

Larry Ladislao Ramos Paredes

CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL DOS CARBOIDRATOS DE YACON
(*Smollanthus sonchifolius*) E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E REOLÓGICAS DOS
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

CURITIBA
2015

Larry Ladislao Ramos Paredes

CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL DOS CARBOIDRATOS DE YACON
(*Smollanthus sonchifolius*) E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E REOLÓGICAS DOS
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA

2015

Orientador: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki

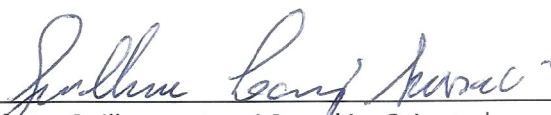
Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

TERMO DE APROVAÇÃO

LARRY LADISLAO RAMOS PAREDES

Caracterização estrutural dos carboidratos de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)
e propriedades biológicas e reológicas dos frutooligossacarídeos

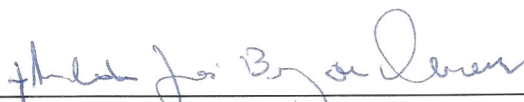
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no
curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



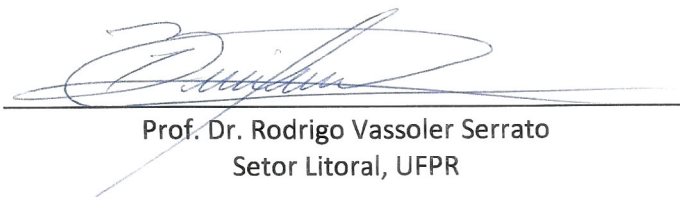
Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki – Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



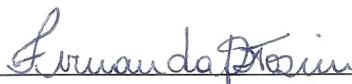
Prof.ª Dr.ª Yanna Dantas Rattmann
Departamento de Farmacologia, UFPR



Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira
Departamento de Farmácia, UEM



Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato
Setor Litoral, UFPR



Dr.ª Fernanda Fogagnoli Simas Tosin
Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 13 de abril de 2015.

Dedico este trabalho...
A meus pais Ladislao e Yolanda

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Brasil pela oportunidade de conhecer uma cultura que me enriqueceu, me deu amigos que levo no meu coração e a oportunidade de trocar ideias com pesquisadores que abriram meus olhos à ciência. Agradecer à UFPR, em especial ao programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, aos professores do departamento, ao grupo de carboidratos do qual sou parte e compartilhei dúvidas, frustrações, tristezas, alegrias, sonhos e esperança.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Sasaki e meu co-orientador Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela oportunidade, confiança e conselhos durante o desenvolvimento desta tese. A banca interna Fernanda e Lucimara pelas dicas, experiência e paciência.

Agradecer as técnicas Elis, Rossane, pelas análises do GPC e GC-MS, ao Arquimedes pelo análise de GC-MS, aos “técnicos” do Centro de RMN, Fernanda pela ajuda nos testes de fagocitose, Flavia e o Prof. Dr. Edvaldo nos testes de proliferação celular, Rhayla e Fernanda na reologia, Lauro no ESI-MS, o Prof. Dr. Luciano no MALDI-TOF, a Melina e Andressa no teste do Yariv, ao Thiago e a Cristiane pelo microscópio óptico, Rocío pelo SDS-PAGE e ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Aos meus amigos e revisores do português e inglês Carolina, Helyn, Elaine, Viewfried, aos amigos Aramis, Kassandra, Angelico, Rocío, Pepe, Daniel, Adelaide, Isabel, Tina. As amigas do “Coffee-break” (Vovo, tia Helyn e Elaine) pela risada, paciência, dicas, sempre prontas a me ajudar, aprendi muito de vcs, as levo no meu coração. Aos parceiros do grupo de carboidratos, a Nessana, Camila S, Lauro, Rodrigo, Popó, Aramis, Arquimedes, Alex, Nadi, Aline, Ana H., Andrea, Thaísa, Georgia, Roberta, Vanessa, Carolina (Vovo), Helyn, Ana, Pedro, Yony, Fher, Fer, Elaine, Kassandra, Camila, Valquiria, Liana, saiban que lembro e lembrarei-me de vocês. Ao PEC-PG, CAPES pelo apoio financeiro. E quero agradecer muito em especial a esses amigos que fizeram que eu tivesse saudades de Curitiba e do Brasil, a esses amigos que me fizeram pensar que estava em casa. **MUITO OBRIGADO!**

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

Smallanthus sonchifolius (yacon) é uma planta da família *Astereaceae* cuja raiz fez parte da dieta dos povos Pré-Incas e Incas nos Andes da América do Sul, e suas folhas são utilizadas no preparo de chás para o tratamento de doenças, como o diabetes. Esta armazena frutooligossacarídeos nas raízes, os quais são considerados prebióticos. Estudos indicam sua utilização na regularização de funções intestinais e até na redução da proliferação de células cancerígenas. Neste trabalho foram extraídos, isolados e identificados quimicamente os frutooligossacarídeos (FOS) e arabinogalactanas-proteínas (AGPs) das raízes e folhas de yacon, respectivamente. Além disso, foi testada a influência dos FOS na fagocitose de leveduras por macrófagos (derivados de monócitos THP-1), na proliferação de melanoma murino (linhagem celular B16-F10) e o seu comportamento reológico. As raízes descascadas foram picadas, congeladas liofilizadas, deslipidificadas e submetidas a extração aquosa com água fervente. O extrato foi precipitado com 3 volumes de etanol, sendo o sobrenadante concentrado a vácuo (60 °C), congelado e liofilizado, este foi isolado por ultrafiltração e caracterizado como uma mistura de glucose, frutose e FOS de cadeia linear (RYPFR5). Os FOS se iniciam com uma unidade de glucose α -(1→2)-ligada a frutose β -D-(1→2) que se liga a outra frutose até alcançar um grau de polimerização de 10 unidades. RYPFR5 aumentou o índice de fagocitose de macrófagos e estimulou a proliferação de células B16-F10 (de melanoma murino). Visando utilizar RYPFR5 em alimentos processados, foram realizados estudos reológicos, RYPFR5 apresentou comportamento Newtoniano e Pseudoplástico. Visando um maior entendimento dos carboidratos de yacon, as suas folhas também foram estudadas, estas, foram secas, trituradas, deslipidificadas e submetidas à extração com água fervente, este extrato foi precipitado com 3 volumes de etanol e o precipitado foi separado, congelado e liofilizado. As AGPs deste extrato foram isoladas por ultrafiltração e identificadas como AGPs de estrutura compacta, provavelmente do tipo “Wattle Blossom” modificado, análise realizada a esta AGP indica que possui uma cadeia peptídica conformada por: valina, isoleucina, serina, ácido glutâmico, alanina, hidroxiprolina, asparagina, fenilalanina, treonina, glicina e arginina, esta cadeia se encontra ramificada com arabinogalactanas do tipo II (AG II) O-ligadas a serina ou treonina, estas se apresentam em três diferentes tamanhos. Estas AG II foram caracterizadas estruturalmente e apresentam uma cadeia principal de unidades de β -D-Galp-(1→3) ligada, ramificadas em (O-6) por terminais de β -D-Galp, além destes, também foram encontradas ramificações em O-6 por α -L-Rhap-(1→2)-ligada α -L-Rhap e/ou α -L-Araf-(1→5)- α -L-Araf-(1→5)- α -L-Araf-(1→5)- α -L-Araf. Determinar as estruturas dos carboidratos necessita de complexas e variadas técnicas, sendo importante a combinação destas, nesta tese foram expostas algumas técnicas que permitiram a elucidação de FOS e AGPs de yacon, os FOS se apresentaram como imunomoduladores favorecendo a fagocitose de macrófagos, provavelmente como uma resposta à estrutura química dos FOS e por sua composição química beneficiou a proliferação de células B16-F10.

Palavras-chave: *Smallanthus sonchifolius*. Yacon. Frutooligossacarídeos. Arabinogalactanas-proteínas. Fagocitose. Proliferação celular.

ABSTRACT

Smallanthus sonchifolius (yacon) is a *Astereacea*, the root was part of the diet of people Pre-Inca and Inca in the Andes of South America; the leaves were used as teas for health care (especially diabetes). This *Astereacea* stores fructooligosaccharides in the roots, which are considered prebiotics and investigations indicate their use in its regularization of intestinal functions to reduce the proliferation of cancer cells. In this work were extracted, isolated and identified fructooligosaccharides (FOS) and arabinogalactan-proteins (AGP), in addition, was tested the influence of fructooligosaccharides in the phagocytosis of yeast (by macrophages derived from THP-1 monocytes), and proliferation of murine melanoma (B16-F10 cell line), furthermore their rheological properties. The roots were peeled, cut, frozen and dried by lyophilization, defatted and extracted with boiling water. This extract was separated by precipitation with 3 volumes of ethanol, the supernatant was concentrate to vacuum and 60 °C, frozen and lyophilized, the resulted fructooligosaccharides were isolated by ultrafiltration and identified as glucose, fructose and linear chain fructooligosaccharides (LYPFR5), which initiaes with a glucose α -(2 \rightarrow 1)-linked to β -D-(2 \rightarrow 1) fructosyl units which can enlarge its chain until to reach a degree of polymerization of 10. The fraction LYPFR5 increased the phagocytic index in macrophages and the proliferation of murine melanoma. LYPFR5 also exhibited a pseudoplastic behavior when tested its rheological properties. The leaves of yacon were dried, milled and defatted, extracted with boiling water, and precipitated with 3 volumes of ethanol, the precipitate was frozen and lyophilized. The arabinogalactan-proteins (AGPs) of this extract were isolated by ultrafiltration and identified as AGPs probability "Wattle Blossom" type, which contains a peptide core of valine, isoleucine, serine, glutamic acid, alanine, hydroxyproline, asparagine, phenylalanine, threonine, arginine, glycine and arginine, This core peptide is linked covalently with arabinogalactan type II (with 3 diferents sizes) linked to serine or threonine (O-glycan linked) which exhibit a main chain of β -D-Galp-(1 \rightarrow 3), branched on (O-6) by β -D-Galp, as well as, by linked to O-6 with units of β -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- β -D-Rhap and/or α -L-Araf-(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf. To determination the structure of carbohydrates need of complex and different tecnic, is important the combination this, in this thesis were exposed some techniques that have allowed the elucidation of AGPs and FOS of yacon, FOS presented as immunomodulators, promoting phagocytosis of macrophages, most likely as a response to the chemical structure and its chemical composition has benefited the proliferation of line cell B16-F10.

Keywords: *Smallanthus sonchifolius*. Yacon. Fructooligosaccharides. Arabinogalactan-proteins. Phagocytosis. Cell proliferation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I	23
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PECTINA	24
FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS DE PLANTAS SUPERIORES.....	27
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ESTRUTURAS DE AGP/GLICANOS	29
FIGURA 5 – MODELOS DE SINALIZAÇÃO E ADESÃO CELULAR ENVOLVENDO AGPs.....	30
FIGURA 6 - SISTEMA IMUNE	32
FIGURA 7 – RECEPTORES DE PADRÕES DE RECONHECIMENTO CELULAR (PAMP).....	33
FIGURA 8 - FAGOCITOSE.....	34
FIGURA 9 - ETAPAS DA PROGRESSÃO DO MELANOMA (MODELO DE CLARK).36	
FIGURA 10 - CURVAS TÍPICAS DE FLUÍDOS.....	39
FIGURA 11 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO YACON.....	41
FIGURA 12 – DIAGRAMA DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DOS FOS	46
FIGURA 13 – DIAGRAMA DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS AGPS	47
FIGURA 14 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-IR DA FRAÇÃO RYPF	64
FIGURA 15 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO RYPF5R	64
FIGURA 16 - CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DA FRAÇÃO RYPFR5..65	
FIGURA 17 – ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO RYPF5R	67
FIGURA 18 – ESPECTRO DE ESI-MS DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DE FOS DE YACON	67
FIGURA 19 - ESTRUTURA DOS FOS DA FRAÇÃO RYPFR5	68
FIGURA 20 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO LYHWS	69
FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO LYHWR10	70
FIGURA 22 - TESTE DO YARIV PARA A FRAÇÃO LYHWR10	70
FIGURA 23 - CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DA AGP DE YACON APÓS HIDROLISE ÁCIDA TOTAL	71
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AGP DE YACON	72
FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN HSQC-(¹ H E ¹³ C) DA AGP DE YACON.....	73

FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN HSQC-(¹ H E ¹³ C) DA AGP APÓS DEGRADAÇÃO DO PEPTÍDEO	73
FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN HSQC-(¹ H E ¹³ C) DA PORÇÃO GLICÍDICA DE AGP	74
FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN HSQC-(¹ H E ¹³ C) (EDITADO EM DEPT) PRESENTES NO POLISSACARÍDEO DA AGP DE YACON	75
FIGURA 29 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS AMINOÁCIDOS DA AGP DE YACON.	76
FIGURA 30 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA BIDIMENSIONAL DOS AMINOÁCIDOS DA AGP DE YACON	77
FIGURA 31 – DISTRIBUIÇÃO-MM vs VOLUME DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA AGP DE YACON.....	79
FIGURA 32 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA AGP DE YACON, COMPARAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	80
FIGURA 33 - PERFIL DE ELUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA AGP DE YACON APÓS DEGRADAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	81
FIGURA 34 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS AG DA AGP DE YACON (MASSA MOLAR/VOLUME)	81
FIGURA 35 – ESTRUTURA DA AGP DE YACON PROPOSTA.....	82
FIGURA 36 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT	83
FIGURA 37 - FAGOCITOSE DE LEVEDURAS POR MACRÓFAGOS	84
FIGURA 38 - CÁLCULO DO % DE FAGOCITOSE E ÍNDICE DE FAGOCITOSE	84
FIGURA 39 - FAGOCITOSE E ÍNDICE DE FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS	85
FIGURA 40 - PROLIFERAÇÃO CELULAR DE B16F10 EM PRESENÇA DE FOS	87
FIGURA 41 - MICROSCOPIA DE VARREDURA DE CÉLULAS B16F10.....	88
FIGURA 42 - CURVAS DE FLUXO DE FOS CONCENTRADO	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TAXONOMIA DO YACON (<i>S. SONCHIFOLIUS</i>)	42
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AGP DE YACON	71
TABELA 3 – ANÁLISE DOS ALDITOIS ACETATOS PARCIALMENTE METILADOS (PMAA) DOS POLISSACARÍDEOS DA AGP DE YACON	76
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS DA AGP DE YACON POR GC-MS	78
TABELA 5 – POLISSACARÍDEOS ELUIDOS APÓS DEGRADAÇÃO DO PEPTIDEO DA AGP DE YACON.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS

Compostos químicos

β GlcY	- (1,3,5-tri(p-glicosilxifenilazo)-2,4,6-tri-hidroxibenzeno)
Ala	- Alanina
Araf	- Arabinose furanosídica
Arg	- Arginina
Asp	- Asparagina
BaCO ₃	- Carbonato de bário
CaCl ₂	- Cloreto de cálcio
CH ₃ I	- Iodeto de metila
CH ₃ OH	- Metanol
CHCl ₃	- Clorofórmio
CO ₂	- Dióxido de carbono
CPD	- Ponto crítico
D ₂ O	- Água deuterada
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DP	- Grau de polimerização
EtOH	- Etanol
Galp	- Galactose piranosídica
GalpA	- Ácido galacturônico piranosídico
Glu	- Ácido glutâmico
Gly	- Glicina
HCl	- Ácido clorídrico
H ₂ O	- Água
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
Hyp	- Hidroxiprolina
Ile	- Isoleucina
kDa	- Kilo Daltons
KOH	- Hidróxido de potássio
LPS	- Lipopolissacarídeo
MEM	- Meio essencial mínimo de Eagle
MTT	- Brometo de (3- metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio)
NaBH ₄	- Borohidreto de sódio

