

ESTUDO BOTÂNICO, FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO FRUTO DE *Ananas comosus* var. *Comosus* (L.) MERRIL (BROMELIACEAE)

JOSÉ JOAQUIM LOPES NETO¹, KLEYTON SANTOS VERAS¹, CARLIANE DOS SANTOS ROSA¹, PRYSCILA RODRIGUES SILVA¹, TÁSSIO RÔMULO SILVA ARAÚJO LUZ², JAMES SOARES DINIZ¹, FLAVIA MARIA MENDONÇA DO AMARAL³, ISRAEL HIGINO DE SOUSA⁴, DENISE FERNANDES COUTINHO MORAES³

¹Graduado(a) em Farmácia-Bioquímica. Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Campus Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil. E-mail: lopes.joaquimm@hotmail.com; kleyton_veras@hotmail.com; carlianefarmaufma@hotmail.com; pryscila.rsilva@gmail.com; jam_diniz@hotmail.com;

²Acadêmico do Curso de Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Campus Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil. E-mail: tassioromulo@hotmail.com;

³Professora Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Campus Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil. E-mail: fmman@terra.com.br; deniseufma2013@gmail.com.

⁴Graduado em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Campus Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil. E-mail: israelvmm@gmail.com.

Recebido em fevereiro de 2015. Aceito em julho de 2015. Publicado em dezembro de 2015.

RESUMO – *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill (abacaxizeiro) é uma espécie da família Bromeliaceae, originária da América subtropical, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais. Na prática popular, são referidas inúmeras propriedades terapêuticas desta espécie, dentre elas, estomáquica, anti-inflamatória e antidiabética. No Estado do Maranhão, destaca-se o abacaxi cultivar Turiaçu, apreciado no mercado local, por conta da sua agradável palatabilidade. Este trabalho teve como objetivo descrever caracteres botânicos e fitoquímicos e avaliar atividades biológicas dos extratos hidroalcoólicos das folhas da coroa e da polpa do abacaxi de Turiaçu, visando obter informações para futuras aplicações farmacológicas e cosméticas desta espécie. A espécie foi coletada no município de Turiaçu-MA e os testes foram desenvolvidos de acordo com literatura especializada. Os screenings fitoquímicos dos extratos das folhas e da polpa revelaram a presença de taninos e flavonoides. Os teores de polifenóis e flavonoides totais apresentaram-se mais elevados na polpa ($109,35 \pm 0,135$ mg/g e $1,24 \pm 0,008$ mg/g) que nas folhas ($102,68 \pm 0,090$ mg/g e $0,61\% \pm 0,002$ mg/g), porém ambos apresentaram baixas atividades antioxidantes ($IC_{50} = 454,97 \pm 39,38$ µg/mL e $IC_{50} = 339,07 \pm 2,08$ µg/mL, para polpa e folhas, respectivamente). Não foram observadas atividades antifúngica sobre o *Aspergillus niger* e hemolítica em ágar sangue.

PALAVRAS-CHAVE: *Ananas comosus* var. *comosus*; polifenóis; morfoanatomia; *Aspergillus niger*; atividade hemolítica.

BOTANICAL STUDY, PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES EVALUATION OF THE FRUIT OF *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) MERRIL (BROMELIACEAE)

ABSTRACT – *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill (pineapple) belongs to the Bromeliaceae family, and is native to subtropical America. Brazil is one of the main producers. In folk practice, this species is used for medicinal purposes, mainly as stomachic, anti-inflammatory and anti-diabetic. In the state of Maranhão, the Turiaçu pineapple cultivar is very popular in the local market, due to its pleasant flavor. This study aimed to provide information on botanical and phytochemical characteristics of this species, as well as to evaluate biological activities of hydroalcoholic extracts of crown leaves and the pulp of the Turiaçu pineapple, in order to contribute to future pharmacological and cosmetic applications. The species was collected in the municipality of Turiaçu-MA and the tests were performed based on specialized literature. The phytochemical study of the extracts from leaves and pulp showed the presence of tannins and flavonoids. The polyphenols and total flavonoid levels were higher in the pulp ($109,35 \pm 0,135$ mg/g and $1,24 \pm 0,008$ mg/g) than in the leaves ($102,68 \pm 0,090$ mg/g and $0,61\% \pm 0,002$ mg/g), although both extracts revealed low antioxidant activity ($IC_{50} = 454,97 \pm 39,38$ µg/mL and $IC_{50} = 339,07 \pm 2,08$ µg/mL, for pulp and leaves, respectively). No antifungal activities on *Aspergillus niger* nor hemolytic activity on blood agar were observed.

KEY WORDS: *Ananas comosus* var. *comosus*; polyphenols; morphoanatomy; *Aspergillus niger*; hemolytic activity.

ESTUDIO BOTÁNICO, FITOQUÍMICO Y EVALUACION DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL FRUTO DE *Ananas comosus* var. *Comosus* (L.) MERRIL (BROMELIACEAE)

RESUMEN – *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill (piña) es una especie de la familia Bromeliaceae, originaria de América subtropical, siendo Brasil uno de los productores más grandes del mundo. En la práctica popular, se hace referencia a numerosas propiedades terapéuticas de esta especie, entre ellos, digestiva, anti-inflamatoria y anti-diabética. En el estado de Maranhão, destacamos la piña de la cultivar Turiaçu, apreciada en el mercado local, debido a su agradable sabor. Este estudio tuvo como objetivo describir caracteres botánicos y fitoquímicos y evaluar las actividades biológicas de los extractos hidroalcoólicos de las hojas de la corona y la pulpa de la piña de Turiaçu, para obtener información para futuras aplicaciones farmacológicas y cosméticas de esta especie. La especie fue colectada en el municipio de Turiaçu-MA y las pruebas se desarrollaron de acuerdo con la literatura. Proyecciones fitoquímicas de los extractos de las hojas y la pulpa revelaron la presencia de taninos y flavonoides. Los polifenoles y flavonoides totales presentaron mayor en la pulpa ($109,35 \pm 0,135$ mg/g y $1,24 \pm 0,008$ mg/g) que en las hojas ($102,68 \pm 0,090$ mg/g y $0,61\% \pm 0,002$ mg/g), pero ambos mostraron baja actividad antioxidante ($IC_{50} = 454,97 \pm 39,38$ mg / ml y $339,07 \pm IC_{50} = 2,08$ mg / ml a pulpa y hojas, respectivamente). No se observó actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger* y hemolítica en agar sangre.

