,9981	0,9963	$Y = -7,20e+006 X^2 + 2,32e+006 X + 2,51e+003$	Quadrática (2° Ordem)	8	mg/mL	10,291
Vanilina	-2,17E+03	7,82E+05	0,00E+00	0,9979	0,9958	$Y = 7,82e+005 X - 2,17e+003$	Linear (1° Ordem)	8	mg/mL	25,071
Naringenina	-1,29E+04	1,43E+06	-1,51E+07	0,9986	0,9971	$Y = -1,51e+007 X^2 + 1,43e+006 X - 1,29e+004$	Quadrática (2° Ordem)	7	mg/mL	10,336
Ácido Ferúlico	4,43E+03	1,01E+06	0,00E+00	0,9982	0,9963	$Y = 1,01e+006 X + 4,43e+003$	Linear (1° Ordem)	8	mg/mL	25,448

APÊNDICE B – CURVA PADRÃO DE CAMPEFEROL

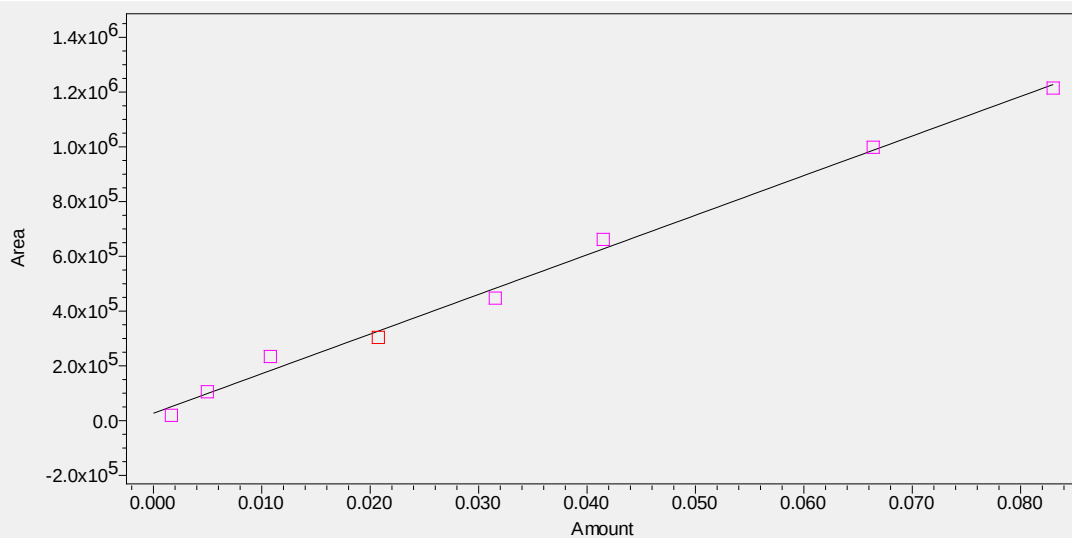
Fonte: próprio autor

APÊNDICE C – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GALICO

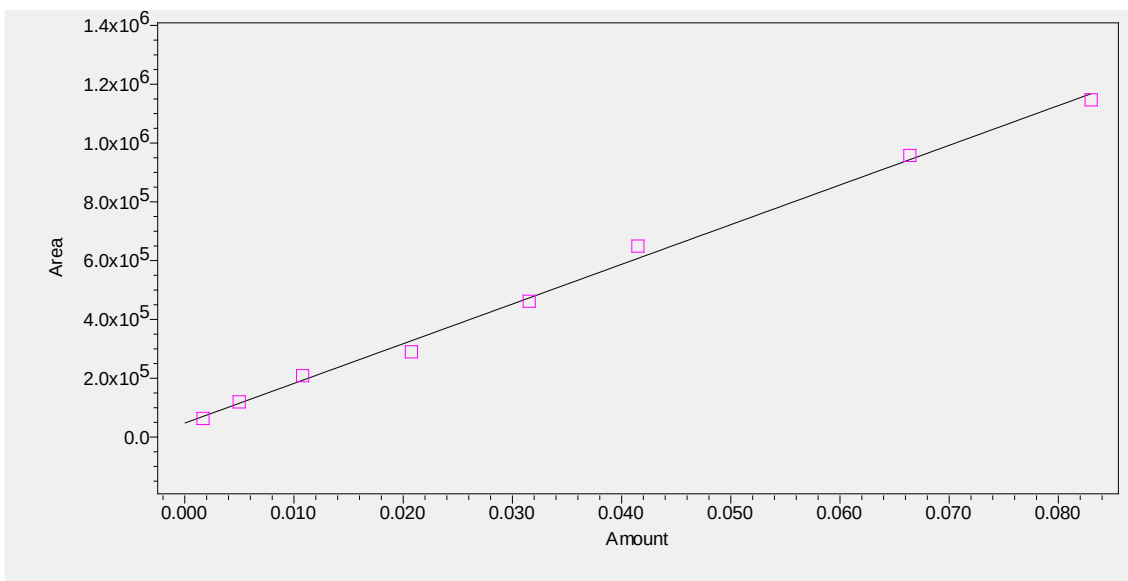
Fonte: próprio autor