NaBD ₄	- Borohidreto de deutério
NaCl	- Cloreto de sódio
NaClO	- Hipoclorito de sódio
NaNO ₂	- Nitrito de sódio
NaN ₃	- Azida de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	- Hidróxido de amônio
PBS	- Tampão fosfato-salina
Phe	- Fenilalanina
PMAA	- Alditol acetato parcialmente <i>O</i> -metilado
RGI	- Ramnogalacturonana tipo I
RGII	- Ramnogalacturonana tipo II
Rhap	- Ramnose piranosídica
Ser	- Serina
TFA	- Ácido trifluoracético
Thr	- Treonina
Val	- Valina

Amostras, extratos e frações

AGP	- Arabinogalactana-proteína
FOS	- Fructooligossacarídeos
LYHWS	- Fração aquosa solúvel ao gelo-degelo
LYHWR10	- Fração retida (ultrafiltrada) em membrana de 10 kDa
RYPF	- Sobrenadante etanólico de raiz de yacon
RYPFR5	- Sobrenadante etanólico de raiz de yacon retida em membrana de 5 kDa

Técnicas e termos associados às técnicas de análise

α	- Alfa
β	- Beta
δ	- Delta (deslocamento químico (ppm))
EI	- Ionização de elétron
ESI-MS	- Ionização por spray de elétrons
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica
HSQC	- Heteronuclear single quantum coherence
IR	- Índice de refração
K ⁺	- Cation de potássio
LS	- Espalhamento da luz
<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
MALLS	- Espalhamento de luz multi-ângulo
MS	- Espectrometria de massas
NMR	- Ressonância magnética nuclear
PMAA	- Alditol Acetato Parcialmente Metilado
Q-HSQC	- Quantitative heteronuclear single quantum coherence
Rt	- Tempo de retenção relativo
SEC	- Cromatografia de exclusão estérica
TIC	- Análise de íons totais
TLC	- Cromatografia em camada delgada
UV	- Ultravioleta

Análises Estatísticas

ANOVA - Análise de variância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 CARBOIDRATOS DE ORIGEM VEGETAL.....	22
3.1.1 Frutanos, carboidratos de reserva e prebióticos	25
3.1.2 Arabinogalactanas-proteínas.....	28
3.2 Atividades biológicas de polissacarídeos vegetais.....	31
3.2.1 Sistema imune e atividades imunomoduladoras de polissacarídeos	32
3.2.2 Melanoma e atividade antitumoral de polissacarídeos.....	35
3.2.3 Reologia de carboidratos.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL	43
4.2 DESLIPIDIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	43
4.2.1 Extração com água fervente das folhas e das raízes.....	43
4.2.2 Extração com KOH 2% e 10% das folhas	44
4.3 FRACIONAMENTO DOS CARBOIDRATOS.....	44
4.3.1 Congelamento e descongelamento	44
4.3.2 Ultrafiltração	45
4.3.2.1 Fracionamento das arabinogalactanas-proteínas por ultrafiltração	45
4.3.2.2 Fracionamento dos frutooligossacarídeos por ultrafiltração	45
4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS CARBOIDRATOS ISOLADOS.....	47
4.4.1 Composição monossacarídica	47
4.4.1.1. Composição monossacarídica da arabinogalactana-proteína.....	47
4.4.1.2 Composição monossacarídica dos frutooligossacarídeos.....	49
4.4.2 Metilação dos carboidratos e análise na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados	49
4.4.3 Análise da composição dos aminoácidos da arabinogalactana-proteína	50
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	50
4.5.1 Cromatografia de camada delgada	50
4.5.1.1 Cromatografia de camada delgada dos monossacarídeos constituintes da arabinogalactana-proteína	50

4.5.1.2 Cromatografia de camada delgada dos frutooligossacarídeos.....	51
4.5.1.3 Cromatografia monodimensional e bidimensional de camada delgada dos amino-ácidos da arabinogalactana-proteína	51
4.5.2 Métodos Espectrofotométricos	51
4.5.2.1 Dosagem de açúcar total.....	52
4.5.2.2 Dosagem de ácidos urônicos	52
4.5.2.3 Dosagem de proteínas	52
4.5.3 Método Espectroscópico	52
4.5.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	52
4.5.3.2 Análise de espectrometria de massa com ionização por spray de elétrons (ESI-MS).....	53
4.5.4 Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos e de índice de refração e ultravioleta (HPSEC-MALLS/RI/UV)	53
4.5.5 Detecção e quantificação por GC-MS de lipopolissacarídeos em polissacarídeos através de ácidos graxos 3- <i>O</i> -acetil metil esterificados.....	54
4.5.6 Detecção do AGP pelo teste do Yariv.....	54
4.6 HIDRÓLISE ALCALINA DA ARABINOGALACTANA-PROTEÍNA COM NaOH/NaBH ₄	55
4.7 OXIDAÇÃO POR NaClO	55
4.8 TESTES BIOLÓGICOS	56
4.8.1 Cultivo celular.....	56
4.8.1.1 Cultivo celular de monócitos THP-1	56
4.8.1.2 Cultivo celular da linhagem de melanoma murino (B16-F10).....	56
4.8.2 Diferenciação de monócitos THP-1 a macrófagos	57
4.8.3 Determinação da viabilidade celular de monócitos THP-1	57
4.8.4 Determinação da atividade fagocítica em monócitos THP-1	58
4.8.5 Determinação de proliferação celular da linhagem de melanoma murino (B16-F10).....	59
4.9 CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO FLUXO DOS FOS	60
4.10 MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	61
4.11 EXPRESSÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FOS	63

5.2 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE AGPs	68
5.2.1 Caracterização dos peptídeos da AGP de yacon.....	76
5.3 FOS DE YACON: CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE SOBRE A FAGOCITOSE DE LEVEDURAS POR MACRÓFAGOS	83
5.4 INFLUÊNCIA DOS FOS DE YACON NA PROLIFERAÇÃO E MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16-F10	86
5.5 REOLOGIA DOS FOS DE YACON.....	89
6 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos de origem vegetal vêm sendo utilizados na medicina popular há muito tempo. Nas últimas décadas, cientistas reportaram algumas destas atividades biológicas, entre elas temos a antiviral, antitumoral, imunestimulante, anti-inflamatória, anticomplemento, antinociceptiva, anticoagulante, hipoglicemiante e atividade antiúlcera gástrica, entre outras (ERDMANN DO NASCIMENTO et al., 2015; SILVEIRA, et al 2014; SIMAS-TOSIN et al., 2014; BRAZ DE OLIVEIRA et al., 2013; DARTORA et al., 2013; NERGARD et al., 2005; CAPEK et al., 2003; DUAN et al., 2003). As folhas de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) são usadas em forma de chá no tratamento da diabetes e de distúrbios digestivos pela medicina popular há três mil anos pelos povos andinos (LACHMAN; FERNÁNDEZ; ORSÁK, 2003). A raiz de yacon há adquirido interesse científico desde 1990 por trabalhos realizados por Goto, et al. (1995), Ohyama, et al. (1990), Asami, et al. (1991) e outros, inicialmente por suas propriedades prebióticas.

As raízes de yacon não armazenam carboidratos em forma de amido, mas acumulam frutanos (polímeros lineares ou ramificados de frutose) que os diferencia da maioria das espécies vegetais. Os frutanos de baixa massa molecular têm sabor adocicado (NIETO, 1991). Os frutanos de cadeia maior, como a inulina não apresentam este sabor adocicado e podem ser usados como adoçante natural. Essa característica permite que este carboidrato possa ser utilizado por pessoas diabéticas ou com restrições alimentares, representando um potencial a ser explorado tanto pela indústria farmacêutica quanto alimentícia (OHYAMA et al., 1990). Devido ao alto teor de frutooligosacarídeos (FOS) presentes nas raízes de yacon, este vem sendo produzido em alguns países do sul da Europa em grandes quantidades com o objetivo de produção de etanol e inulina, a partir da ligação de FOS até atingir um grau de polimerização (DP) de 50 (ZARDINI, 1991).

Aybar et al. (2001) demonstraram efeitos hipoglicêmiantes do extrato aquoso das folhas de yacon em ratos e verificaram que a administração intraperitoneal ou via gástrica diminuíram os níveis de glicose no plasma. Por outro lado Valentova et al. (2005) testaram extratos metanólicos, e todos os extratos exibiram um efeito protetor contra o dano oxidativo em concentrações de 1 – 1000 µg.mL⁻¹, sendo que

a dose de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, reduz a produção de glicose hepática via gliconeogênese e glicogenólise.

Dentre os carboidratos estruturais as arabinogalactanas são estudadas devido as suas propriedades físico-químicas e atividade biológica, como por exemplo, a atividade antiúlcera (CIPRIANI et al., 2008; CIPRIANI et al., 2009; TANAKA et al., 2010), em processos de regulação inflamatória (GRÖNHAUG et al., 2011), propriedades imunológicas (BRECKER et al., 2005) e na ativação do sistema de complemento (NERGARD et al., 2005; INNGJERDINGEN et al., 2005; WAGNER e JORDAN, 1988). Grieshop et al. (2002) demonstraram que as arabinogalactanas podem afetar a fisiologia digestiva e as características imunológicas de cachorros. As arabinogalactanas são polímeros complexos, de difícil caracterização, presentes na maioria das plantas superiores, encontradas nas mais diversas estruturas vegetais, tendo sido isoladas a partir de folhas, caules, raízes, flores, sementes, gomas e exsudatos vegetais (FINCHER et al., 1983). Aspinall (1973) classificou as arabinogalactanas de plantas superiores em dois grandes grupos, arabinogalactanas tipo I (AG I), e as arabinogalactanas tipo II (AG II). As AG II encontram-se também unidas a lipídios e a peptídeos, assim temos as arabinogalactana-proteínas (AGPs). Estes compostos se encontram na superfície celular de plantas terrestres e aquáticas (incluindo algas), apresentam um papel essencial no crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo expansão e divisão celular, desenvolvimento reprodutivo, embriogênese somática, diferenciação do xilema em respostas ao estresse abiótico, e em caminhos de sinalização hormonal (ELLIS et al., 2010; SEIFERT; ROBERTS, 2007a). As AGPs apresentam propriedades biológicas consideradas importantes como: prebiótica, hipocolesterolêmica, emulsificante, imunomodulatória, antioxidante, antitumoral, antiviral, anticoagulante, antitussígeno entre outras; propriedades que fazem delas comercialmente importantes para a indústria de alimentos e farmacêutica (PAWLACZYK ET AL., 2010; PETTOLINO, et al., 2006; PAULSEN, 2002; WILLS; BONE; MORGAN, 2000), conforme relatado previamente.

O grupo de carboidratos do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da UFPR têm estudado a caracterização fina de carboidratos complexos e as suas propriedades biológicas *in vivo* e *in vitro* (CANTU-JUNGLES et al., 2015; SILVEIRA, et al 2014; DARTORA et al., 2013; CIPRIANI et al., 2008) Nesta tese foram realizados testes *in vitro* com monócitos THP-1 (sob a supervisão da doutora

Fhernanda Smiderle) e a linhagem celular B16F10 de melanoma murinho (Teste realizado no departamento de Biologia Celular sob a supervisão do professor doutor Edvaldo da Silva Trindade e aluna de mestrado Flavia Santi, e no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR), compondo resultados que serão apresentados no desenvolvimento da tese.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair, isolar, caracterizar estruturalmente FOS e AGPs de yacon (*Smallanthus sonchifolius*), testar a influência de FOS na fagocitose e proliferação celular e a reologia de FOS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extrair, isolar e caracterizar estruturalmente os FOS obtidos a partir das raízes de yacon.

Extrair, isolar e caracterizar estruturalmente as AGPs obtidas a partir das folhas de yacon.

Avaliar o índice de fagocitose de macrófagos (de monócitos THP-1) na presença da fração FOS de raízes de yacon.

Avaliar a proliferação e morfologia de células B16-F10 na presença da fração FOS de raízes de yacon.

Avaliar o comportamento reológico da fração FOS de raízes de yacon.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARBOIDRATOS DE ORIGEM VEGETAL

Nas plantas, os carboidratos existem como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, tais como: glicosídeos cianogênicos e fenólicos, flavonóides glicosilados e glicoproteínas (AVIGAD; DEY, 1997). Os carboidratos são amplamente distribuídos nos tecidos vegetais. Os carboidratos atuam principalmente como: reserva de energia (amido, frutanos entre outros), componentes estruturais (celulose, hemicelulose, pectinas), porções de reconhecimento celular (os oligossacarídeos conjugados a proteínas (glicoproteínas) ou a lípidos (glicolípidos)) ou como agentes de transferência de informações (ácidos nucleicos) (SMITH, 1991).

Embora o amido seja o polissacarídeo de reserva mais comum no reino vegetal, existem exceções em algumas espécies de plantas (SMITH, 1991). Os frutanos estão entre os polissacarídeos de armazenamento alternativos mais generalizados, e as plantas que estocam frutanos são encontradas em uma variabilidade do clima temperado principalmente monocotiledôneas perenes como Liliflorae e Glumiflorae de dicotiledôneas como as famílias Asterales, Campanales e Boraginaceae (LEWIS, 1993). Os frutanos além de se comportarem como carboidratos de reserva de energia, ajudam (pelas propriedades fisicoquímicas de retenção de água) as plantas a se adaptarem às mudanças de condições climáticas (prolongados tempos de seca) (De ROOVER et al., 2000).

Os carboidratos estruturais são os principais constituintes químicos da maioria dos tecidos e células das plantas, isto porque formam a parede celular, que é o suporte estrutural para as células vegetais, entre outras estruturas (REID, 1997). A celulose é um polissacarídeo da parede celular vegetal, presente tanto nas paredes primárias quanto nas secundárias. Constitui de 15 a 30% da matéria seca da parede celular primária e ocupa aproximadamente 15% de seu volume (CARPITA; McCANN, 2000). Este composto fornece resistência (força) aos tecidos vegetais, sendo formado por unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas β -(1→4) (CARPITA; McCANN, 2000). A celulose está presente como microfibrilas localizadas numa matriz entremeada por moléculas não-celulósicas, incluindo

hemiceluloses, pectinas e glicoproteínas, como pode ser observado na Figura 1 (CARPITA; McCANN, 2000). As hemiceluloses são polissacarídeos da matriz da parede celular, distintos de celulose e pectinas, solúveis em álcali e encontrados em paredes celulares primárias e secundárias. Constituem cerca de 20% do peso seco da parede celular e representam um grupo heterogêneo de polissacarídeos em relação aos tipos de monossacarídeos e à natureza das ligações glicosídicas (DEY; BROWNLEADER; HARBORNE, 1997). Em geral se associam à celulose e à lignina na parede celular e são constituídas de longas cadeias, muitas vezes com numerosas ramificações curtas, constituídas de uma ou várias unidades monossacarídicas, que normalmente são diferentes daquelas que constituem a cadeia principal (WHISTLER, 1970).