PALABRAS CLAVE: *Ananas comosus* var. *comosus*; polifenoles; morfoanatomia; *Aspergillus niger*; actividad hemolítica.

INTRODUÇÃO

Bromeliaceae representa uma das famílias botânicas mais importantes da região neotropical, apresentando cerca de 56 gêneros e 3000 espécies, todas nativas da América, exceto por uma espécie que

originou-se na região tropical oeste da África (Versieux e Wendt 2007). As espécies desta família apresentam grande variabilidade de formas, influenciadas pelos diversos habitats nos quais podem estar

inseridas (Rizzini 1997); destacam-se por seu caráter ornamental, sua utilização medicinal e também alimentar, podendo, ainda, serem empregadas na indústria de cosméticos (Benzing 2000). O uso etnobotânico de algumas bromeliáceas está associado à história de vários grupos pré-colombianos, principalmente como fonte de fibras, alimentos e forragens, além de seu uso místico (Bennett 2000).

Ananas comosus (L.) Merrill, conhecida como abacaxizeiro ou ananazeiro, é a espécie da família Bromeliaceae mais importante economicamente (Leal 1995), constituindo uma das fruteiras tropicais mais cultivadas no Brasil e também uma das culturas mais exigentes quanto à disponibilidade de um solo rico em nutrientes, água e demais fatores necessários ao seu cultivo (Vaillant et al. 2001). É uma planta monocotiledônea proveniente da América tropical e subtropical, incluindo o sul da América do Norte, além da América Central e do Sul (Medina et al. 1978; Aoyama et al. 2012). O vegetal adulto pode alcançar até 2 m de altura. Seu fruto, o abacaxi ou ananás, é caracterizado por um aglomerado cilíndrico ou cônico de uma ou duas centenas de pequenos gomos em torno de um mesmo eixo central, onde no topo se forma uma coroa, formada por folhas; apresenta, ainda, uma polpa de coloração branca, amarela ou laranja-avermelhada, de sabor muito apreciado por diversas populações (Silva and Tassara 2001).

O abacaxi contém nutrientes que são bons para a saúde humana, onde se destacam os açúcares de alto valor energético, sais minerais e vitaminas, como A, B1, B2 e C (Soares et al. 2004; Hariyaree et al. 2010). A composição química do abacaxi varia muito de acordo com a época em que é produzido. No verão, por exemplo, os frutos gerados apresentam ótimo teor de açúcares e menor acidez (Granada et al. 2004). Seus principais constituintes incluem derivados triterpenoides, flavonoides, derivados do ácido cinâmico e alcaloides (Manetti et al. 2009). Possui como componente característico, a bromelina, uma enzima proteolítica utilizada na indústria alimentícia (García and Serrano 2005) e também medicinal, na produção de xaropes expectorantes (Franco and Barros 2006).

Na prática popular, são referidas inúmeras propriedades terapêuticas tanto para o fruto como para as folhas de *A. comosus*, dentre elas, estomáquica, carminativa e antiinflamatória, também sendo indicados para problemas das vias respiratórias, como bronquite e sinusite (Tysnes et al. 2001; Lorenzi and Matos 2008). Silva et al. (2014) relatam o uso medicinal de *A. comosus* em uma comunidade rural no município de Cuitegi, no estado da Paraíba. Na Índia, preparados caseiros contendo as partes aéreas de *A. comosus* são usualmente empregados como vermífugo e abortivo naturais. Efeitos antidiabéticos e antilipêmicos foram observados em extratos etanólicos contendo as folhas de *A. comosus* (Pakrashi et al. 1975). Na Tailândia, são reportadas a sua atividade diurética e anti-edematosas (Xie et al. 2006). Enquanto que, no Brasil, já é produzido e comercializado um medicamento fitoterápico à base do extrato de *A. comosus* associado ao mel de abelha, atuando como expectorante e coadjuvante no tratamento de traqueobronquites e suas manifestações (Anvisa 2015).

No Estado do Maranhão, visando expandir a produção de frutos de alta qualidade para o mercado consumidor, foi desenvolvido o abacaxi da cultivar Turiaçu [*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill]. O fruto desse cultivar é um dos mais apreciados e vendidos no Maranhão, devido a sua agradável palatabilidade e rapidez no cultivo. Esta cultivar, que recebeu o nome de Turiaçu, em homenagem ao local onde é cultivado, é originário da região do Estado do Maranhão denominada Alto Turi, na Microrregião do Gurupi, onde se situa o município de Turiaçu. Foi domesticada por indígenas e posteriormente propagada por pequenos agricultores locais. Caracteriza-se por apresentar folhas espinhosas e de coloração verde, além de conter baixo teor de acidez, elevado teor de açúcares e polpa amarela que atendem às exigências comerciais (Araujo et al. 2012).

A partir da verificação das características nutricionais e terapêuticas do abacaxi, os estudos desta pesquisa foram direcionados a variedade cultivada em Turiaçu, por ser pouco estudada e de largo interesse comercial. O presente trabalho objetivou caracterizar o abacaxi de Turiaçu sob aspectos botânicos e fitoquímicos, além de investigar algumas atividades biológicas do mesmo através de ensaios de atividade antioxidante *in vitro*, antifúngica e hemolítica, visando obter informações para futuras aplicações desta espécie nas áreas da farmacologia e cosmética.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Identificação do Material Vegetal

A inflorescência, as folhas, os frutos maduros e outras partes aéreas de *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill foram coletados em área de agricultura de subsistência no Povoado de Serra dos Paz, zona rural do município de Turiaçu (MA), nas coordenadas geográficas de latitude 01°39'48" e longitude de 45°22'18", em fevereiro de 2014 no início da manhã. O material vegetal foi identificado no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde encontra-se depositado sob o número 01128.