APÊNDICE D – CURVA PADRÃO DE ACIDO CLOROGÊNICO

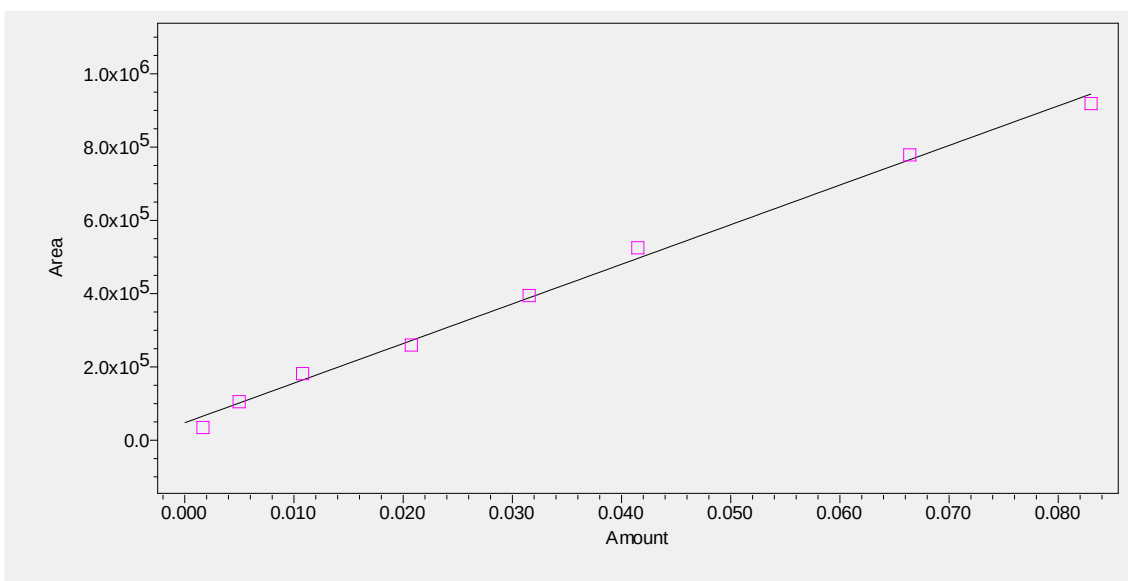
Fonte: próprio autor

APÊNDICE E – CURVA PADRÃO DE CATEQUINA

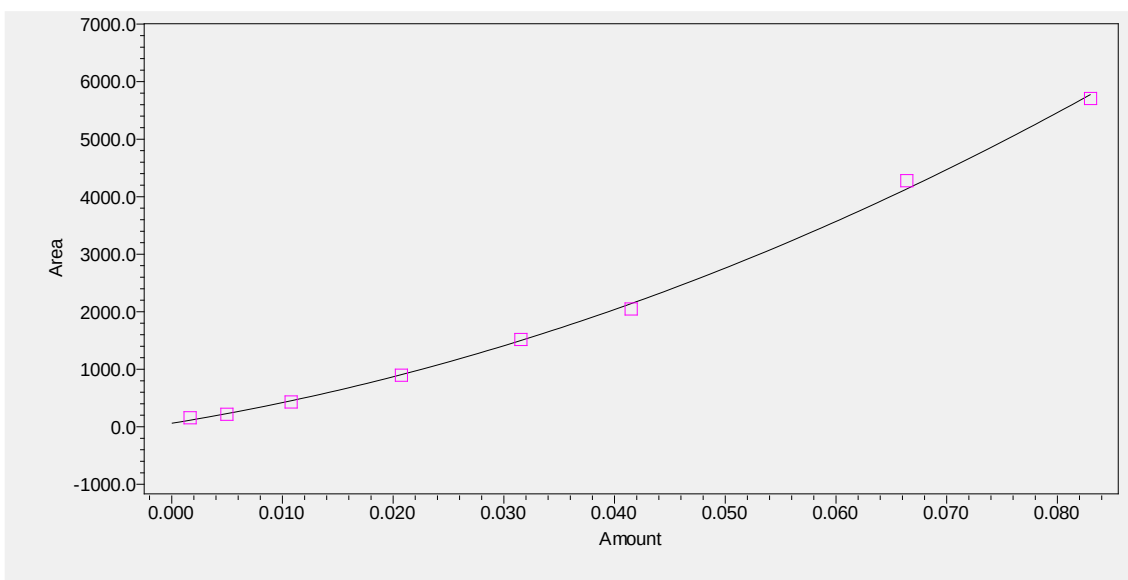
Fonte: próprio autor

APÊNDICE F – CURVA PADRÃO DE EPICATEQUINA

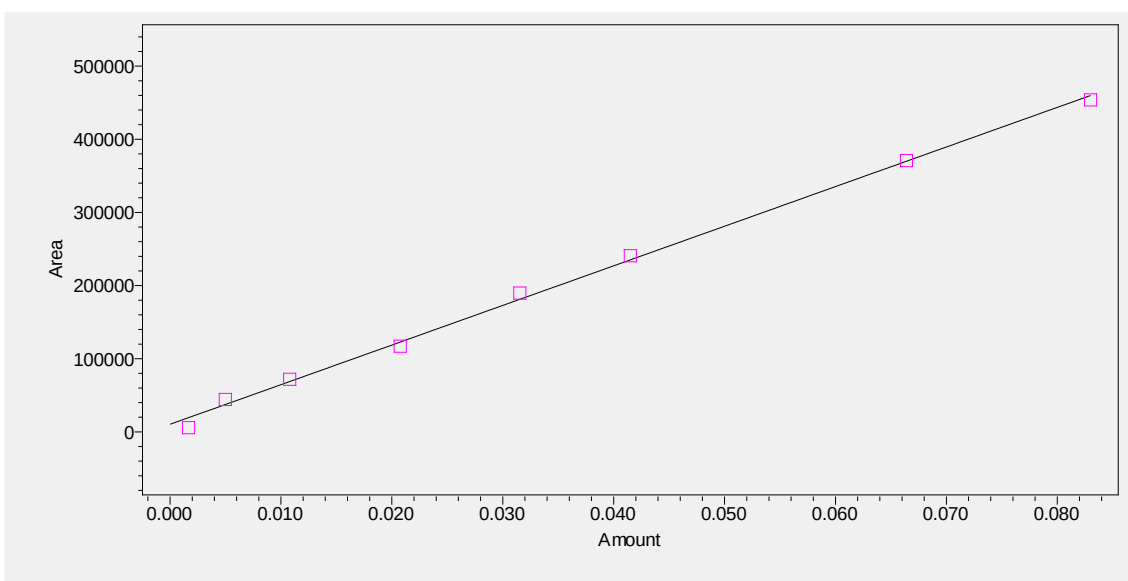
Fonte: próprio autor