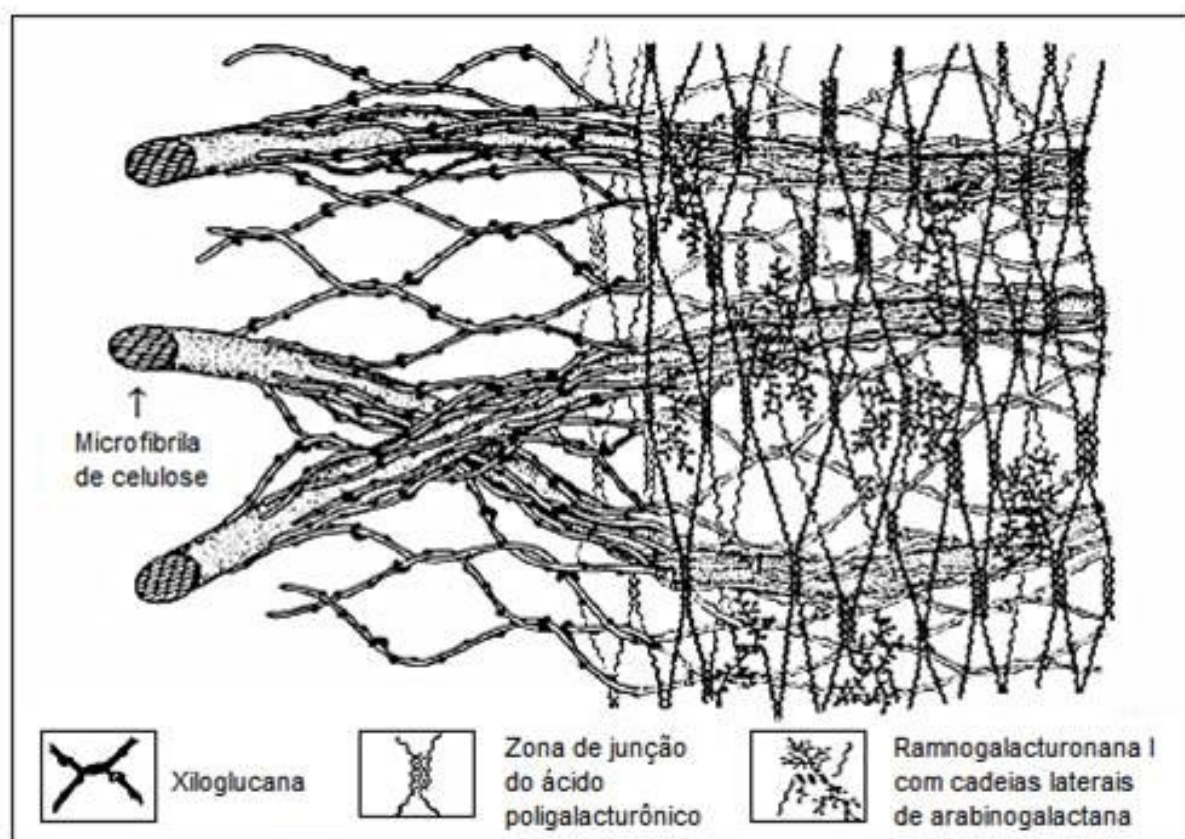


FIGURA 1 - MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I

FONTE: Adaptado de CARPITA; GIBEAUT (1993)

NOTAS: Em destaque as microfibrilas de celulose, xiloglucana, a zona de junção do ácido poligalacturônico e a ramnogalacturonana I

As pectinas somam aproximadamente um terço da matéria seca da parede celular de dicotiledôneas e muitas monocotiledôneas, onde exercem diferentes funções. A maior parte destes polissacarídeos é encontrada na lamela média das

paredes celulares vegetais, onde são importantes para a adesão célula-célula. As pectinas presentes na parede celular primária contribuem para a retenção de água e formação de géis, que influenciam as propriedades mecânicas da parede celular. Quimicamente, as pectinas compreendem uma família de polissacarídeos constituída por homogalacturonanas (HG) e ramnogalacturonanas (RG) (Fig. 2). Homogalacturonanas constituem a região lisa ou *smooth region* das cadeias de pectinas e são homopolímeros de unidades de ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas do tipo α -(1→4) nas quais muitos dos grupos ácidos estão metil-esterificados e também podem, dependendo do tipo de planta, encontrar-se parcialmente O-acetiladas em C-3 ou C-2 (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEM, 2001).

Ramnogalacturonanas constituem a região ramificada ou *hairy region* das pectinas e são divididas em dois tipos: ramnogalacturonanas I (RG-I) e ramnogalacturonanas II (RG-II) (Fig 2).

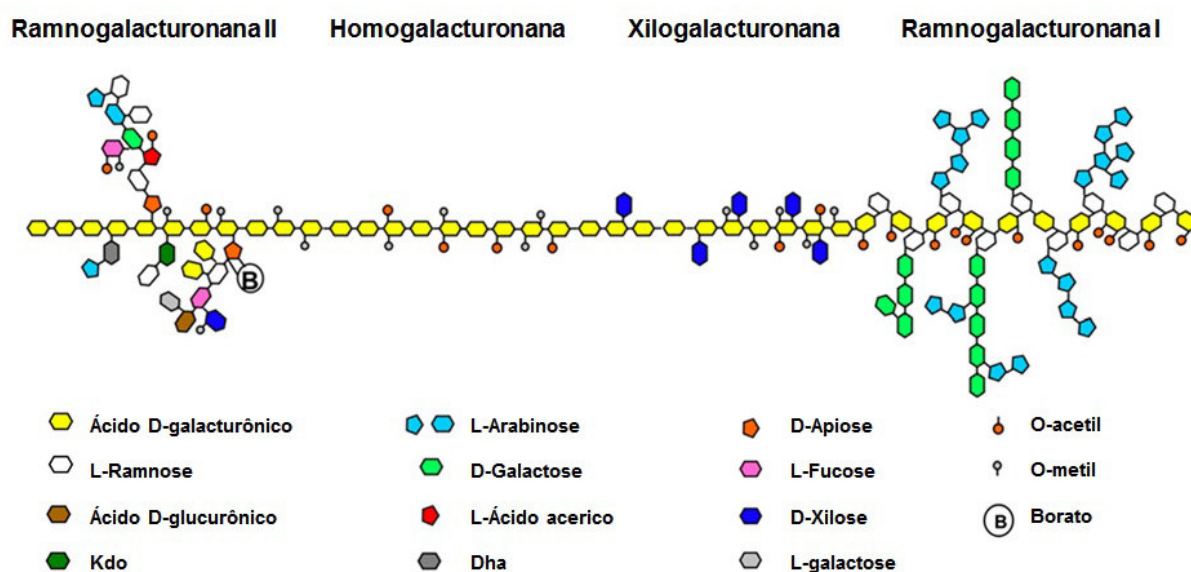


FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PECTINA

FONTE: Adaptado de HARHOLT et al. (2010)

NOTAS: Estrutura da ramnogalacturonana II, Homogalacturonana, xilogalacturonana e ramnogalacturonana I. Dha (ácido 3-Deoxi-D-lixo-2-heptulosarico), Kdo (ácido 3-deoxi-D-manoocto-2-ulosônico)

As RG-I consistem de uma cadeia principal de unidades alternantes de ácido D-galacturônico ligadas α -(1→4) e ramnose ligadas α -(1→2), à qual se ligam cadeias laterais neutras tais como galactanas, arabinanas e arabinogalactanas (OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2002). Outros açúcares podem estar ligados

nas cadeias laterais como: D-xilose, D-glucose, D-manose, L-fucose e ácido D-glucurônico (VORAGEN et al., 1998).

RG-II é o menor e mais complexo polissacarídeo péctico das paredes celulares vegetais (PELLERIN et al., 1995). Contém uma alta proporção de unidades de ramnose ligadas (1→3) e (1→2,3,4) e como unidades terminais (VORAGEN et al., 1998). As cadeias laterais são, geralmente, substituintes em C-2 das unidades de α -D-GalpA e são formadas por oligossacarídeos contendo açúcares pouco usuais, como a fucose, o ácido acérico, a apiose e o ácido 3-deoxi-manoctulosônico (SMITH, 1993).

As arabinogalactanas que se encontram nas RG-I ocorrem em duas formas estruturalmente diferentes. As arabinogalactanas do tipo I têm uma cadeia linear de unidades piranosídicas de D-galactose ligadas β -(1→4) com 20-40% de unidades L-arabinose furanosídicas ligadas α -(1→5) presentes em cadeias laterais curtas conectadas na posição O-3 das unidades de galactose (VORAGEN et al., 1998). As arabinogalactanas do tipo II são polissacarídeos altamente ramificados, com cadeias de unidades de β -D-galactopiranosose unidas por ligações (1→3) e (1→6). As ligações (1→3) predominam nas cadeias internas, enquanto que as ligações (1→6) ocorrem principalmente nas cadeias externas, que são geralmente terminadas por unidades L-arabinofuranose e em alguns casos por unidades L-arabinopiranosose (VORAGEN et al., 1998; THUDE; CLASSEN, 2005). As arabinogalactanas do tipo II podem se encontrar ligadas covalentemente a uma proteína altamente glicosilada, que são conhecidas como arabinogalactanasproteínas (AGPs), estas são moléculas complexas e geralmente específicas de plantas. A porção de carboidratos geralmente compreende 90% da massa das AGPs (JOHNSON et al., 2003).

3.1.1 Frutanos, carboidratos de reserva e prebióticos

Frutanos são carboidratos de reserva com 01-70 unidades de frutose, vinculados ou não a uma molécula de sacarose terminal. Os frutanos podem apresentar uma estrutura linear ou ramificada, com sacarose ligada através de ligações β -(2→1) encontrados, como ocorre em frutanos do tipo inulina (Fig. 3A), ou ligações β -(2→6), como ocorre em frutanos do tipo levano (Fig. 3B). Frutanos do tipo

graminano apresentam ambas ligações β -(2→1) e β -(2→6) alternadamente (Fig. 3C) (VEREYKEN et al., 2003).

Os neoseries inulina possuem duas cadeias de ligações frutossil β -D-(2→1), uma ligada ao C1 da glucose e outra ligada ao C6 da glucose (Fig. 3D). Estes frutanos são encontrados em plantas pertencentes à família *Liliaceae*, por exemplo cebola e aspargos; a menor molécula neoseries inulina é neokestose (SHIOMI, 1989; VIJN; SMEEKENS, 1999).

Os neoseries Levano são polímeros predominantemente com resíduos frutossil com ligações β -D-(2→6), ligados ao C6 da glucose da sacarose. Estes frutanos são encontrados em algumas espécies de plantas pertencentes à família *Poales*, por exemplo, aveia (LIVINGSTONE et al., 1993; VIJN; SMEEKENS, 1999).

As propriedades físico-químicas e funcionais de frutanos tipo inulina estão relacionadas ao grau de polimerização (DP) assim como à presença de ramificações. O DP de frutanos tipo inulina depende de diferentes fatores: espécies de plantas, condições de crescimento, do clima, a colheita e a maturação (APOLINÁRIO et al., 2014). A fração de cadeia curta, oligofrutose, é muito mais solúvel e mais doce do que a inulina nativa e de cadeia longa, e pode contribuir para melhorar o aumento da sensação gustativa porque suas propriedades são intimamente relacionadas com as de outros açúcares. Possui um sabor semelhante ao da sacarose, mas com menor teor calórico ($1-2 \text{ kcal.g}^{-1}$), podendo ser um substituto parcial ou total de sacarose quando combinado com outros edulcorantes não calóricos (GUGGISBERG et al., 2009; TARREGA; ROCAFULL; COSTELL, 2010).

Prebióticos são componentes não digeríveis dos alimentos que beneficiam ao hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento ou atividade de uma ou um número limitado de espécies de bactérias residente no colon e que melhoram a saúde do hospedeiro. Oligosacarídeos não-digeríveis em geral e fructooligosacarídeos em particular são prebióticos (GIBSON & ROBERFROID, 1994).

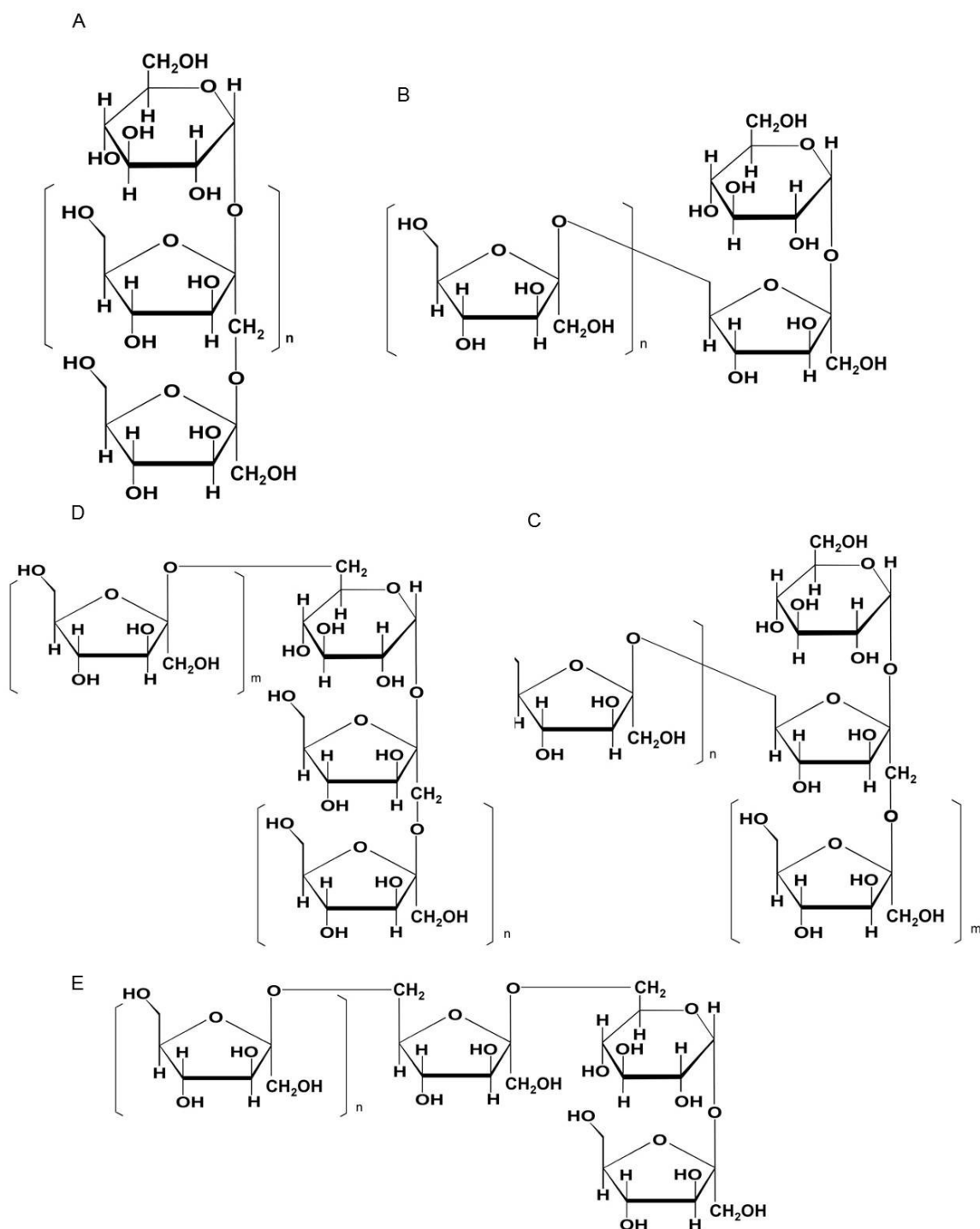


FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS DE PLANTAS SUPERIORES

FONTE: Adaptado de BENKEBLIA (2013)

NOTAS: Todas as estruturas de frutanos apresentam uma sacarose no início ou no meio da cadeia. (A) Grupo de frutanos tipo inulina, a frutose da sacarose possui ligações β -(2 \rightarrow 1) frutosil-frutose. (B) Frutanos tipo levan, a frutose da sacarose possui ligações (2 \rightarrow 6) frutosil-frutose. (C) O grupo ramificado contém ligações frutosil-frutose (2 \rightarrow 1) e (2 \rightarrow 6) desde a frutose da sacarose em quantidades significativas (por exemplo graminan). (D) O grupo Neoserie tipo inulina tem uma cadeia de ligações frutosil-frutose β -(6 \rightarrow 2) da glucose e outra β -(2 \rightarrow 1) frutosil-frutose ligada a frutose (da sacarose). (E) O grupo Neoserie tipo levan possui uma cadeia de ligações frutosil-frutose β -(2 \rightarrow 6) na glucose da sacarose

3.1.2 Arabinogalactanas-proteínas

As arabinogalactanas-proteínas (AGPs) são uma classe muito diversificada de glicoproteínas encontradas em vários domínios de superfície da célula da planta (SERPE; NOTHNAGEL 1999). Numerosos estudos têm indicado que AGPs têm estruturas altamente complexas e tem relações estreitas com peptídeos via sinais secretores, e modificação pós-tradução de glicosilinositolfosfolípídeo (GASPAR et al., 2001; SEIFER; ROBERTS 2007a; ELLIS et al., 2010). Foram descritos as seguintes funções das AGPs em processos biológicos: divisão celular, morte programada, padrões de formação (geração de assimetrias e periodicidades de estruturas simétricas e uniformes, respectivamente), no crescimento e nas interações plantas-microorganismos (SEIFER; ROBERTS 2007a).