Estudo Botânico de Ananas comosus var. comosus

A caracterização morfológica e anatômica do fruto *in natura* e das folhas que compõem a coroa deste foi realizada segundo a metodologia descrita por Oliveira and Akisue (2009). As descrições morfológicas foram feitas com as folhas frescas e o fruto *in natura*, à vista desarmada. Para a descrição anatômica de *A. comosus*, realizaram-se secções paradermicas e transversais no terço mediano das folhas a mão livre, utilizando lâminas de aço inoxidável, em seguida, as secções foram coradas com Azul de Astra e Fucsina Básica; e para o fruto, secções longitudinais radiais e tangenciais com o pericarpo íntegro, utilizando um bisturi para evidenciar a sua estrutura interna.

Preparação dos Extratos Brutos A. comosus

As folhas da coroa foram secas a temperatura ambiente e pulverizadas com moinho de facas, utilizando malha de 2 mm de diâmetro, obtendo um pó grosso. A polpa, retirada do fruto, passou por processo de fragmentação e secagem em estufa de ar circulante, a uma temperatura de 40°C, durante 72 horas. O resíduo foi pulverizado em moinho de facas, com granulometria de pó grosso. Os pós das folhas e da polpa de *A. comosus* foram submetidos, separadamente, a processo extrativo por maceração com etanol 70%, utilizando os hidromódulos de 1:12 e 1:4 (p/v), respectivamente, durante 5 dias, sob abrigo de luz. Em seguida, foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo.

Caracterização Fitoquímica

Os extratos etanólicos foram submetidos à pesquisa de metabólitos secundários através dos testes de prospecção fitoquímica de acordo com a metodologia proposta por Matos (2009). Todos os testes foram realizados em triplicata.

Determinações do Teor de Polifenóis e Flavonoides Totais

As concentrações de polifenóis totais foram determinadas utilizando reagente de Folin-Ciocalteu (Merck) e carbonato de sódio a 20%, por espectrofotometria (espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35, Perkin Elmer) a 760 nm, após 2 horas de reação. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (Sigma) (mg/g), calculados a partir de uma curva padrão de ácido gálico (1 a 30 µg/mL), usada para obtenção da equação da reta. A concentração de flavonoides totais foi determinada utilizando solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 5%, por espectrofotometria UV-Vis (Lambda 35, Perkin Elmer) a 425 nm. Concentrações de quercetina

(Merck) utilizadas como padrões e os resultados expressos em mg/g de quercetina (Funari e Ferro 2006; Dutra et al. 2008). Os teores de polifenóis e flavonóides totais dos extratos foram realizados em triplicata e expressos como média \pm desvio padrão.

Avaliação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de *A. comosus* foi determinada utilizando-se o ensaio pelo radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) descrito por Brand-Williams et al. (1995), com modificações que consistiram na diluição das amostras em metanol em diferentes concentrações (1 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e adicionadas em solução metanólica de DPPH na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 30 minutos de reação ao abrigo de luz em temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro. O metanol foi utilizado como branco e a solução de DPPH como controle. Padrões de vitamina C foram tratados sob as mesmas condições das amostras. A percentagem de inibição foi calculada utilizando-se a fórmula disponibilizada na literatura. A percentagem de inibição foi plotada contra a concentração da amostra para se obter a CI_{50} , definida como a concentração de amostra necessária para causar 50% de inibição. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Avaliação da Atividade Antifúngica

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado de acordo com as metodologias descritas por Roberts and Selitrennikoff (1990), com modificações, de acordo com o protocolo do CLSI – Clinical and Laboratory Standarts Institute CLSI (2009), utilizando uma suspensão do fungo *Aspergillus niger* (concentração de 1×10^4 organismos/mL), obtida no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Para essa avaliação, foram utilizados os procedimentos de difusão em disco e de poços, empregando ágar batata como meio de cultura e 300 μL dos extratos estéreis de *A. comosus* var. *comosus*. Em ambos os testes, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas até o crescimento do fungo em presença do extrato. A formação de halos ao redor dos discos e dos poços indicou a inibição do crescimento fúngico. Nistatina (100000 UI. mL^{-1} , EMS, São Paulo) foi utilizada como controle positivo e etanol a 70% (solvente utilizado para diluição do extrato bruto) como controle negativo. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Atividade Hemolítica em Ágar Sangue

A atividade hemolítica dos extratos em estudo foi realizada com base na técnica de difusão de amostras em placas de ágar sangue na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em duplicata, conforme descrito por Oliveira et al (2013), com modificações quanto a quantidade de extrato utilizado (25 e 50 μL) que foram incorporados em discos de papel esterilizados (1,5 cm de diâmetro). Como controle negativo, foi utilizado etanol a 70% (usado na diluição das amostras). Esta atividade foi verificada pela presença de halos de hemólise, medidos com o auxílio de régua milimétrica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfoanatomia Foliar e Frutal de *Ananas comosus* var. *comosus*

O abacaxi caracteriza-se como um pseudofruto carnoso do tipo baga e partenocárpico. Corresponde, na realidade, a um aglomerado de frutinhos formando um tipo de infrutescência denominada sorose, originada de numerosas flores concrescidas sobre um eixo comum (Figura 1A) (Ferri 1983). Cada uma destas flores possui um ovário inferior, tricarpelar e trilobular, com três septos formando um Y invertido que persiste até certo tempo durante o amadurecimento do fruto e possível de ser visualizado a partir da

secção tangencial do mesmo (Figura 1B) e confirma o observado por Bartholomew et al. (2003) para *A. comosus*.

Os frutos de *A. comosus* var. *comosus* apresentaram formatos variados de cilíndricos a cônicos, acrescidos de uma coroa de brácteas espinhosas em seu ápice, conforme o que foi descrito por Araujo et al. (2012). O pericarpo, correspondente a parte comestível do fruto, é constituído, basicamente, dos ovários amadurecidos das muitas flores da inflorescência que lhe deu origem (Jimenez Días 2008). A polpa do fruto estudado apresenta coloração amarelada (Figura 1C), diferenciando do cultivar Pérola, amplamente cultivado no Maranhão, que possui fruto de coloração interna branca, (Pereira 2013). O Smooth Cayenne é a cultivar mais cultivada no mundo e também apresenta polpa amarelada (Nascimento et al 2005). Segundo Reinhardt et al. (2000) e conforme observado através das secções radiais, o mesocarpo e o endocarpo, com aspecto parenquimatoso e succulento, mostraram-se indiferenciados entre si, devido ao estágio tardio de amadurecimento do fruto (Figura 1C).