APÊNDICE G – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO CAFEICO

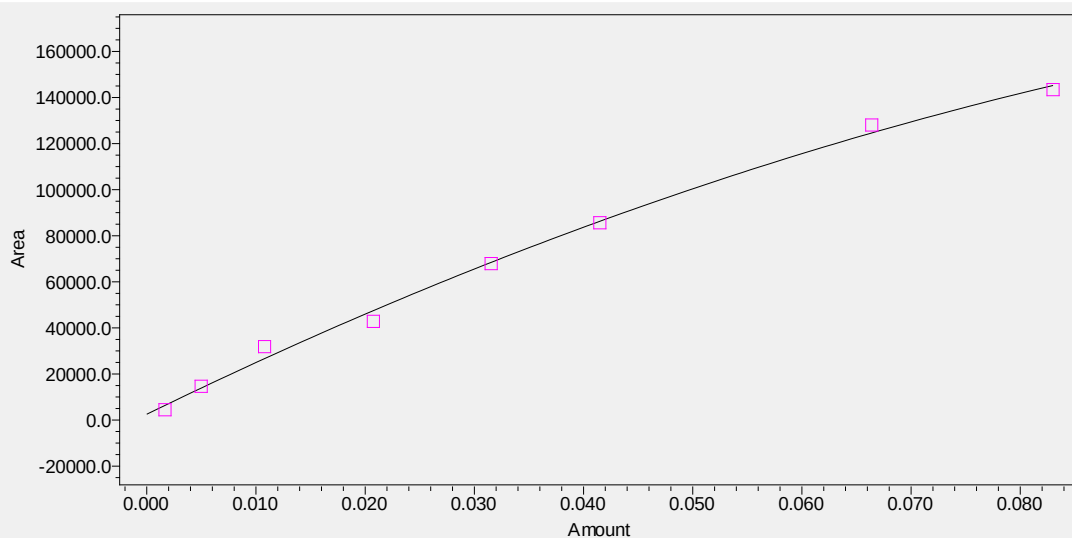
Fonte: próprio autor

APÊNDICE H – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO VANÍLICO

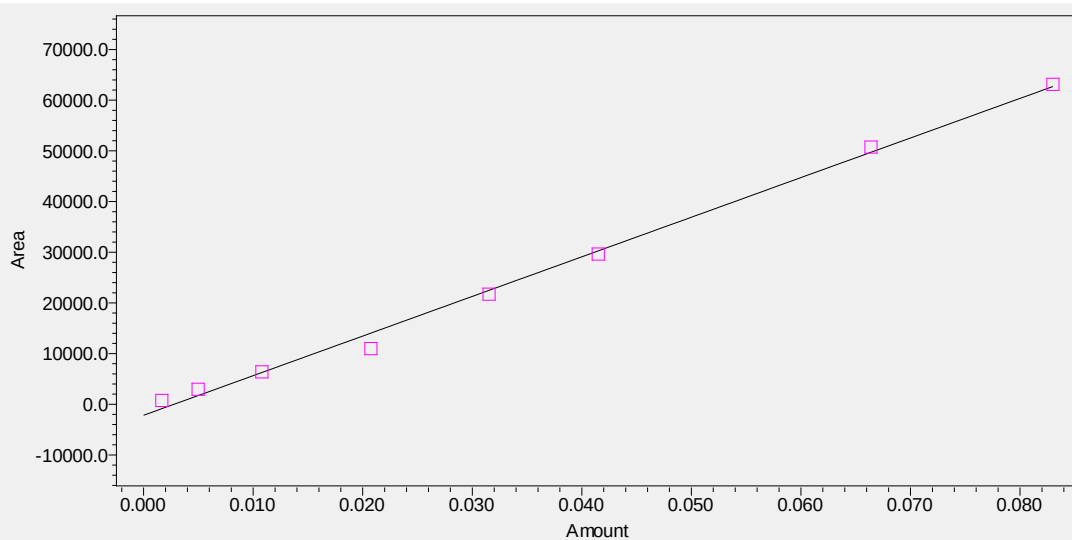
Fonte: próprio autor

APÊNDICE I – CURVA PADRÃO DE ACIDO *p*-CUMARICO

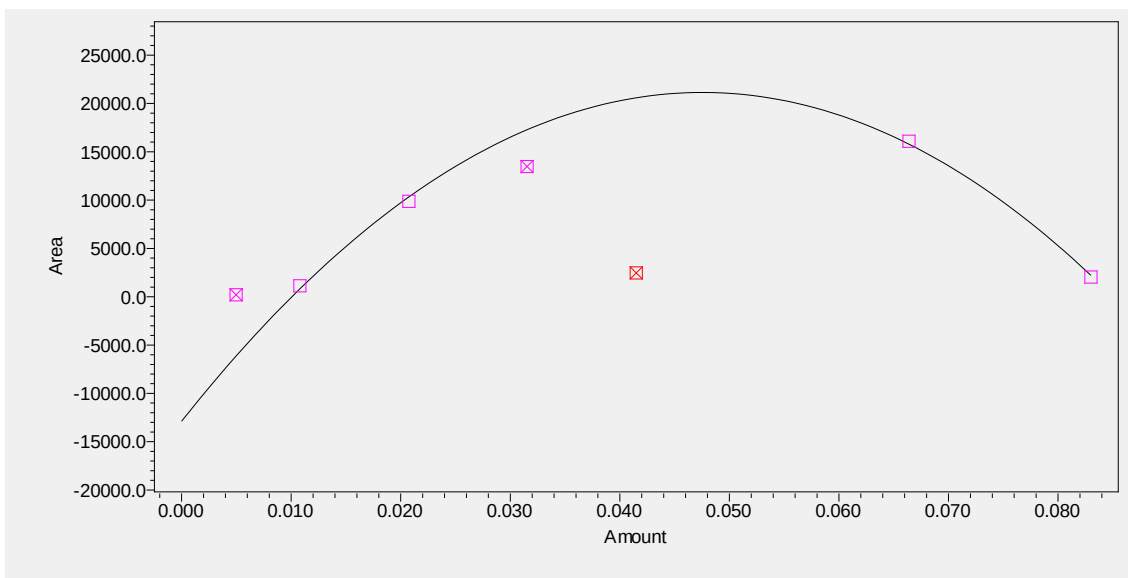