AGPs de plantas que consistem de uma estrutura principal de proteína *O*-glicosilada por um ou mais carboidratos complexos que possuem galactose e arabinose como principais componentes (SEIFER; ROBERTS 2007a) (Fig 4). A maioria das AGPs são *O*-glicosiladas em um ou mais resíduos de hidroxiprolina, serina ou treonina por grupos AGs tipo II (CARPITA; GIBEAUT 1993; MAHENDRAN et al., 2008).

Na Figura 4 são apresentados duas formas teóricas das AGPs, a estrutura de “Wattle Blossom” proposta por Fincher et al., 1983 e modificada por Ellis et al., 2010; e a estrutura “Twisted-hairy rope” proposta por Qi et al., 1991.

As arabinogalactanas do tipo II podem ser encontradas na parede celular e na lamela média, são altamente ramificadas e podem ocorrer como ramificação das ramnogalacturonanas da parede celular. A cadeia principal destas moléculas é, geralmente, pequena e constituída por β -D-Galp (1 \rightarrow 3)-ligadas. Porém, podem ainda ser observadas cadeias formadas por β -D-Galp (1 \rightarrow 6)-ligadas, ou ainda β -D-Galp (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas. As ramificações incluem cadeias constituídas por unidades de β -D-Galp, β -D-Galp substituídas em *O*-3 por α -L-Araf e cadeias de α -L-Araf (1 \rightarrow 3)- e α -L-Araf (1 \rightarrow 5)-ligadas (TANAKA et al., 2010; TISCHER et al., 2002).

AGPs estão envolvidas em vários processos de desenvolvimento da planta. Entre estes destacamos o de interações moleculares e sinalização (Fig. 5) (SHOWALTER, 2001).

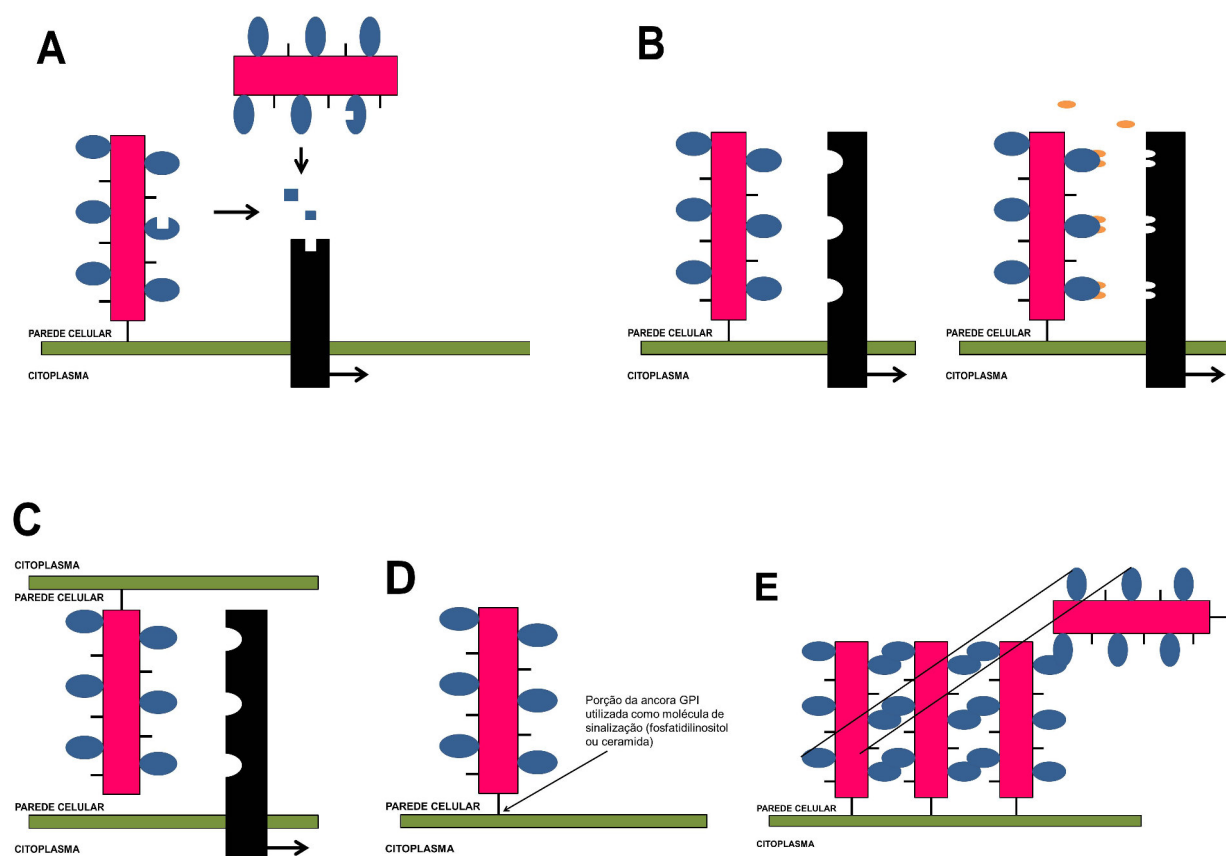


FIGURA 5 – MODELOS DE SINALIZAÇÃO E ADESÃO CELULAR ENVOLVENDO AGPs

FONTE: Adaptado de SHOWALTER (2001)

NOTAS: (A) sinalização através da liberação de um epítipo de hidratos de carbono (quadrados pequenos) de um AGP que se liga a um receptor de membrana plasmática com capacidade para iniciar uma cascata de sinalização intercelular. (B) sinalização por um AGP direta ou indiretamente, após ligação de moléculas elicitórias (elipses laranja) para sua apresentação adequada ao receptor de membrana plasmática. (C) sinalização intercelular por um AGP de uma célula que interage com um receptor da membrana plasmática numa célula adjacente. (D) sinalização pela âncora de GPI (ou uma porção do mesmo) após a liberação de uma AGP GPI ancorada a partir da membrana plasmática. (E) AGPs atuam como moléculas de adesão de células, capazes de agregação na membrana plasmática e a formação de uma ligação de parede celular da membrana plasmática essencial para o crescimento e desenvolvimento normal; estas ligações podem envolver AGP da parede celular ou de outras moléculas da parede celular (linhas pretas), tais como pectinas

3.2 Atividades biológicas de polissacarídeos vegetais

Polissacarídeos de origem vegetal têm demonstrado serem biologicamente ativos quando testados *in vitro* e *in vivo* (SIMAS-TOSIN et al., 2012; CIPRIANI et al., 2006; MORETÃO et al., 2003; CAPEK et al., 2003; NERGARD et al., 2005).

Polissacarídeos vegetais já foram testados quanto a sua capacidade antitumoral e imunomoduladora, de forma direta (em contato direto com os macrófagos) ou indireta (prebióticos, gerando subprodutos). Sampedro et al. (2004) reportaram que mananas de *Aloe saponária* possuem propriedades antiproliferativas para algumas linhagens de células tumorais (C1498 é uma IL-4R⁺ de ocorrência espontânea, C57BL/6 leucemia mielóide, HT29 células humanas de câncer de cólon, PC-12 linhagem celular derivado de um feocromocitoma de rato, CHO linhagem celular de ovário de hamster adulto chinês, L6 mioblasto de rato e NIH 3T3 fibroblasto de camundongo *Mus musculus*). Chen e Tian, (2003) estudaram o frutano de *Cyathula officinalis* Kuan, reportando que este frutano tipo graminano inibe o crescimento do carcinoma pulmonar de Lewis, que tendo sido implantado em camundongos.

Chandrashekar et al. (2010) apresentaram frutanos de alho e reportaram atividade mitogênica e ativação de macrófagos, incluindo a fagocitose, estes pesquisadores reportaram um frutano com propriedades imunomoduladoras similares a mananas e zimosan.

Os frutanos tipo inulina são considerados prebióticos, sendo completamente fermentados no cólon, esta fermentação gera: ácido láctico (metabolizado em ácidos graxos de cadeia curta) e gases, tais como hidrogênio, metano e dióxido de carbono, que são utilizados por bactérias (CHERBUT, 2002). A produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) encontra-se vinculado a manutenção de uma mucosa do cólon saudável, ligado a efeitos benéficos sobre o metabolismo dos lipídeos e carboidratos (CAUSEY et al, 2000;. CHERBUT, 2002; NYMAN, 2002). Há evidências de que os prebióticos podem conferir uma gama de benefícios para a saúde se forem consumidos regularmente (MACFARLANE; MACFARLANE, 2006). Dentre os benefícios estão o aumento na absorção mineral e melhoria da resposta imune (SEIFERT; WATZL, 2007b). Além disto, suspeita-se que os prebióticos desempenham um papel na prevenção do câncer colo-retal sendo também

empregados na terapia do câncer (TAPER; ROBERFROID, 2005) e no controle de peso devido ao seu papel na saciedade durante a ingestão de alimentos (MACFARLANE; MACFARLANE, 2006).

3.2.1 Sistema imune e atividades imunomoduladoras de polissacarídeos

O sistema imunológico é uma rede de células, tecidos e órgãos que exerce a função de defesa do organismo contra bactérias, vírus, toxinas e parasitas. Este sistema desempenha um papel na homeostase geral no corpo, e como tal, responde a sinais de perigo exógenos e endógenos (MATZINGER, 2002). O funcionamento inadequado do sistema imune está envolvido em (i) imunodeficiências (por exemplo, gerando um aumento da susceptibilidade a infecções) (JOOS; TAMM, 2005), (ii) auto-imunidade (por exemplo, a doença celíaca, diabetes tipo I, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (LES)) (MILLER, 1993) e (iii) hipersensibilidade (choque anafilático e alergias) (GHAFAR, 2006). O sistema imunológico é classificado basicamente em dois tipos, imunidade inata e adaptativa (Fig. 6).

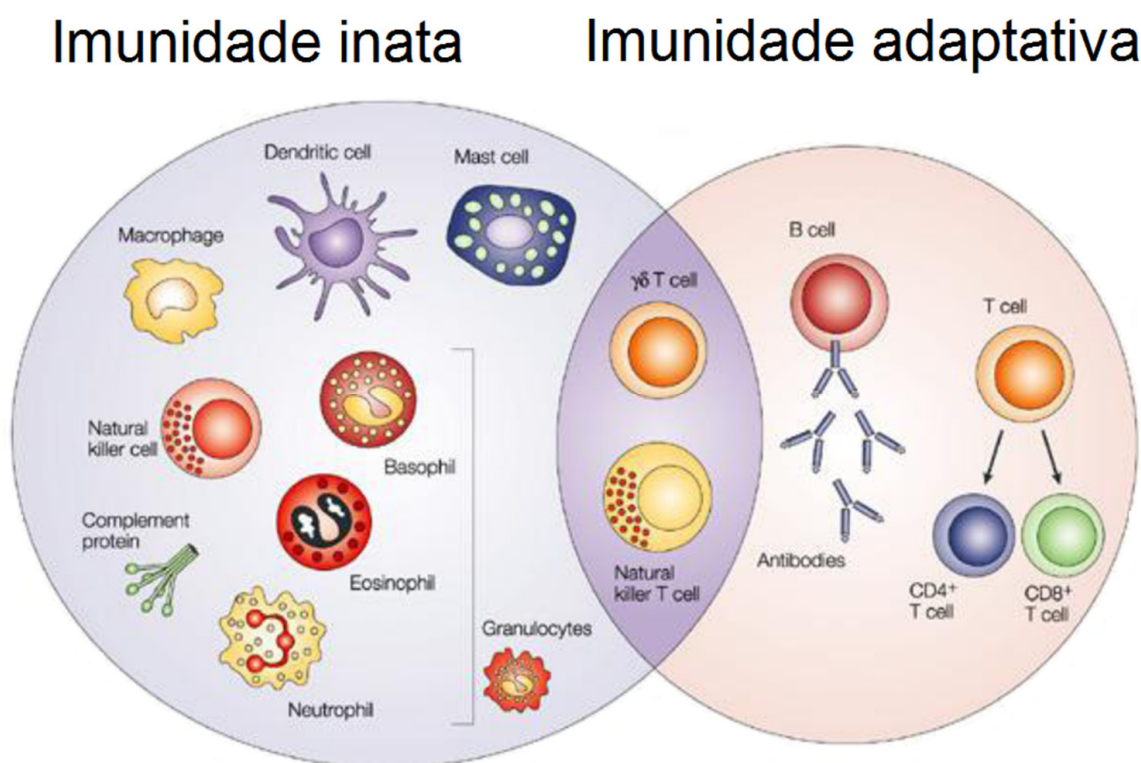


FIGURA 6 - SISTEMA IMUNE

FONTE: Adaptado de DRANOFF (2004)

NOTAS: A imunidade inata é composta de células mastocíticas, dendríticas, macrófagos e granulócitos (Natural killer, basófilos, eosinófilos e neutrófilos). A imunidade adaptativa é composta por células B e T, e as células T natural killer e $\gamma\delta$ T fazem parte das duas respostas

A imunidade inata fornece respostas imediatas não específicas, enquanto a imunidade adaptativa, que é ativada pela resposta inata, fornece respostas específicas, desenvolvendo a memória imune (LITMAN et al., 2005).

O sistema imune possui células especializadas para diferentes respostas imunes, estas desenvolvem funções diferentes, por exemplo, os monócitos transformam-se em macrófagos e os macrófagos fagocitam patógenos invasores e ativam as células T (LITMAN et al., 2005). Os macrófagos estão encarregados de detectar e eliminar organismos invasores e moléculas tóxicas. Suas respostas para estes alvos são rápidas e acionadas por estruturas moleculares, comumente referidas como receptores de PAMPs (*Patterns Pathogen-Associated Molecular*) (Fig. 7) (VEGA; CORBÍ, 2006).

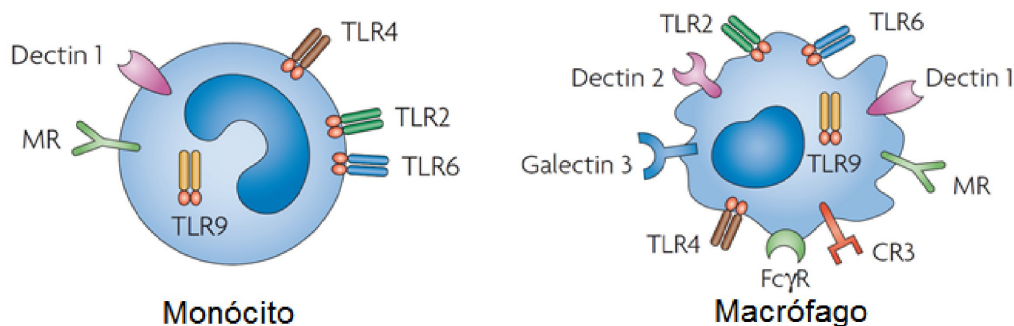


FIGURA 7 – RECEPTORES DE PADRÕES DE RECONHECIMENTO CELULAR (PAMP)
 FONTE: Adaptado de NETEA et al. (2008)
 NOTAS: Receptores de PAMP de monócitos e macrófagos

No processo de fagocitose, os macrófagos reconhecem os agentes patológicos através dos receptores específicos presentes na superfície celular (Fig. 7). Um dos receptores relacionados à fagocitose é o receptor para D-manose, o qual apresenta na sua estrutura domínios de lectina que reconhece especificamente alguns carboidratos, às quais se ligam, permitindo assim, a internalização de polímeros constituídos por manose, L-fucose e N-acetilglucosamina (SHEPHERD et al., 1981; TAYLOR et al., 2005). Estes monossacarídeos são encontrados na parede celular de diversos microorganismos, permitindo aos macrófagos reconhecerem diferentes microrganismos patogênicos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005). Além do receptor de D-manose, já foram descritas diversas classes de receptores presentes na membrana celular dos macrófagos, os quais apresentam funções distintas gerando diferentes respostas. Destacam-se: receptores *Toll like*, receptores *scavenger*, receptores com um único ou com múltiplos domínios lectinas e

integrinas, neste último grupo destacam-se o CR3 (receptor para complemento), a superfamília Ig (imunoglobulina), dectina-1, entre outros (VARIN; GORDON, 2009; SCHEPETKINS; QUINN, 2006; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; TAYLOR et al., 2005; JOHNSON et al., 2003).