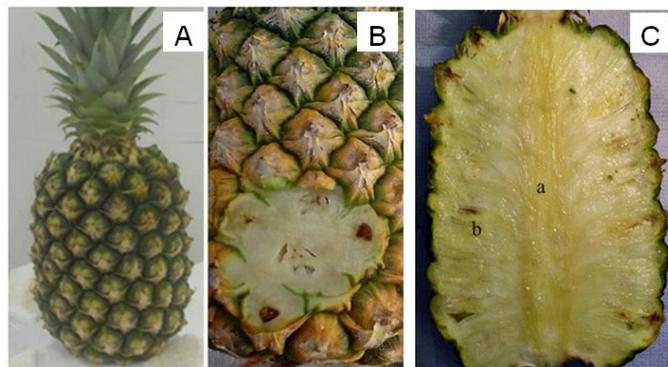


Figura 1. Fruto de *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill (cultivar Turiaçu). A - Aspecto da disposição dos frutinhos, reunidos em torno do eixo central, formam a sorose; B – Aspecto do vestígio ovariano com três septos formando um Y invertido, a partir de secção tangencial do fruto; C - Corte longitudinal do fruto com pericarpo íntegro e em alto estágio de maturação. Legenda: a - eixo da infrutescência; b - ovário.

As folhas da coroa do fruto da espécie analisada são simples, de coloração verde clara e dispoem-se em forma de roseta no topo do fruto. Seu comprimento, de aproximadamente 5-8 cm, varia de acordo com a idade e a posição das mesmas (Figura 2A). Geralmente, as folhas do centro são menores e mais jovens, se comparadas com as da periferia. O limbo foliar é ensiforme e ereto, mostrando-se íntegro e com consistência semi-rígida. Apresenta ápice agudo, base truncada, margem espinhosa e nervação paralelinérvica, características importantes para identificação desta espécie vegetal, coincidindo com a descrição feita por Collins (1960). Nascimento et al (2005) descreveram a presença de poucos espinhos nas folhas do abacaxi cultivar Smooth Cayenne, ausência dessas estruturas nas folhas das cultivares Perolera e Quinari e característica espinhosa das folhas do abacaxi Pérola.

No estudo anatômico, observou-se que a epiderme das folhas da coroa é hipoestomática, com os estômatos dispostos longitudinalmente em sulcos pequenos e distribuídos em faixas paralelas entre cordões de células epidérmicas (Figura 2B), características também descritas por Barboza et al. (2006) para a espécie *A. comosus* cultivar Pérola. As células epidérmicas, em vista frontal, apresentam formato alongado com paredes anticlinais retas em ambas as faces e estão recobertas por uma camada de cutícula de espessamento variável (Figura 2B e C). Tricomas tectores e tricomas escamiformes pluricelulares estão presentes tanto na face abaxial quanto na adaxial (Figura 2D) e também foram descritos por Proença e Sato (2007) para várias espécies de Bromeliaceae, diferentes da espécie em estudo. Segundo Franceschi e Horner (1980) é comum a

presença de cristais de oxalato de cálcio nas células epidérmicas de *A. comosus*, caracterizando uma ótima tolerância do vegetal às condições ambientais as quais é submetido. No presente trabalho, foram visualizadas drusas e cristais prismáticos de oxalato de cálcio (Figura 2D), achados estes concordantes com o estudo dos autores acima mencionados.

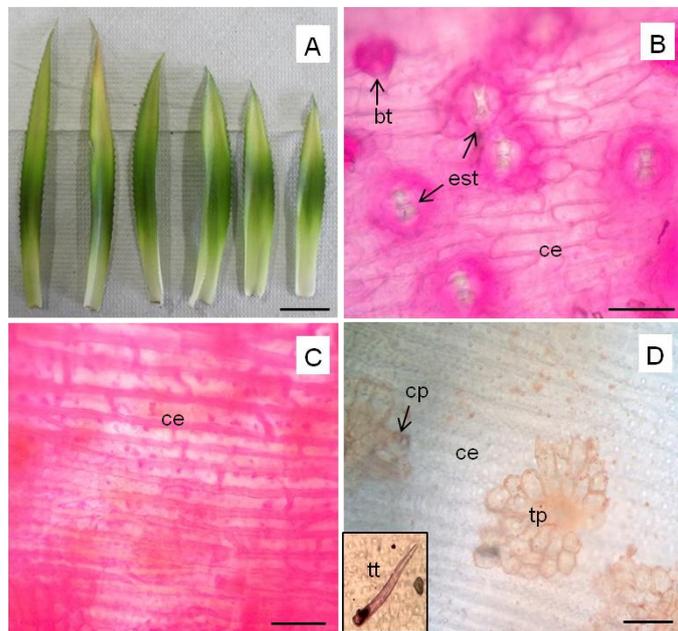


Figura 2. *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill (cultivar Turiaçu): folha. A - Lâminas foliares da coroa do fruto (Barra - 3cm); B - Visão frontal da face abaxial da epiderme, com estômatos (Barra - 30µm); C - Visão frontal da face adaxial da epiderme (Barra - 30µm); D - Aspecto geral da face adaxial da epiderme, mostrando tricoma pluricelular e detalhe de tricoma tector (quadro) (Barra - 100µm). Legenda: ce - célula epidérmica; est - estômato; bt - base do tricoma; cp - cristal prismático; tp - tricoma pluricelular (escama); tt - tricoma tector.