Fonte: próprio autor

APÊNDICE J – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO

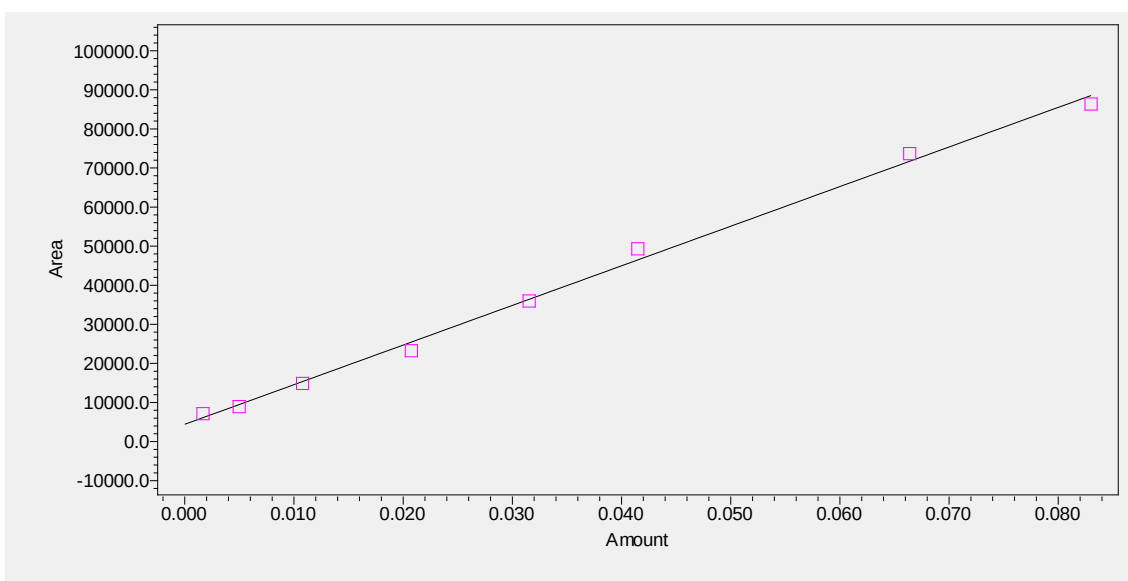
Fonte: próprio autor

APÊNDICE K – CURVA PADRÃO DE VANILINA

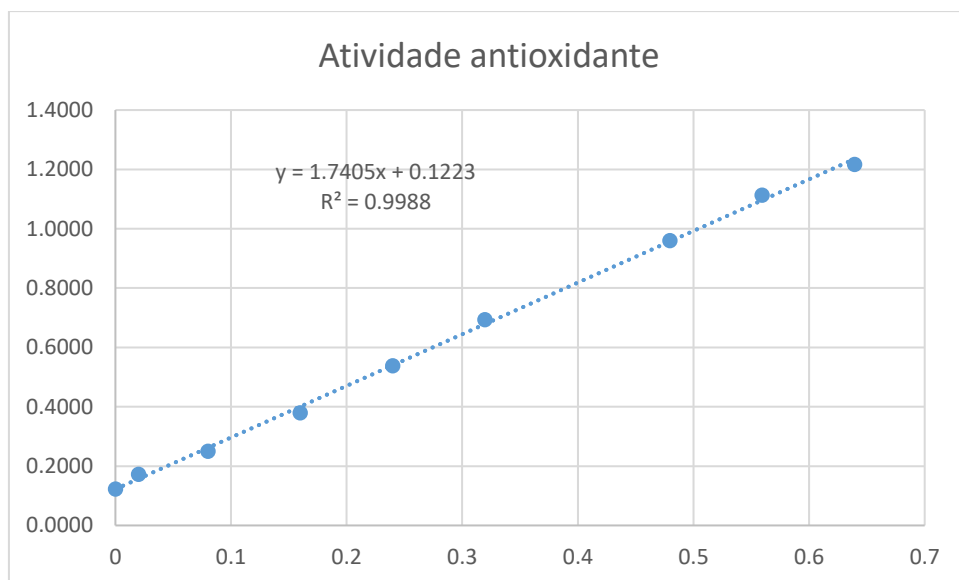
Fonte: próprio autor

APÊNDICE L – CURVA PADRÃO DE NARINGENINA

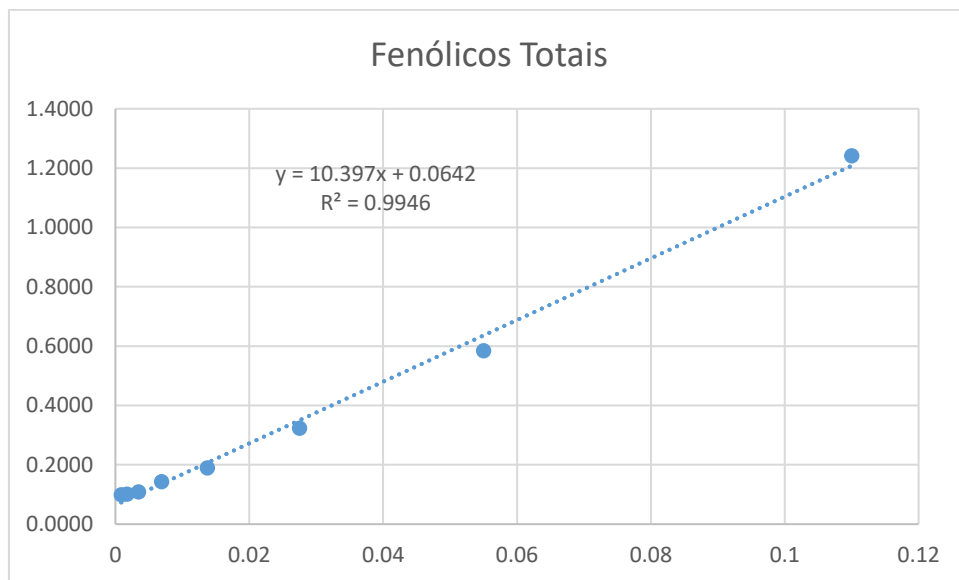
Fonte: próprio autor