A interação de ligantes com receptores específicos permite que os macrófagos englobem grandes partículas como bactérias, leveduras e células mortas, formando uma vesícula chamada endossomo (Fig. 8). A partir da endocitose, ocorre a formação inicial de um endossomo primário, o qual, posteriormente, se funde aos lisossomos, organelas envoltas por membrana celular ricas em enzimas hidrolíticas; nesta etapa, depois de fusionados aos lisossomos, os endossomos passam a ser chamados de endossomos secundários. A partícula ou microrganismo endocitado sofre ação das enzimas lisossomais, produzindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005).



FIGURA 8 - FAGOCITOSE

FONTE: Adaptado de LOPES et al. (2006)

NOTAS: Macrófago apresentando numerosas leveduras internalizadas (levedura sinalizada com uma seta)

Em resposta a ligantes específicos os macrófagos também podem realizar outras funções efetoras, como a produção de citocinas, de fatores de crescimento, fatores angiogênicos e metaloproteinases. Além disso, fazem a degradação de proteínas e processamento de antígenos os quais são apresentados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, para que as células T possam reconhecer as substâncias estranhas ao organismo (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005).

Polissacarídeos e oligossacarídeos variados podem ser ligantes efetivos em diferentes receptores de macrófagos podendo gerar respostas celulares envolvendo a modulação do sistema imune. Por este motivo, estas moléculas vêm sendo objeto de estudos nos diferentes processos de ativação dos macrófagos (JOHNSON et al., 2003; TAYLOR et al., 2005; SCHEPETKINS et al., 2005; SCHEPETKINS; QUINN, 2006; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; VARIN; GORDON, 2009).

A linhagem celular humana THP-1 foi estudada por o grupo de carboidratos do programa, esta linhagem teve a origem a partir do sangue periférico de um menino de 1 ano de idade com leucemia monocítica aguda. Estudos prévios mostraram que as células THP-1 se assemelham a monócitos e macrófagos primários, células THP-1 em suspensão são redondos que expressam marcadores distintos de monócitos. Após a exposição ao forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), células THP-1 em estado de monócitos começam a aderir às placas de cultura e alteram a sua morfologia, que é uma indicação para a diferenciação em macrófagos (TSUCHIYA et al., 1980).

Xiloglucanas de *Copaifera langsdorffii* (XGC), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Mucuna sloanei* (XGM) apresentaram atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal de camundongos, chegando a promover um aumento de aproximadamente 576% em relação ao controle. XGC e XGJ também estimularam a produção de NO[•] em macrófagos peritoneais de camundongos (ROSÁRIO et al., 2008). O polissacarídeo presente na goma de angico branco (*Anadenanthera colubrina*), constituído por arabinose, manose, galactose, ramnose e ácido hexurônico, com a cadeia principal de (1→3)-β-galactopiranosse altamente ramificada, mostrou atividade tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ativando macrófagos e aumentando tanto sua capacidade fagocítica como a produção de ânion superóxido (MORETÃO et al., 2003). Simas-Tosin et al. (2012) reportaram dois polissacarídeos na pulpa do pêssego, um ácido poligalacturônico e uma arabinogalactana do tipo II e decuvriram que a AG tipo II apresentara atividade immunoestimulante quando testada *in vitro*.

3.2.2 Melanoma e atividade antitumoral de polissacarídeos

Melanoma é um tipo de câncer que atinge o tecido epitelial, mais especificamente a pele. Representa 5% dos tipos de câncer da pele, sendo o mais

grave. O melanoma origina-se nos melanócitos, células localizadas na epiderme, responsáveis pela produção de melanina e, portanto, pela cor da pele. Dentre os fatores que podem levar ao desenvolvimento do melanoma estão a predisposição genética, a cor da pele e o comportamento com relação à exposição à radiação ultravioleta (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Clark et al. (1984) divide as fases de progressão do melanoma com base nas suas alterações histológicas. De acordo com este modelo, o primeiro evento do desenvolvimento do melanoma (Fig. 9) é a proliferação dos melanócitos normais, que formam os *nevi* (pintas), e estabelecem lesões benignas, com os melanócitos crescendo uniformemente e de forma limitada ao longo da membrana basal. A lesão pode assumir características que causam perda da homeostase no tecido onde se encontra (*nevus* displásico). Na fase de crescimento radial (RGP) já há capacidade de ultrapassar a membrana basal, mas a proliferação continua sendo confinada às imediações dessa, diferentemente do que ocorre na fase de crescimento vertical (VGP). A última fase do modelo é a metástase, que é quando as células tumorais se desprendem do tumor original e colonizam tecidos distantes.

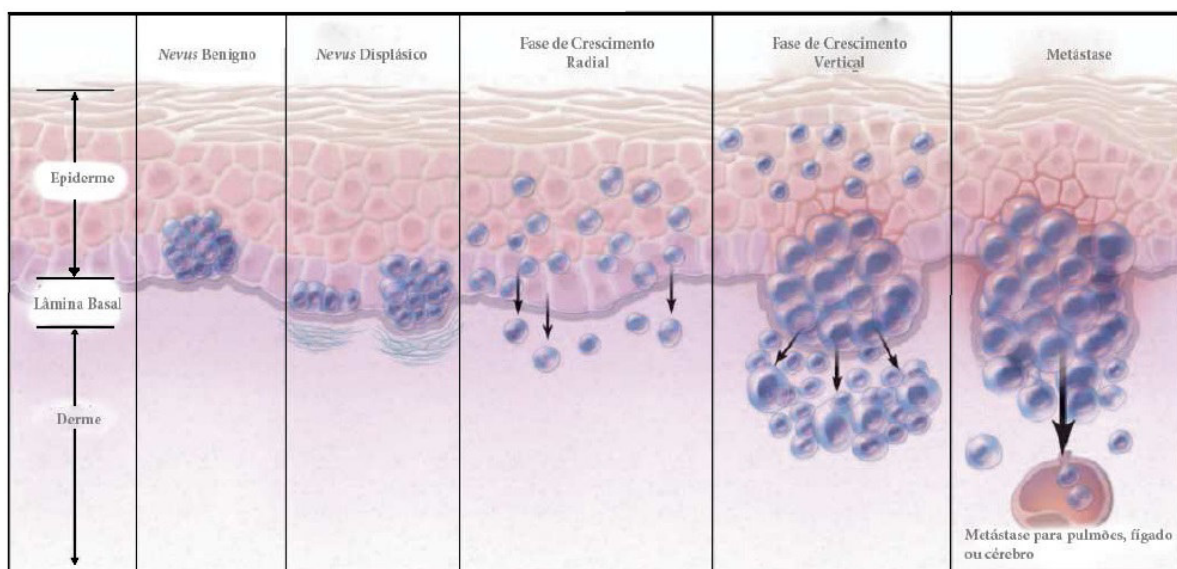


FIGURA 9 - ETAPAS DA PROGRESSÃO DO MELANOMA (MODELO DE CLARK)

FONTE: Adaptado de MILLER e MIHM (2006)

NOTAS: A progressão do melanoma segundo Clark et al. (1984) acontece de esquerda a direita, as setas indicam o caminho no crescimento do melanoma

O tratamento do melanoma depende do diagnóstico, quando a doença está menos avançada a cirurgia para remoção da massa tumoral (MILLER; MIHM, 2006),

seguida de um tratamento com dacarbazina, carboplatina e paclitaxel (TARHINI; AGARWALA, 2006). No caso, onde os linfonodos já foram invadidos os tratamentos podem incluir citocinas como a interleucina-2 e interferon- α , ambos com eficácia duvidosa e com diversos efeitos adversos, agentes quimioterápicos como a carmustina, o paclitaxel e a cisplatina são os fármacos empregados como tratamento, estes fármacos são efetivos em menos de 10% dos casos de melanoma metastático (TARHINI; AGARWALA, 2006). Além da quimioterapia, a radioterapia também pode ser empregada como complemento à intervenção cirúrgica, as consequências da quimioterapia e da radioterapia para os pacientes são notórias: queda dos pêlos, deficiência imunológica, entre outras. Devido a estas limitações quanto à eficácia e efeitos colaterais, novas alternativas de tratamentos ou maneiras de entregar as drogas de forma mais específica aos seus alvos têm sido pesquisadas.

Polissacarídeos possuem propriedades terapêuticas e baixa toxicidade (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Foram reportadas algumas plantas medicinais que possuem polissacarídeos com propriedades biológicas assim como antitumoral (SAMPEDRO et al., 2004). Uma arabinogalactana ácida contendo Ara, Gal, GalA e Rha (5,5:1,4:1,1:1), extraída de *Angelica acutiloba* aumentou a sobrevivência de animais portadores de S-180 em 76% (YAMADA et al., 1990). Macrófagos extraídos de animais tratados *in vivo* com uma arabinogalactana de *Anadenanthera colubrina* (ARAGAL), foram capazes de inibir o crescimento em aproximadamente 39% de células do S-180, detectada quando os animais foram tratados com 100 mg.kg⁻¹ e uma inibição do crescimento de 66% detectada nos animais portadores de tumor ascítico do S-180 tratados com a mesma dose (MORETÃO et al., 2004).

Testes *in vitro* são interessantes na pesquisa devido a sua reprodutibilidade e resultados em farmacologia, atualmente os modelos com animais estão sendo substituídos, quando possível, por modelos *in vitro*. Modelos de camundongos com melanoma tiveram início em 1900, quando tumores melanocíticos surgiram espontaneamente em linhagens puras (DAMSKY; BOSENBERG, 2010; GREEN, 1962). Estes melanomas espontâneos (provavelmente o mais conhecido dos quais é B16) foram transplantados de camundongos congênicos e cultivados, estudados, e manipulados *in vitro*. Devido à utilidade destes modelos, eles têm sido uma ferramenta importante para resolver questões básicas em biologia do melanoma. Na última parte do século 20, os pesquisadores começaram a empregar mutagênicos

como irradiação UV e 7,12- Dimetilbenzoantraceno (DMBA), assim como agentes de promoção de tumores, tais como óleo de cróton/12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) a fim de gerar os melanomas em camundongos (DAMSKY; BOSENBERG, 2010). Bento et al, (2014) reportaram uma arabinogalactana de casca de *Endopleura uchi* apresenta propriedade antiproliferativa em células HeLa.

3.2.3 Reologia de carboidratos

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais sob influência de tensões (BARNES et al., 1994).

Isaac Newton expressou a lei básica da viscosimetria descrevendo o comportamento de fluxo de um líquido através da equação:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \text{ (tensão de cisalhamento = viscosidade x taxa de cisalhamento)}$$

Onde: τ (tensão de cisalhamento) é a força aplicada tangencialmente sobre a área do líquido e é medida em Pa (Pascal); $\dot{\gamma}$ (taxa de cisalhamento) é o gradiente de velocidade nas camadas líquidas da amostra e tem a unidade s⁻¹ e η é a viscosidade, expressa em Pa.s (BARNES et al., 1994). Desta maneira, a viscosidade pode ser matematicamente expressa como sendo a tensão dividida pela taxa de cisalhamento.

Quando os fluidos seguem a lei de Newton da viscosimetria, a viscosidade não depende da taxa de cisalhamento e o fluido é denominado de newtoniano. O que ocorre, porém, com a maioria dos fluidos é que a viscosidade varia dependendo da taxa de cisalhamento e, desta maneira, eles são denominados de não newtonianos. Dentre eles, destacam-se os fluidos pseudoplásticos e dilatantes (Fig. 10) (SCHRAMM, 1998).

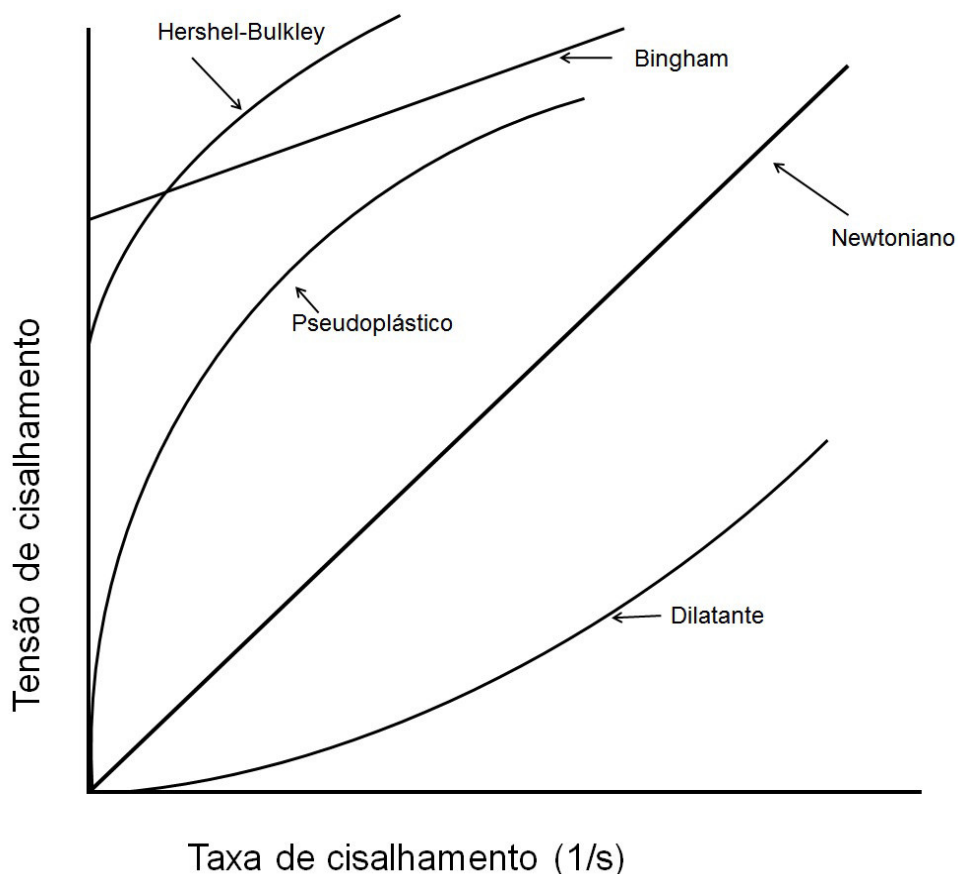


FIGURA 10 - CURVAS TÍPICAS DE FLUÍDOS

FONTE: Adaptado de STEFFE (1996)

NOTAS: As curvas sinalizadas como Hershel-Bulkley, Bingham, Pseudoplástico e Dilatante representam fluidos não Newtonianos

O estudo do comportamento reológico de polímeros e oligos naturais é importante, uma vez que estes podem ser aplicados em diferentes ramos da indústria. Os oligossacarídeos e polissacarídeos apresentam várias características interessantes como a capacidade de modificar as características das soluções aquosas por espessar, emulsificar, estabilizar, além de serem capazes de formar géis, filmes e membranas, capacitando-os de serem utilizados em indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas, de adesivos, tintas, entre outras (LAPASIN; PRICL, 1995; MARTIN, 2003).

3.6 YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

O primeiro registro do yacon é da Argentina, onde foram encontrados restos arqueológicos coletados no “Pampa Grande”, Salta, associados à cultura Candelari,

que se desenvolveu entre 1 e 1.000 anos d.C. Na costa do noroeste do Peru também existem evidências arqueológicas (cerâmicas, tecidos e restos de raízes) relacionadas ao uso de yacon nas culturas de Nazca (500 a.C. – 700 d.C.), Paracas (1.500 – 500 a.C.) e Mochica (500 a.C. – 700 d.C.), recebendo diferentes denominações, entre elas, Yacon, Yacón, Llacon, Llakuma, Aricoma e Jiquima (SEMINARIO, et al., 2003; SEMINARIO, 2004).