A lâmina foliar da coroa do abacaxi estudado apresenta mesófilo dorsiventral, com presença de subepiderme junto à face adaxial (Figura 3A e B). Proença e Sato (2007) observaram em espécie de Bromeliaceae tanto mesófilo homogêneo como diferenciado em paliçádico e esponjoso. O parênquima do mesófilo é dividido em aquífero e parênquima clorofiliano. O parênquima paliçádico é formado duas a três camadas de células grandes, levemente arredondadas e com paredes delgadas e onduladas (Figura 3A), desempenhando função armazenadora de água, um atributo particular em Bromeliaceae e que serve de identificação para os vegetais do gênero *Ananas* (Baldotto et al. 2009). O parênquima esponjoso apresenta cloroplastos, caracterizando parênquima clorofiliano, composto por células relativamente pequenas e arredondadas, onde observou-se feixes vasculares colaterais, envolvidos por fibras esclerenquimáticas e também a presença de fibras isoladas e em grupos (figura 3B e D). Junto a esses feixes, foram observados espaços intercelulares grandes, caracterizados como câmaras de armazenamento de ar (Figura 3C). Proença e Sato (2007) descrevem a presença de canais de aeração para folhas de várias espécies de Bromeliaceae, no entanto estes são menores do que as estruturas observadas em nosso estudo.

Caracterização Fitoquímica Preliminar

Pela caracterização fitoquímica dos extratos elaborados a partir da polpa e das folhas da espécie estudada, detectou-se na polpa a presença de polifenóis, dentre estes taninos e flavonoides e também a

presença de saponinas; enquanto que nas folhas, alcaloides e taninos. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da caracterização fitoquímica qualitativa preliminar dos extratos da polpa e das folhas da coroa do fruto de abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) coletado na cidade de Turiaçu, MA

Testes Fitoquímicos	Extrato Polpa	Extrato Folhas
Alcaloides	-	+
Cumarinas	-	-
Esteroides	-	-
Fenóis	+	+
Flavonoides	+	-
Saponinas	+	-
Taninos	+	+
Triterpenos/Esteroides	-	-

+: resultado positivo; -: resultado negativo.

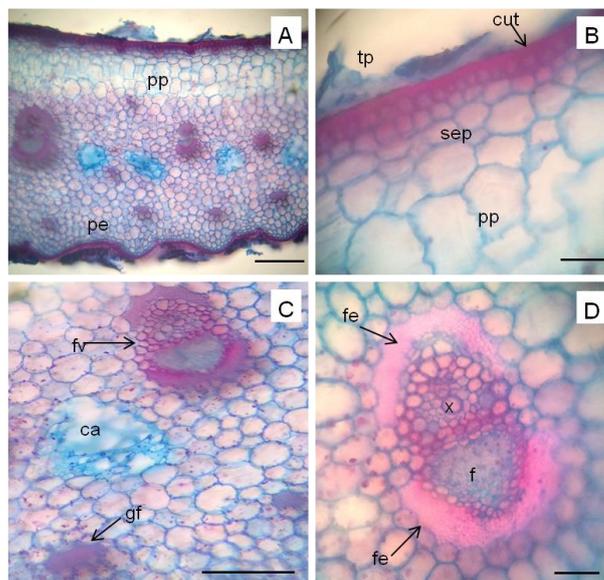


Figura 3. *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill (cultivar Turiaçu): secções transversais da folha. A - Aspecto geral do mesófilo dorsiventral (Barra - 100µm); B - Detalhe da face adaxial da epiderme, mostrando tricoma pluricelular e subepiderme (Barra - 30µm); C - Mesófilo com feixe vascular, câmara de ar e agrupamento de fibras (Barra - 50µm); D - Detalhe de um feixe vascular colateral do mesófilo (Barra - 30µm). Legenda: ca - câmara de ar; fe - fibras esclerenquimáticas; fv - feixe vascular; gf - agrupamento de fibras; pe - parênquima esponjosos; pp - parênquima paliçádico; tp - tripoma pluricelular; sep - subepiderme;

Comparando-se os resultados deste estudo com a literatura, encontramos divergências quanto a alguns metabólitos detectados. Nos trabalhos de Duke (1985), Takata and Scheuer (1976) e Xie et al. (2005), no extrato hidroalcoólico das folhas de *A. comosus* foi detectada a presença de esteroides, triterpenos e flavonoides respectivamente, porém em nosso estudo somente os flavonoides foram detectados.

A existência de fenóis e taninos tanto na polpa como nas folhas de *A. comosus* var. *comosus* confirma os dados descritos na literatura para espécies de Bromeliaceae. Manetti et al (2009) demonstraram em uma revisão da família Bromeliaceae a presença de diversos metabólitos, destacando-se os flavonoides, como sendo característicos dessas espécies. Segundo esses autores, Bromeliaceae é a única família de monocotiledôneas com frequência e variedade de flavonoides com hidroxilação ou metoxilação na posição 6 do seu anel benzofurano. Coelho et al. (2010) isolaram glicosídeos flavônicos a partir dos frutos de *Bromelia balansae*. No trabalho realizado por Katakai (2010), além da

presença de taninos e flavonoides, estes autores identificaram saponinas e alcaloides no extrato etanólico de folhas de *A. comosus*, o que corrobora com os resultados do presente trabalho, onde foi detectado alcaloides nas folhas e saponinas na polpa.

Em contrapartida, a caracterização fitoquímica realizada no extrato hidroalcoólico da polpa por Clavijo et al. (2012), utilizando uma metodologia diferente da executada neste estudo, demonstrou resultados negativos para fenóis, flavonoides, saponinas e taninos. De acordo os estudos realizados por Thé et al. (2010) com o abacaxi cultivar Smooth Cayene, as enzimas presentes nesses frutos, responsáveis pelo seu amadurecimento, podem agir degradando substâncias, o que em parte pode explicar a discordância dos resultados obtidos neste trabalho com o do autor supracitado.