APÊNDICE M – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO FERÚLICO

Fonte: próprio autor

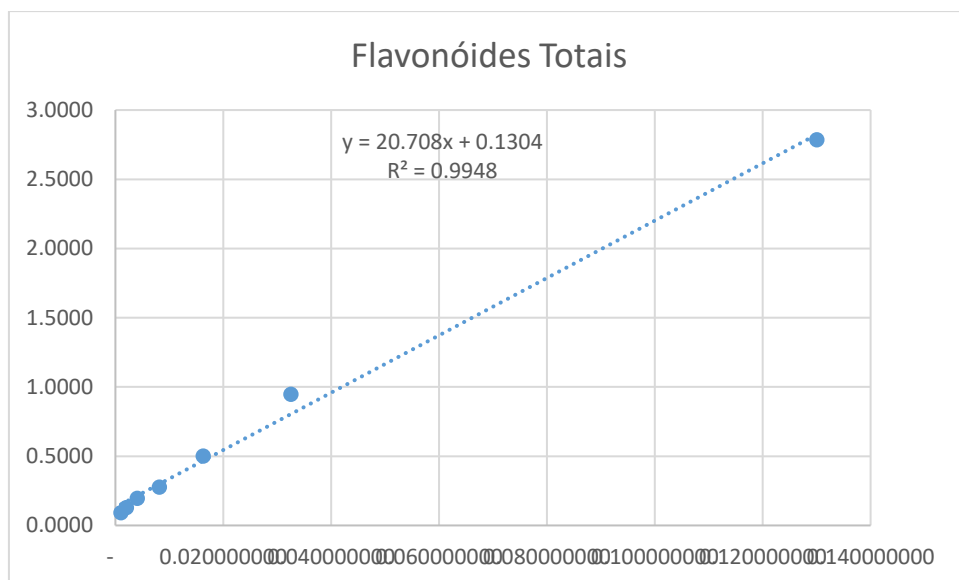
APÊNDICE N – CURVA PADRÃO DE TROLOX

Fonte: próprio autor

APÊNDICE O – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO

Fonte: próprio autor

APÊNDICE P – CURVA PADRÃO DE QUERCETINA



Fonte: próprio autor