O yacon foi introduzido na Europa há mais de 50 anos como uma espécie potencial para a produção de álcool etílico, porém logo foi esquecido e somente redescoberto na década de 80. No Brasil, a espécie foi introduzida por volta de 1989, na região de Capão Bonito (SP), por imigrantes japoneses, que utilizavam suas folhas e raízes tuberosas nos tratamentos contra diabetes e as altas taxas de colesterol no sangue (KAKIHARA et al., 1996). No entanto, somente em 1994 iniciaram-se os primeiros cultivos com finalidade comercial (VILHENA et al., 2000).

A planta de yacon é herbácea, perene, possui de 1 a 2,5 metros de altura. As folhas brotam de gemas do caule aéreo, são opostas, delgadas, apresentam as bordas lobuladas e formam uma ala de cada lado do pecíolo (MONTIEL, 1996; NATIONAL RESEARCH CONCIL, 1989). Até a floração em cada caule se produzem de 13 a 16 pares de folhas (Fig. 11A), depois da floração a planta só produz folhas pequenas. Os caules são cilíndricos, pilosos e ocos na maturação, de cor verde a púrpura. O ramo floral é terminal de ramificação dicásica, composto de inflorescências chamados capítulos. Cada ramo pode ter mais de 40 capítulos (Fig. 11B), estes capítulos possuem cores amarelas e alaranjadas, cada capítulo possui desde 14 até 16 *gineceus* (flores femininas) e de 80 até 90 *androceus* (flores masculinas) (Fig. 11B) (GRAU; REA, 1997).

O yacon tem dois tipos de raízes: fibrosas e de reserva. As raízes fibrosas (Fig. 11C) são finas e fixam a planta ao chão, servindo também para a absorção da água e dos nutrientes. As raízes de reserva (Fig. 11D) são grossas, fusiformes e de forma oval, de cor branca, creme ou púrpura principalmente (SEMINARIO et al., 2003). A parte interna destas raízes de reserva é carnosa podendo-se apresentar nas cores branca, creme ou alaranjada.

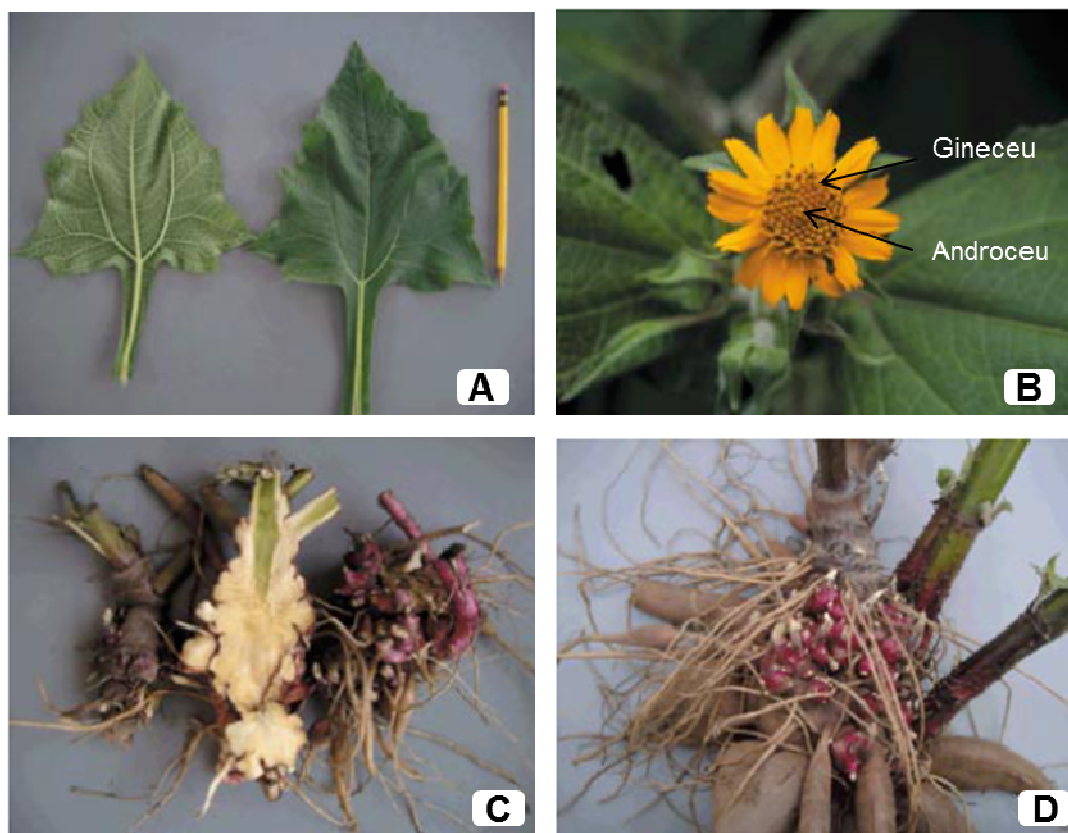


FIGURA 11 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO YACON

Fonte: Adaptado de SEMINARIO, VALDERRAMA E MANRIQUE (2003)

Notas: (A) folhas; (B) capítulo contendo os gineceus (flores femininas) e androceus (flores masculinas); (C) raiz fibrosa; (D) raiz de reserva (tuberosa)

A família Asteraceae também conhecida como Compositae (TABELA 1) é composta por aproximadamente 20.000 espécies, capazes de se desenvolver na maioria das regiões do mundo. Carboidratos extraídos desta família podem ser encontrados em produtos cosméticos, de higiene ou em itens medicinais (SCHMIDT, 1986). A taxonomia do yacon proposta por Engler (JOLY, 1998) encontra-se na Tabela 1 a seguir.

TABELA 1 - TAXONOMIA DO YACON (*S. sonchifolius*)

Divisão:	XVII-Angiospermae (<i>antophyta</i>)
Classe:	Dicotyledoneae
Subclasse:	<i>Sympetala</i> (<i>gamopetala</i>)
Ordem:	<i>Campanuales</i> (<i>synandrae</i>)
Família:	<i>Asteraceae</i>
Gênero:	<i>Smallanthus</i>
Especie:	<i>Smallanthus sonchifolius</i>

FONTE: JOLY, 1998

Estudos realizados com as raízes de reserva de yacon indicam que 83 a 90% do seu peso é composto por água, os carboidratos representam aproximadamente 90% do peso seco das raízes, dos quais 50 a 70% são frutooligossacarídeos (FOS), que apresentam um baixo grau de polimerização (DP-*Degree of polymerization*). As raízes de yacon são utilizadas pela população andina no controle do *diabetes mellitus*. Além de ser considerado um alimento funcional, estudos mostraram a diminuição da concentração de glucose no sangue, após o consumo recorrente das raízes de yacon (ZARDINI, 1991). A raiz de yacon foi também estudada quanto a sua atividade antioxidante (YAN et al., 1999).

As folhas de yacon, secas e moídas são comercializadas para o preparo de chás medicinais, sendo consumidas em infusão, especialmente para o tratamento da diabetes (SEMINARIO et al., 2003; ESPINOSA et al., 2001). As folhas e o caule de yacon são ricos em proteínas, ácidos fenólicos (como os ácidos caféico, clorogênico, ferúlico), além de flavonóides (como a quercetina) (VALENTOVÁ et al., 2004). Melampolideos (um tipo de sesquiterpeno lactona), como a sonchifolina, polimatina B, uvedalina e enidrina, também são observados (INOUE et al., 1995).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL

As raízes e folhas de yacon (*S. sonchifolius*) foram coletadas em Prudentópolis (latitude sul 25,121751°; longitude oeste 50,591292°), numa altitude de 802 metros acima do nível do mar, no Estado do Paraná e gentilmente cedidas pela Prof.^a Dr.^a Lucimara Cordeiro.

Foi realizado o depósito de um exemplar de yacon (*S. sonchifolius*) (folhas e flores) no Museu Botânico Municipal de Curitiba (Paraná-Brasil) sob o número de identificação 386494.

As folhas de yacon foram selecionadas manualmente, distribuídas homogeneamente numa bandeja de plástico, e secas em estufa Fanem a 50 °C até peso constante.

As raízes foram descascadas, lavadas, cortadas em pedaços de aproximadamente um centímetro, congeladas e liofilizadas até peso constante. O liofilizador utilizado foi o Edwards Thermo Fisher Scientific modelo FR-Drying Digital Unit.

4.2 DESLIPIDIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS

O material (folhas ou raízes) (Fig. 12 e Fig.13) foi submetido à deslipidificação com clorofórmio-metanol na proporção de 2:1 (v.v⁻¹) sob refluxo, a 50 °C até não apresentar mais compostos apolares (o solvente foi trocado na saturação), (CIPRIANI et al., 2008; CIPRIANI, 2007). Após a deslipidificação o resíduo foi seco e utilizado para a extração dos carboidratos.

4.2.1 Extração com água fervente das folhas e das raízes

O material seco e deslipidificado foi submetido à extração aquosa em banho maria (com água fervente) sob refluxo por 2 horas, numa relação inicial amostra:

solvente 1:5 (p.v⁻¹). Os extratos foram reunidos, concentrados a vácuo, precipitados com etanol (5 °C por 18 horas), em relação 1:3 extrato/etanol (v.v⁻¹), esta mistura foi centrifugada gerando um precipitado e um sobrenadante.

Os materiais precipitados com etanol foram denominados de RYHW (para o proveniente da raíz) (Fig. 12) e LYHW (para o proveniente das folhas) (Fig. 13), sendo então dialisados por 48 horas e liofilizados.

Os sobrenadantes etanólicos da centrifugação foram denominados de RYPF (para o proveniente da raíz), e LYPF (para o proveniente das folhas), foram concentrados a vácuo e liofilizados.

4.2.2 Extração com KOH 2% e 10% das folhas

O resíduo da extração com água fervente foi submetido à extração com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 2% (p.v⁻¹) na presença de NaBH₄, sob refluxo fervente, por 2 horas, a extração foi repetida até esgotamento. Após cada etapa, o material foi filtrado, separando o retido (que foi denominado de resíduo) e o eluído (fração LYPH2 para as folhas e RYPH2 para as raízes). Os extratos foram reunidos, neutralizados com ácido acético glacial, concentrados a vácuo, dialisados por 48 horas e liofilizados.

O resíduo da extração alcalina com KOH 2% foi submetido à extração com solução de KOH 10%, seguindo a mesma metodologia de execução e armazenamento descrito anteriormente, esta fração foi denominada de LYPH10 para as folhas e de RYPH10 para as raízes.

4.3 FRACIONAMENTO DOS CARBOIDRATOS

4.3.1 Congelamento e descongelamento

As frações (para folhas) provenientes do extrato aquoso, extrato com KOH 2% e extrato com KOH 10% (p.v⁻¹) foram solubilizadas em água destilada até a saturação (sob agitação agrega-se água destilada até conseguir uma solução

saturada) esta solução foi submetida ao processo de congelamento e posterior descongelamento a temperatura ambiente (Fig. 13).

O procedimento gerou um precipitado insolúvel em água fria, o que foi separado por centrifugação (9000 rpm por 15 minutos a 5 °C de temperatura). O processo foi repetido até que o sobrenadante não apresentasse mais precipitado (GORIN e IACOMINI, 1984).

Este procedimento gerou frações denominadas “solúveis ao congelamento-descongelamento” e “insolúveis ao congelamento-descongelamento”, foi colocada a letra “i” depois das siglas de extração para as insolúveis e de “s” para as solúveis (Fig. 13).

4.3.2 Ultrafiltração

As ultrafiltrações foram realizadas num sistema de ultrafiltração modelo 16249 (Sartorius), acoplado a um cilindro de ar comprimido, utilizando-se membranas Millipore.

4.3.2.1 Fracionamento das arabinogalactanas-proteínas por ultrafiltração

A fração solúvel do congelamento-descongelamento do extrato com água fervente das folhas de yacon (LYHW), foi submetida a ultrafiltração em membranas com limites de exclusão de 10, 30, 50, 100 e 300 kDa iniciando com a membrana de maior poro a menor poro (Fig 13).

4.3.2.2 Fracionamento dos frutooligossacarídeos por ultrafiltração

O sobrenadante etanólico obtido da extração com água fervente da raiz de yacon (RYPF) foi submetido a ultrafiltração em membranas com limites de exclusão de 10 e 5 kDa iniciando com a membrana de maior poro a menor poro (Fig. 12).

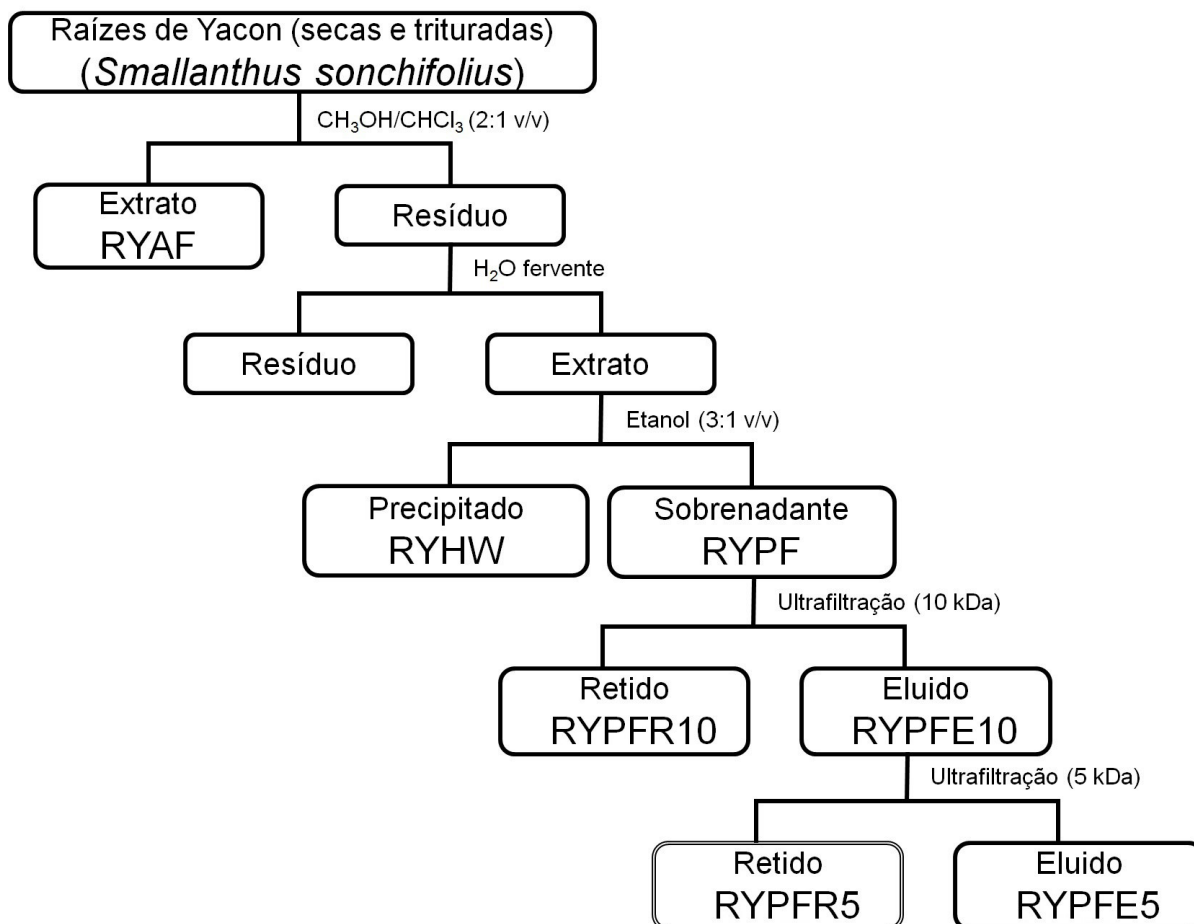


FIGURA 12 – DIAGRAMA DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DOS FOS

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: A fração obtida da ultrafiltração foi denominada RYPFR5