Outro fator, que pode estar relacionado à diferença entre os resultados encontrados e a literatura disponível é a variação de constituintes presentes nas plantas em função de fatores externos, incluindo: temperatura, irrigação, incidência solar, nutrientes do solo, horário de coleta e idade da planta (Carneiro et al. 2010). Chavarria et al (2011) demonstraram que diferentes tipos de solo e disponibilidade hídrica influenciam na produção de compostos fenólicos de uvas do cultivar Carbenet Sauvignon. Coutinho (2010) constataram variação sazonal na produção de flavonoides em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. A idade do vegetal pode também influenciar na produção de metabólitos secundários, como ocorre com a helenalina, constituinte ativo de *Arnica montana*, que pode não ser detectada seis semanas a partir da formação das folhas do vegetal (Schmidt et al, 1998). Essas variações observadas nos constituintes são indicativas de que uma rede complexa de fatores e/ou condições ambientais estão influenciando a composição destas espécies (Cerqueira 2009).

Concentrações de Polifenóis e Flavonoides Totais e Avaliação da Atividade Antioxidante

Observou-se que os extratos brutos das folhas da coroa e da polpa apresentaram teores distintos para polifenóis e flavonoides totais, como demonstrado na tabela 2. A análise da tabela 2 ainda permitiu inferir que o extrato hidroalcoólico da polpa apresentou os teores destes constituintes mais elevados que os do extrato proveniente das folhas. Isto pode ser explicado, em parte, pela ocorrência de flavonoides somente na polpa da *A. comosus* var. *comosus*, como já salientado pela caracterização fitoquímica realizado no presente trabalho.

Os teores de polifenóis e flavonoides totais da polpa determinados neste estudo mostraram-se superiores aos relatados por Lu et al. (2014), que verificou o conteúdo total dos mesmos no extrato hidroalcoólico da polpa de *A. comosus* da cultivar Smooth Cayenne. Estes autores citam, ainda, resultados de 53,43 mg de equivalentes de ácido gálico/100g de peso fresco de polpa e 12,62 mg de equivalentes de quercetina/100g de peso fresco de polpa, respectivamente.

Tabela 2. Teor de Polifenóis e Flavonoides Totais e Capacidade Antioxidante dos Extratos Brutos de *Ananas comosus* var. *comosus*

Extrato	Polifenóis Totais (mg/g)	Flavonoides Totais (mg/g)	CI ₅₀ (µg/mL)*
Folha	10,268 ± 0,090	0,061 ± 0,002	339,07 ± 2,08
Polpa	10,935 ± 0,135	0,124 ± 0,008	454,97 ± 39,38

Os valores referem-se à média de três determinações ± desvio padrão. *Método DPPH

Estudos vem indicando que o consumo de produtos vegetais está associado a uma redução na incidência de doenças crônicas e degenerativas no ser humano, como o câncer e os distúrbios cardio e

cerebrovasculares, que são originados a partir da ação danosa de radicais livres aos lipídios de membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos (Choi and Lee 2009). Estes efeitos vem sendo atribuídos a presença de metabólitos secundários com ação antioxidantes, destacando-se os compostos fenólicos (Kuskoski et al. 2005; Silva et al. 2010).

Em relação a esta atividade antioxidante, testada pelo método de DPPH, os extratos brutos das folhas da coroa e da polpa de *A. comosus* var. *comosus* apresentaram baixa atividade antioxidante, conforme demonstra a tabela 2, bastante inferior que a substância padrão utilizada no teste, a vitamina C, cuja CI₅₀ foi de 5,21 ± 0,10 µg/mL.

Estes resultados guardam similaridade com os de Sousa et al. (2011) que, ao determinar a capacidade antioxidante de resíduos de polpas de frutas tropicais, encontrou a CI₅₀ de 3293,92 ± 9,89 µg/mL para o extrato hidroalcoólico do abacaxi, classificando este como fruta de baixo potencial antioxidante.

Os estudos de Haripyaee et al. (2010), pelo contrário, apontaram como promissora a utilização do abacaxi e seus constituintes como agentes antioxidantes naturais, em virtude da detecção do valor de 12,2µg/ml para a CI₅₀ do extrato de *A. comosus* var. *queen*, uma cultivar nativa da Índia, utilizando acetato de etila como líquido extrator. As diferenças observadas entre estes dados com os obtidos neste trabalho podem estar relacionadas, conforme expresso por Pérez-Jimenez et al. (2008), com a presença de diversos aspectos que regem o processo extrativo e a avaliação da atividade antioxidante de drogas vegetais, dentre os quais se destacam o tipo de solvente e a temperatura usados na extração, a degradação de substâncias ativas durante as etapas experimentais por fatores externos, além da interferência de componentes não-antioxidantes presentes no meio reacional.

Embora a polpa estudada tenha apresentado valores maiores de polifenóis e flavonoides, comparando-se com as folhas de *A. comosus* var. *comosus*, os resultados mostraram que o extrato destas folhas apresentou atividade antioxidante mais expressiva. Uma possível explicação para este evento pode residir na presença de outras substâncias que possam apresentar esta propriedade e que não sejam de natureza polifenólica, como alcaloides, ácidos orgânicos, mono e sesquiterpenos, vitaminas e até mesmo minerais (Takata and Scheuer 1976; Dimitrios 2006). A detecção de alcaloides nas folhas esta espécie, além dos fenólicos, pode ter corroborado com seu potencial antioxidante mais expressivo.

Avaliação da Atividade Antifúngica

A espécie *A. niger* é um fungo filamentosos e cosmopolita, que tem sido implicado em várias dermatomycoses oportunistas em seres humanos e também em animais (Frias and Andreani 2009). O crescimento mundial de infecções fúngicas e o aumento na resistência de certas espécies tem fomentado as pesquisas por produtos com esta atividade (Sati and Josh, 2011). Apesar da importância da descoberta de compostos com essa ação, no presente estudo, os extratos brutos da polpa e das folhas de *A. comosus* var. *comosus* não inibiram o desenvolvimento micelar de *A. niger* nos dois testes executados. Estes resultados contradizem o relato do poder antifúngico de substâncias isoladas do fruto de *A. comosus*, dentre elas a enzima bromelina contra o próprio *A. niger* (Dermarderosian et al. 2008).

Avaliação da Atividade Hemolítica em Ágar Sangue

As amostras provenientes da polpa e das folhas da espécie em estudo, nos volumes de 25 e 50 µL (na concentração de 0,02 mg/µL), não revelaram a formação de halos de hemólise, ou seja, não apresentaram atividade hemolítica. Esta atividade está relacionada a toxicidade de extratos vegetais, e vem sendo amplamente utilizada

para avaliar a segurança no uso de plantas (Bednarczuk et al. 2010). Segundo WHO (1998), a atividade hemolítica está associada à presença de saponinas em extratos vegetais, capazes de produzir mudanças nas membranas eritrocitárias, fazendo com que a hemoglobina se difunda para o meio circundante. Apesar da ocorrência de saponinas no extrato da polpa da *A. comosus* var. *comosus*, estas não foram capazes de causar hemólise nas concentrações utilizadas no teste em questão.

Manetti et al. (2010), ao realizar testes com os extratos aquosos dos frutos e das folhas de *Bromelia antiacantha*, verificou a positividade para atividade hemolítica desta bromeliácea utilizando hemácias de carneiro, além de conseguir isolar por cromatografia em coluna, o daucosterol, uma saponina esteroidal. A vantagem da espécie em estudo apresentar propriedade hemolítica negativa consiste na observação de maior segurança na sua utilização alimentar e também no interesse futuro para produção de medicamentos.

CONCLUSÃO

Através do trabalho realizado, foi possível determinar características morfo-anatômicas da polpa e folhas de *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merril., da cultivar Turiaçu, que poderão ser usadas na identificação desta bromeliácea, como polpa amarelada e folhas espinhosas, mesófilo dorsiventral, tricomas tectores e pluricelulares e câmaras de ar junto aos feixes vasculares. Os ensaios fitoquímicos com os extratos brutos provenientes das folhas da coroa e da polpa de *A. comosus* var. *comosus* revelaram a presença principal de polifenóis, dentre estes taninos e flavonoides. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos elaborados a partir das partes da espécie estudada apresentaram baixo potencial antioxidante, negatividade para as atividades antifúngica e hemolítica, apesar de estarem presentes em suas constituições substâncias bioativas capazes de desencadear tais atividades.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento do Estado do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento do projeto, à UFMA e ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2015. Detalhe do Produto: MELXI. **Consulta de Produtos**. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/rconsult_a_produto_detalhe.asp>. Acesso em 19. Set. 2015.

Aoyama EM, Gontijo ABPL, Faria DV. 2012. Propagação em Bromeliaceae: germinação de sementes e cultivo in vitro. **Enciclopédia Biosfera**, 8(15): 1452-1471.

Araujo JRG, Júnior RAA, Chaves AMS, Reis FO, Martins MR. 2012. Abacaxi 'Turiaçu': cultivar tradicional nativa do Maranhão. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 34 (4): 1270-1276.

Baldotto LEB, Baldotto MA, Giro VB, Canellas LP, Olivares FL, Bressan-Smith R. 2009. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33 (4): 979-990.

Barboza SBSC, Graciano Ribeiro D, Teixeira JB, Portes TA; Souza, LAC. 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 4: 185-194.

Bartholomew DP, Paull RE, Rohrbach KG. 2003. **The pineapple: botany, production and uses**. Wallingford: CABI Publishing, 300 p.

Bednarczuk VO, Verdam MCS, Miguel MD, Miguel OG. 2010. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, 11(2): 43-50.

Bennett BC. 2000. **Ethnobotany of Bromeliaceae in Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation**; Benzing, D. H., ed.; Cambridge University: Cambridge, 2000, cap 14.

Benzing DH. 2000. **Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation**. New York: Cambridge University Press, 690p.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, 28: 25-30.

Carneiro FB, Júnior ID, Lopes PQ, Macêdo RO. 2010. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20 (4): 600-606.

Cerqueira MD, Marques EJ, Martins D, Roque NF, Cruz FG. 2009. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, 32 (6): 1544-1548.

Chavarria G, Bergamaschi H, Silva LC da, Santos HP dos, Mandelli F, Guerra CC, Flores CA, Tonietto J. 2011. Relações hídricas, rendimento e compostos fenólicos de uvas Cabernet Sauvignon em três tipos de solo. **Bragantia**, 70(3): 481-487.

Choi Y and Lee J. 2009. Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. **Food Chemistry**, 114: 1386–1390.

Clavijo UM, Gómez AMA, Arango V, Mancera FMC, Jaramillo APC, Maya WDC. 2012. Efecto in vitro del extracto vegetal de *Ananas comosus* sobre espermatozoides humanos. **Revista Tecnológicas**, 28: 55-70.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test**; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10.

Coelho RG, Honda NK, Vieira MC, Brum RL, Pavan FR, Leite CQF, Cardoso CAL. 2010. Composition and Antioxidant and antimycobacterial activities of *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). **Journal of Medicinal Food**, 13 (5): 1277-1280.

Collins, JL.1960. **The pineapple: botany, cultivation and utilization**. New York: Leonard Hill, 294p.

Coutinho ID, Kataoka VMF, Honda NK, Coelho RG, Vieira MC, Cardoso CAL. 2010. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20(3):322-327.

Dermarderosian A et al. 2008. **The review of natural Products - the most complete source of natural product information**. St. Louis: Wolters Kluwer Health, 1728p.