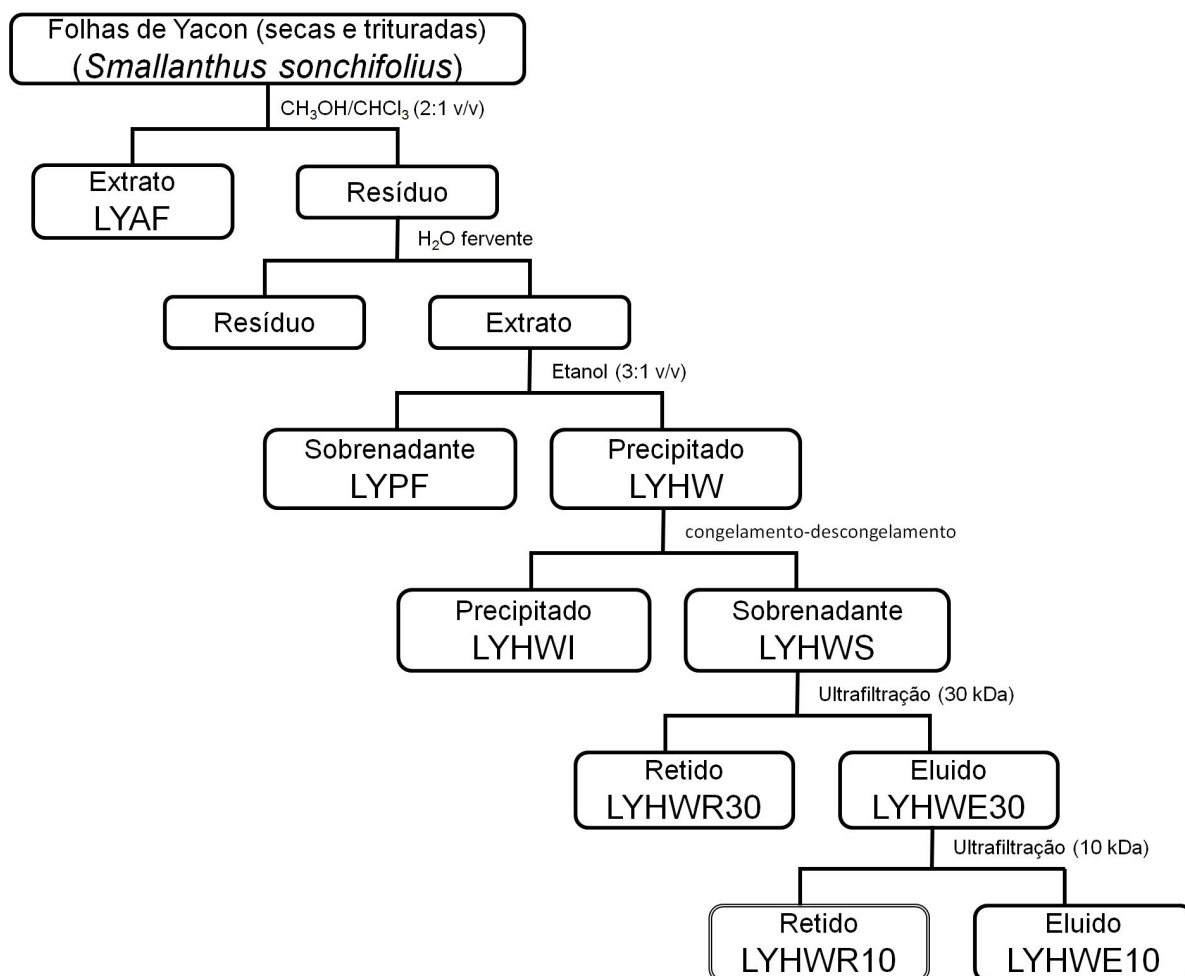


FIGURA 13 – DIAGRAMA DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS AGPS
 FONTE: O autor (2015)

4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS CARBOIDRATOS ISOLADOS

4.4.1 Composição monossacarídica

4.4.1.1. Composição monossacarídica da arabinogalactana-proteína

O material foi hidrolisado com ácido trifluoracético (TFA) 2 M por 8 horas a 100°C. Ao término da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965).

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio (NaBH_4), em meio aquoso, a 25°C por 18 h (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Em seguida foi adicionado ao material resina catiônica Lewatit S-100 para a remoção do cátion sódio (Na^+) e para decompor o excesso do agente redutor. O material foi filtrado, evaporado até a secura e lavado sucessivamente com metanol (1 mL por três vezes) para a remoção do ácido bórico remanescente por co-destilação com metanol, na forma de borato de trimetila. Após completa secura, os alditóis foram acetilados com anidrido acético – piridina (1:1 v.v⁻¹) durante 16 horas a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Esta reação foi interrompida com a adição de gelo moído e os alditóis acetatos foram extraídos com clorofórmio. O excesso de piridina na fase clorofórmica foi eliminado com sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% e água de forma alternada. A fase clorofórmica foi lavada várias vezes com água destilada, e evaporada depois a 25°C para posterior análise por cromatografia gasosa.

As análises de cromatografia líquido-gasosa (GLC) foram realizadas num cromatógrafo TRACE GC ULTRA Thermo Electron Corporation, equipado com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Uma coluna capilar [30 m x 0,25 mm (d.i.)] DB-225 foi usada, com espessura de filme 0,25 mm, sendo a temperatura do detector 300°C e do injetor 250°C (SLONEKER, 1972).

Foram realizados experimentos de Q-HSQC para avaliar a composição monossacarídica. Seguindo a seguinte metodologia: as amostras dos glicanos hidrolisadas foram secas com N_2 , dissolvidos em 0,5 M de NH_4OH (200 μL), a 50°C durante 5 min. O produto foi secado, tal como descrito acima, dando origem aos monossacarídeos e também aos ácidos urônicos deslactonizados. O material residual foi então dissolvido em 500 μL de D_2O e o pH foi ajustado até pH 3,5 usando uma solução diluída de D_2O - H_2SO_4 antes da análise por RMN. A quantificação relativa dos monossacarídeos foi realizada por integração das correlações de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ anoméricos e normalizados para valores de percentual. A identificação foi baseada no mapa de deslocamento químico obtido a partir de uma mistura padrão contendo 5 mM dos monossacarídeos de interesse (SASSAKI et al., 2014).

4.4.1.2 Composição monossacarídica dos frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos (FOS) foram hidrolisados com TFA 0,2 M (500 μ L) a 60 °C por 30 min. Ao término da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (BRAZ DE OLIVEIRA et al., 2011).

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise foram reduzidos e acetilados como descrito no item 5.6.1.1. Os alditóis acetatos resultantes foram analisados e quantificados por um cromatógrafo Varian Saturn 2000R - 3800 acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap 2000R e coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm id), mantida a 50 °C durante a injeção por 1 min, depois programada a 40 °C.min⁻¹ até 220 °C e os acetatos de alditóis parcialmente metilados a uma temperatura de 50 - 215 °C (40 °C.min⁻¹). (JANSSON et al., 1976; SASSAKI et al., 2005a).

4.4.2 Metilação dos carboidratos e análise na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados

Os polissacarídeos e oligossacarídeos (5 mg) foram metilados pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). A amostra a ser metilada foi solubilizada em 1 mL de Me₂SO. Excesso de NaOH triturado e seco foi adicionado à solução, seguido pela adição de 1 mL de CH₃I, agitado em vórtex por 30 minutos e mantido em repouso por 24 horas (CIUCANU e KERREK, 1984).

A metilação foi interrompida com água destilada em banho de gelo e a solução foi acidificada com ácido acético. O polissacarídeo ou oligossacarídeo metilados foram extraídos com clorofórmio e lavados diversas vezes com água destilada.

A fase clorofórmica foi evaporada e o material metilado hidrolisado com H₂SO₄ 50% (v.v⁻¹; 0,5 mL) por 1 hora a 0 °C, seguido pela diluição a 5,5% (v.v⁻¹; adição de 4,0 mL de água destilada) e aquecimento a 100 °C por 12 horas (SAEMAN et al., 1954).

O material hidrolisado foi neutralizado com BaCO₃, centrifugado, filtrado, reduzido com NaBD₄ e acetilado. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS. Usando uma coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm

id), mantida a 50 °C durante a injeção por 1 min e posteriormente foi submetida a uma elevação de temperatura programada a 40 °C.min⁻¹ até 210 °C e mantida por 31 min. Os acetatos de alditol parcialmente *O*-metilados foram identificados por seus típicos perfis de ionização e tempos de retenção (SASSAKI et al., 2005a; SASSAKI et al., 2005b).

4.4.3 Análise da composição dos aminoácidos da arabinogalactana-proteína

A parte peptídica da AGP foi hidrolisada com HCL 6 M a 100 °C por 20 h na presença de 1% de fenol. Posteriormente 10 – 100 µg do hidrolisado foram tratados com 50 µL de piridina e 50 µL de *N*-tert-Butildimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) a 60 °C por 30 min. Em seguida foram analisados em GC-MS e comparada com padrões. A rampa de temperatura usada foi: injetor 250 °C, inicialmente a temperatura do forno foi mantida a 50 °C durante 2 min, logo foi aquecida a 90 °C (20 °C min⁻¹, depois mantida durante 1 minuto) e em seguida elevada a 280 °C (5 °C min⁻¹, depois mantida durante 2 min). Os espectros dos monossacarídeos foram obtidos por eletroionização (EI) com 70 eV a 200 °C. O volume de injeção foi de 1 µL, com uma taxa de divisão de 1:10. A análise pós-ensaio foi realizada com software SaturnWorkstation 5.1 (SASSAKI et al., 2008b).

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Cromatografia de camada delgada

4.5.1.1 Cromatografia de camada delgada dos monossacarídeos constituintes da arabinogalactana-proteína

Previamente às análises por cromatografia de camada delgada (TLC), o material foi hidrolisado como indicado na sessão 4.4.1.1. As análises foram realizadas em placas de sílica gel 60G (MERCK) com 10 cm de altura total.

Os monossacarídeos da AGP e os padrões de monossacarídeos (na concentração de 1 mg.mL^{-1}) foram aplicados na TLC e a placa foi colocada em cuba de vidro sobre uma fase móvel de acetato de etila:ácido acético:n-propanol:água (4:2:2:1, v.v⁻¹) as bandas dos monossacarídeos foram visualizadas usando o revelador orcinol:H₂SO₄ e temperatura (SASSAKI, et al., 2008a).

4.5.1.2 Cromatografia de camada delgada dos frutooligossacarídeos

Para a análise dos FOS (baixa massa molar), foi utilizada como fase móvel propanol:água (6:1, v.v⁻¹), e o revelador que permitiu visualizar as bandas foi orcinol:H₂SO₄ (SASSAKI, et al., 2008a). As análises foram realizadas em placas de sílica gel 60G (MERCK) com 10 cm de altura total.

4.5.1.3 Cromatografia monodimensional e bidimensional de camada delgada dos amino-ácidos da arabinogalactana-proteína

Para analisar os aminoácidos por TLC, a amostra foi previamente hidrolisada com 6 M HCl a 100 °C por 20 h, na presença de 1% de fenol (v.v⁻¹) para prevenir a decomposição da tirosina (SASSAKI, et al., 2008b). Para a análise de aminoácidos em TLC monodimensional, a fase móvel utilizada foi uma mistura de propanol: água (70:30, v.v⁻¹) e o revelador utilizado foi uma solução etanólica 2% de ninhidrina (SASSAKI, et al., 2008a). A TLC bidimensional foi realizada em duas corridas, na primeira corrida a fase móvel foi piridina:dioxano:hidróxido de amônio:água (35:35:15:15 v.v⁻¹.v⁻¹.v⁻¹) e na segunda corrida perpendicular à primeira, a fase móvel foi n-butanol:acetona:ácido acético:água (35:35:10:20 v.v⁻¹.v⁻¹.v⁻¹), sendo o revelador uma solução 2% de ninhidrina em acetona (SASSAKI, et al., 2008a). As análises foram realizadas em placas de sílica gel 60G (MERCK) em placas de 10 cm de altura total.

4.5.2 Métodos Espectrofotométricos

Todas as análises espectrofotométricas foram realizadas em triplicata, cubeta de vidro e as leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro SP-22 Biospectro®.

4.5.2.1 Dosagem de açúcar total

O conteúdo de açúcar total foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), a leitura feita em comprimento de onda de 490 nm. O padrão empregado foi glucose nas concentrações de 20-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.5.2.2 Dosagem de ácidos urônicos

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada através do método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), tendo como solução padrão ácido galacturônico nas concentrações de 20-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e as leituras de absorvância em 525 nm.

4.5.2.3 Dosagem de proteínas

Os teores de proteínas foram determinados pelo método de Bradford (1976) e as leituras de absorvância efetuadas a 750 nm. O padrão empregado foi a soroalbumina bovina (BSA-Sigma) nas concentrações de 20-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.5.3 Método Espectroscópico

4.5.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN- ^{13}C , ^1H e HSQC, foram obtidos em um aparelho BRUKER, modelo AVANCE III 400 MHz e 600 MHz, utilizando a temperatura de 70 $^{\circ}\text{C}$. As amostras foram solubilizadas em D_2O e acetona foi utilizada como padrão interno (^{13}C , δ 30,2 e ^1H , δ 2,22).

4.5.3.2 Análise de espectrometria de massa com ionização por spray de elétrons (ESI-MS)

A amostra de FOS foi injetada no espectrômetro de massa utilizando uma seringa, para análise off-line de ESI-MS. Os espectros foram obtidos em modo de ionização positivo, usando um triplo quadrupolo Quattro LC (Waters), sendo a voltagem capilar de 2300 V, a voltagem do cone 60 V e fonte a 100 °C. Cada espectro foi produzido pelo acúmulo de dados ao longo de 1 min (BRAZ DE OLIVEIRA et al., 2011).

4.5.4 Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos e de índice de refração e ultravioleta (HPSEC-MALLS/RI/UV)

Para analisar a homogeneidade e massa molar as amostras (1 mg.mL^{-1}) foram solubilizadas em solução de NaNO_2 0,1 M contendo 200 ppm de NaN_3 . As amostras foram filtradas utilizando membranas de acetato de celulose de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$. Para analisar os resultados foi utilizado o software ASTRA 4.5., (inicialmente foram sinalizadas as linhas de base dos espectros para UV, IR e LS, seguidamente foram selecionados o/os picos de interesse, e feito o reporte em detalhado, do reporte foram tomados os dados de M_w e R_g , para gerar os gráficos de MM vs. Volume, depois de gerar o reporte foi escolhido “*Distribution*” para gerar o gráfico do espectro.

As análises foram feitas num cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 (RI) e detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e $5 \times 10^3 \text{ g.Mol}^{-1}$. O eluente utilizado foi: solução de NaNO_2 0,1 M contendo NaN_3 200 ppm, com fluxo de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

4.5.5 Detecção e quantificação por GC-MS de lipopolissacarídeos em polissacarídeos através de ácidos graxos 3-*O*-acetil metil esterificados

As amostras (FOS e AGPs) foram diluídas, em água deionizadas e agitadas vigorosamente durante 12 h. Uma alíquota contendo 0,3 mg de amostra foi então recolhida. A amostra foi diluída em água e a solução foi então sonicada (dois ciclos de 15 min). A solução foi recolhida e colocada em vials de 4 mL com tampa de teflon. A solução foi seca sob uma corrente de N₂, e o resíduo foi dissolvido em 400 µL de MeOH. O material foi submetido a metanólise com a adição de 100 µL de 3 M de HCl-MeOH. O vial foi agitado vigorosamente (1 min) e mantido a 80 °C durante 20 h. A solução foi então particionada entre hexano (1 mL) e água desionizada (0,5 mL). As amostras foram evaporadas sob uma corrente de N₂, e o resíduo dissolvido em acetona (5 µL), concentrada até 1 µL, e analisados por GC-MS, e os íons com *m/z* em 257 e 103 foram procurados para detecção positiva ou negativa de LPS nas amostras. A análise também foi realizada com padrão de LPS de *Escherichia coli*, serotipo O111: B4, obtido do Sigma.