- Dimitrios B. 2006. Sources of natural phenolics antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, 17 (9): 505-512.
- Duke JA. 1985. **CRC Handbook of Medicinal Herbs**. Florida: CRC Press, 677 p.
- Dutra RP, Nogueira AMC, Marques RRO, Costa MCP, Ribeiro MNS. 2008. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) em municípios da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18 (4): 557-562.
- Ferri MG. 1983. **Botânica: morfologia externa das plantas (organografia)**. 15ª ed. São Paulo: Nobel, 148 p.
- Franceschi VR and Horner HT. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. **Botanical Review**, New York, 46: 361-427.
- Franco EAP and Barros RFM. 2006. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho d'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, 8 (3): 78-88.
- Frias DFR and Andreani DIK. 2009. Verificação da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto no controle in vitro de *Aspergillus niger*. **Revista CES Medicina Veterinária y Zootecnia**, 4 (2): 12-19.
- Funari CS and Ferro VO. 2006. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26 (1): 171-178.
- García SMD and Serrano H. 2005. La piña, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. **Contacto 56**: 55-61.
- Granada GG, Zambiasi RC, Mendonça CRB. 2004. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. **Boletim do CEPPA**, 22 (2): 405-422.
- Hariyaree A, Guneshwor K, Damayanti M. 2010. Evaluation of antioxidant properties of phenolics extracted from *Ananas comosus* L. **Notulae Scientia Biologicae**, 2 (2): 68-71.
- Jimenez Díaz J.A. 2008. **Manual práctico para el cultivo de la piña de exportación**. San José: Editorial Tecnológica de Costa Rica, 224p.
- Kataki MS. 2010. Antibacterial in vitro antioxidant activity and anthelmintic activity of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. tender leaves. **Pharmacology Online**, 2: 308-319.
- Kuskoski EM, Asuero GA, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25 (4): 726-732.
- Leal F. Pineapple – *Ananas comosus* (Bromeliaceae). In: Smartt J and Simmonds NW. 1995. **Evolution of crop plants**. Nova York: Longman Singapore, p.19-22.
- Lorenzi H and Matos FJA. 2008. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ed. Nova Odessa: Instituto Plantarium, 544p.
- Lu X, Sun D, Wu Q, Liu S, Sun G. 2014. Physico-chemical properties, antioxidant activity and mineral contents of pineapple genotypes grown in China. **Molecules**, 19: 8518-8532.
- Manetti LM, Delaporte RH, Laverde JR. 2009. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, 32 (7): 1885-1897.
- Manetti LM, Turra AF, Takemura OS, Laverde JRA. 2010. Avaliação da atividade hemolítica de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. 14 (1): 43-47.
- Matos FJA. 2009. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3ed. Fortaleza: Edição UFC, 45p.
- Medina JC. 1978. A cultura do abacaxi. In: Medina, J.C. et al. **Frutas tropicais 2**. São Paulo: Canton, p.6-68.
- Nascimento AS, Costa RSC da, Costa JNM. 2005. **Cultivo do abacaxi em Rondônia**. Embrapa Rondônia. Sistemas de Produção, 3.
- Oliveira DMS, Ocampos FMM, Moreira F, Miguel OG, Miguel MD, Rosa AR, Rosa RT. 2013. Análises físico-químicas, atividade hemolítica e antimicrobiana dos extratos e frações de *Buddleja stachyoides* Cham. & Schlttdl. (Scrophulariaceae). **Visão Acadêmica**, 14 (3): 14-25.
- Oliveira F and Akisue G. 2009. **Fundamentos de farmacobotânica e morfologia vegetal**. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 426p.
- Pakrashi SC. 1975. Studies on Indian medicinal plants constituents of *Ananas comosus* leaves. **Indian Journal of Chemistry**, 13: 755-756.
- Pereira APA. 2013. **Qualidade pós-colheita de abacaxi “Pérola” e “Turiaçu”: influência das condições de armazenamento e avaliação sensorial**. Universidade Estadual do Maranhão. Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, 82p.
- Pérez-Jimenez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goni I, Saura-Calixto F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, 41(3): 274-285.
- Proença SL and Sajo MG. 2007. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo. **Acta Botanica Brasílica**, 21: 657-673.
- Reinhardt DH, Souza LFS, Cabral JRS. 2000. **Abacaxi**. Produção: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 77p.
- Rizzini CT. 1997. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. 2ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda, 747p.
- Roberts WK and Selitrennikoff CP. 1990. Zeamantin, an antifungal protein from maize with membrane permeabilizing activity. **Journal of General Microbiology**, 136: 1771-1778.

- Sati SC and Joshi S. 2011. Aspects of antifungal potential of ethnobotanically known medicinal plants. **Research Journal of Medicinal Plant**, 5: 377-391.
- Schmidt TJ, Bomme U, Alfermann AW. 1998. Sesquiterpene lactone content in leaves of in vitro and field cultivated *Arnica montana*. **Planta Medica**, 64(3):268-270.
- Silva MLC, Costa RS, Santana A dos S, Koblitz MGB. 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, 31(3):669-682
- Silva S and Tassara H. 2001. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Nobel, p.25-27.
- Silva S, Anselmo M da GV, Dantas WM, Rosa JH, Nunes EM, Soares JP, Alves AB. 2014. Conhecimento e uso de plantas medicinais em uma comunidade rural no município de Cuitégi, Paraíba, Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, 8(1): 248-265.
- Soares LMV, Shishido K, Moraes AMM, Moreira VA. 2004. Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24 (2)202-206.
- Sousa MSB, Vieira LM, Lima A. 2011. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, 14 (3): 202-210.
- Takata RH and Scheuer PJ. 1976. Ananasic acid: A new trihydroxytriterpenecarboxylic acid from pineapple stems. **Tetrahedron**, 32: 1077-1080.
- Thé PMP, Nunes R de P, Moreira da Silva LIM, Araújo BM. 2010. Características físicas, físico-químicas, químicas e atividade enzimática de abacaxi cv smooth cayenne recém colhido. **Alimentos e Nutrição**, 21(2):273-281.
- Tysnes BB, Maurer HR, Porwol T, Probst B, Bjerkvig R, Hoover F. 2001. **Bromelain reversibly inhibits invasive properties of glioma cells**. *Neoplasia*, 3 (6): 469-479.
- Vaillant F, Millan A, Dornier M., Decloux M, Reynes M. 2001. Strategy for economical optimization of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, 48: 83-90.
- Versieux LM and Wendt T. 2007. Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, 16: 2989–3009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1998. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneve, Switzerland.
- Xie WD, Wang W, Su H, Xing DM, Pan Y, Du Lj. 2006. Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 143: 429–435.
- Xie W, Xing D, Sun H, Wang W, Ding Y, Du LJ. 2005. The effects of *Ananas comosus* L. leaves on diabetic-dyslipidemic rats induced by alloxan and a high-Fat/high-Cholesterol Diet. **The American Journal of Chinese Medicine**, 33 (1): 95-105.