A rampa da temperatura usada na rampa do GC-MS foi: injetor 250 °C, inicialmente a temperatura do forno foi mantida a 50 °C durante 2 min, logo foi aquecida a 90 °C (20 °C.min⁻¹, depois mantida durante 1 minuto) e em seguida elevada a 280 °C (5 °C.min⁻¹, depois mantida durante 2 min). Os espectros foram obtidos por eletroionização (EI) com 70 eV a 200 °C. O volume de injeção foi de 1 µL, com uma taxa de divisão de 1:10. A análise pós-ensaio foi realizada com um SaturnWorkstation 5.1 (SASSAKI et al., 2008b; SANTANA-FILHO et al., 2012).

4.5.6 Detecção do AGP pelo teste do Yariv

Foi utilizado o reagente β-D-glucosyl Yariv (βGlcY), (1,3,5-tri(p-glycosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene) (YARIV, RAPPORT e GRAF, 1962).

Para o preparo do gel de agarose, foram dissolvidas em água agarose (Carbochem tipo C) 1% (m.v⁻¹), 1% de NaCl 0,15 M e 0,02% (m.v⁻¹) de NaN₃, e β-D-glucosyl Yariv 0,02 mg.mL⁻¹, foi usado o micro-ondas para dissolver o agar, para preparar as placas, colocar a placa (GelBond) com a porção hidrofílica voltada pra cima, use umas gotas de água para fixar no vidro, em seguida adicionar o gel (3,5

mL) sobre a placa deixando o gel uma espessura aproximada de 1 mm., fazer poços de 3 mm de diâmetro, colocar 5 μL de cada amostra (10 mg.mL^{-1}) e os padrões de goma arábica, deixar por 18 h a temperatura ambiente e em ambiente húmido (com um algodão), o padrão de goma arábica foi de 0,25, 0,50, 1,0, 2,0 e 3,0 μg (GANE et al., 1995). O complexo insolúvel Yariv-AGP foi visualizado em gel de agarose, este por difusão forma um complexo em forma de anel de cor alaranjada (MAURER et al., 2010).

4.6 HIDRÓLISE ALCALINA DA ARABINOGALACTANA-PROTEÍNA COM NaOH/NaBH₄

AGP (fração LYHWR10) foi hidrolisada com NaOH/NaBH₄ com a finalidade de degradar de forma seletiva os aminoácidos presentes na AGP e assim conhecer o aminoácido que se encontra ligado ao carboidrato (*O*-ligado).

No primeiro procedimento foi usado 1 g de amostra, a qual foi solubilizada em 100 mL de NaOH 0,5 M e adicionada de 0,2 M de NaBH₄ por 18 h a 50 °C, terminada a reação, o excesso de NaBH₄ e NaOH foi neutralizado com 0,5 M de H₂SO₄ em banho de gelo, posteriormente foi centrifugada, o sobrenadante foi dialisado por 24 h, o produto resultante foi analisado por GPC/MALLS (MAHENDRAN et al., 2008).

O segundo procedimento precisou de 1 g de amostra, a qual foi solubilizada em 100 mL de NaOH 1 M e adicionada de 2 M de NaBH₄ por 6 h a 100 °C, terminada a reação, o excesso de NaBH₄ foi neutralizado com 0,5 M de H₂SO₄ em banho de gelo, posteriormente foi centrifugada, o sobrenadante foi dialisado por 24 h, o produto resultante foi analisado por GPC/MALLS (MAHENDRAN et al., 2008; MORELLE; GUYEÂTANT; STRECKER, 1998; AKIYAMA; SHIGERU; KATO, 1984).

4.7 OXIDAÇÃO POR NaClO

A AGP (fração LYHWR10) foi submetida a oxidação com NaClO para eliminar a parte peptídea e permitir análises de caracterização do polissacarídeo presente.

A amostra (2 g) foi tratada com 200 mL de NaOH 0,1 M e 25 mL de NaClO concentrado, em agitação por 24 h a temperatura ambiente, terminada a reação por oxidação, o resultante da reação foi submetido a diálise por 24 h e em seguida centrifugado, o sobrenadante foi recolhido, concentrado e liofilizado (OHNO et al., 1999; FUKAI et al., 1997; MIURA et al., 1996).

4.8 TESTES BIOLÓGICOS

4.8.1 Cultivo celular

4.8.1.1 Cultivo celular de monócitos THP-1

Foi usada a linhagem monocítica (*human acute monocytic leukemia cell line*) THP-1 para testar atividade imunomoduladora dos FOS. As células foram mantidas em meio de cultura líquido RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) com 10% de Soro de Neonato (Gibco), estreptomicina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich) e penicilina (100U.mL^{-1} ; Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em incubadora com 5% de CO_2 , a 37°C e o meio era renovado duas vezes por semana.

4.8.1.2 Cultivo celular da linhagem de melanoma murino (B16-F10)

B16-F10 é uma linhagem celular de melanoma de camundongo, e foi cultivada em meio RPMI- 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 % de aminoácidos não essenciais (100 x), 1% de L-glutamina (200 mM), 1% de vitaminas (100 x), 1 % de penicilina ($10.000 \mu\text{M.mL}^{-1}$), estreptomicina ($10.000 \mu\text{M.mL}^{-1}$) e 1% de piruvato de sódio 100 mM. As células foram cultivadas a 37°C , numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 . O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias.

4.8.2 Diferenciação de monócitos THP-1 a macrófagos

Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos por adição de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato; 30 ng.mL^{-1}) (DAIGNEAULT et al., 2010). As células (500.000 mL^{-1}) foram tratadas com PMA por 48 horas em placas de poliestireno de 24-poços (Costar) com 1 mL de meio em cada poço. Após a diferenciação, as células aderem à superfície do poço.

4.8.3 Determinação da viabilidade celular de monócitos THP-1

A determinação da viabilidade celular foi avaliada pelo método: MTT (brometo de (3- metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) de acordo com Reilly et al., (1998). Para o método do MTT, enzimas ativas presentes nas células reduzem o sal tetrazólio (que determina a atividade mitocondrial), formando cristais de formazan solúveis em DMSO, possuindo cor roxa característica (REILLY et al., 1998). Para esta avaliação, foram incubados 5×10^5 macrófagos/poço (derivados de THP-1) aderidos em placas de 96 poços, com meio DMEM contendo os FOS nas concentrações de 10, 50 e $250 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e incubados por 24 e 48 h. Em seguida, removeu-se o meio e adicionou-se $180 \text{ } \mu\text{L}$ de HBSS (5 mg.mL^{-1}) com $20 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de MTT em HBSS, obtendo uma concentração final em MTT de $500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. A placa foi incubada por mais 3 h a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . Ao término da incubação o excesso de MTT foi removido cuidadosamente, e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. A absorbância das amostras foi medida utilizando comprimento de onda de 550 nm, sendo o branco o DMSO. Volumes de 0,2 mL de uma suspensão contendo meio com células (macrófagos derivados de monócitos THP-1), foram distribuídos em placas de 96 poços, de maneira que cada poço tenha $2,5 \times 10^5$ células, foram incubadas por 24 h a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ em estufa com 5% de CO_2 . O meio de cultura foi substituído por soluções contendo os FOS solubilizados em meio de cultura, nas concentrações de 10, 50 e $250 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e dos respectivos controles, em triplicatas e incubados por 24 e 48 h.

4.8.4 Determinação da atividade fagocítica em monócitos THP-1

A capacidade fagocítica foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Shiratsuchi e Basson, (2004), Ramesh et al. (2002) e Buchi et al. (1993). Uma suspensão de leveduras mortas pelo calor foi preparada. Levedura de padeiro comercial (3 mg.mL^{-1} em PBS, pH 7,8) foi aquecida a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. O sedimento obtido após centrifugação foi lavado e ressuspenso em meio de cultura completo.

O ensaio de fagocitose foi realizado segundo o protocolo de Roy e Rai, (2009), com 1×10^5 células/poço de macrófagos derivados de monócitos THP-1, estes foram incubados a 25°C em atmosfera de CO_2 por 90 minutos. Foram usadas placas de 24 poços e lamínulas de vidro. As leveduras mortas foram adicionadas (1×10^8 cells/poço) com os macrófagos. Foram testadas concentrações de 10, 50 e $250 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de FOS, para tempos de 30, 60 e 90 minutos de exposição a leveduras.

Após cada período de incubação (30, 60 e 90 minutos), o sobrenadante foi descartado e as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas em solução de BOUIN (formaldeído 4% [v.v⁻¹]: ácido pícrico saturado:ácido acético, 4:15:1) por 5 minutos a temperatura ambiente. Depois de fixadas, as células foram desidratadas gradualmente numa bateria de solventes orgânicos compostos de: H_2O , acetona, acetona: xilol (2:1), acetona: xilol (1:1), acetona: xilol (1:2) e xilol; seguidamente foram coradas com GIEMSA (é uma mistura de corantes com características neutras, que coram os componentes nucleares e citoplasmáticos das células) e logo observadas mediante um microscópio ótico, das lamínulas foram contados 100 macrófagos aleatoriamente e seguidamente a quantidade de leveduras internalizadas neles.

Foram determinadas a porcentagem de fagocitose e índice de fagocitose. A porcentagem de fagocitose foi realizada escolhendo 100 macrófagos aleatoriamente, seguidamente foram contados os macrófagos que internalizaram uma ou mais leveduras. O índice de fagocitose (IF) foi proposto por Shiratsuchi e Basson (2004), para medir a atividade fagocítica dos macrófagos sendo necessária uma equação matemática que descreva a efetividade dos macrófagos ao internalizar as leveduras. O cálculo de IF foi realizado seguindo a equação:

- A. Macrófagos com 1 levedura internalizada.
- B. Macrófagos com 2 a 5 leveduras internadalizadas.
- C. Macrófagos com 6 a 10 leveduras internadalizadas.
- D. Macrófagos com mais de 10 leveduras internadalizadas.

$$\text{IF} = \frac{100 \times \{A + (3,5B) + (8C) + (20D)\}}{\text{Total de macrófagos}}$$

Foram empregados índices de 1 para macrófagos “A” (aqueles que internalizaram 1 levedura), 3,5 para macrófagos “B”, 8 para macrófagos “C” e 20 para macrófagos “D”. Para calcular o IF devido a estes macrófagos apresentarem mais eficácia na fagocitose.

4.8.5 Determinação de proliferação celular da linhagem de melanoma murino (B16-F10)

As células foram lavadas com PBS, soltas com rodinho e centrifugadas por 3 min a 2.000 rpm. Em seguida foram adicionados 5 mL de meio e ressuspendidas com pipeta pasteur e logo contadas, seguidamente foram plaquedas 2.000 células por poço (100 µL em cada poço) em placas de 96 poços.

Após 24 h do plaqueamento foram adicionados os tratamentos (os que foram filtrados em membrana estéril de 0,22 µm), para a determinação da proliferação foi utilizado o ensaio de Cristal Violeta (CHIBA et al., 1998).

Inicialmente o meio de cultura foi removido, lavado uma vez com PBS 37 °C, adicionado de 50 mL de paraformaldeído 2% e incubado por 30 min. O paraformaldeído foi removido e foram adicionados 100 mL de solução de cristal violeta 0,25 mg.mL⁻¹ em H₂O, incubados por 10 min a temperatura ambiente.

A solução de cristal violeta foi removida e as células lavadas 2x com 150 mL de H₂O, em seguida foram adicionados 100 mL de ácido acético 33% (v.v⁻¹), incubados por 30 min a temperatura ambiente num agitador, a leitura foi feita em leitor de microplacas em comprimento de onda de 570 nm.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO FLUXO DOS FOS

Devido ao potencial dos FOS de yacon apresentaram potencial para serem utilizados industrialmente para o preparo de alimentos, devido a suas propriedades e rendimento, foram realizadas análises reológicas. Foram feitas curvas de fluxo em reômetro HAAKE MARS II acoplado a um banho termostatizado HAAKE K15 e termocirculador de água DC5B3, e a um controlador térmico TC 81 (Peltier). Previamente às análises reológicas, foi realizado a inércia do equipamento e do sensor para descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos. Para o experimento foi utilizado o sistema de medida cone-placa, com o sensor C60/2Ti (raio $R = 30$ cm, ângulo $b = 2^\circ$, fenda $h = 0,105$ mm e volume 2 mL), as amostras foram carregadas no sensor e permaneceram em repouso durante 10 min. antes das medições.

Os dados foram coletados e tratados pelo software RHEOWIN 3. Estas análises foram executadas no período de 24 horas, após o preparo das soluções. Foram realizados experimentos em 2 dias diferentes, sendo que em cada dia foram feitos 3 experimentos.

As curvas de fluxo foram realizadas em modo CR a 25 °C, onde foi inferida uma variação da taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$ entre $0,001$ s⁻¹ até 1000 s⁻¹, no intervalo de tempo de 200 s, dessa forma foram medidas as mudanças na tensão de cisalhamento (σ) e na viscosidade (η) durante este período de fluxo.

O parâmetro estatístico utilizado para medir o grau de correlação entre os dados experimentais e os dados previstos pelos modelos reológicos de Herschel Bulkley, Ostwald e Casson foi o coeficiente de determinação R^2 , este coeficiente é a medida da proporção da variabilidade.

Quando $R^2 = 1$ a correlação é perfeita e todos os pontos experimentais coincidem com a curva prevista pelo modelo, se $R^2 = 0$, existe muita variação na estimativa da variável dependente y e a correlação é baixa, se $R^2 = 0,5$ então cerca de 50% da variabilidade da tensão de cisalhamento não pode ser descrita pela variabilidade da taxa de cisalhamento. Dessa maneira o modelo que apresentou valor de R^2 mais alto foi escolhido para obtenção dos parâmetros reológicos K e n , devido a ser o melhor a representar os dados experimentais (STEFFE, 1996).

4.10 MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para análise de morfologia de células B16-F10 utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura Tescan VEGA3, com detector de elétrons secundários, faixa operante de 0,5 - 30 kv, filamento de tungstênio, utilizando software VEGA TC para mensurações ultraestruturais, possui o sistema de análise química tipo EDS (Oxford) com software AZ Tech (Advanced) com detector tipo SDD de 80 mm², do Centro de Microscopia Eletronica da UFPR.

Após passar pelo processo de fixação e desidratação, as placas das células foram transferidos para a câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico do CO₂ (CPD - critical point drying). Com a câmara isolada, em um volume de etanol absoluto ou acetona, injeta-se o CO₂ líquido, fazendo-se várias substituições até remoção total do etanol ou acetona, esta troca ocorre entre 0 e 5°C. A amostra permanece sempre imersa na fase líquida. Eleva-se a temperatura dentro da câmara entre 40 e 45 °C e, conseqüentemente, a densidade da fase líquida diminui. O aumento da pressão (de aproximadamente 73 atm) causa o aumento da densidade na fase gasosa, pois devido ao aumento gradual da temperatura, as moléculas adquirem energia cinética e se convertem em gás, o que aumenta a pressão interna na câmara. Quando está próximo da temperatura crítica significa que as densidades da fase gasosa e líquida estão próximas. Logo, quando o ponto crítico é excedido, a fase gasosa e líquida apresentam a mesma densidade, garantindo que a temperatura está em torno de um valor crítico onde não há limites entre as fases, ou seja, o menisco de transição de fases desaparece. Nesta situação, a tensão superficial é igual a zero e todo o líquido se converteu em gás, assim se evita o efeito da tensão superficial sobre a amostra. A câmara é, então, despressurizada até pressão atmosférica, e a amostra é removida da câmara. A amostra pode então ser montada em um suporte metálico e metalizada para ser observada no microscópio eletrônico de varredura.

Após a montagem em suporte metálico específico para a microscopia de varredura, as placas de celulas foram submetidas à metalização (com Au^o) em aparelho Balzers SCD030. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Sob supervisão do professor doutor Edvaldo da Silva trinidad.

4.11 EXPRESSÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados biológicos foram representados como as médias \pm erro padrão das médias. As diferenças entre as médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o Programa para *Windows*, *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Um valor de *P* menor que 0,05 foi considerado significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FOS

As raízes de yacon foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços de aproximadamente 1 cm³, posteriormente foram congeladas e liofilizadas (as raízes de yacon apresentam 86,8% de água), este resultado concorda com o encontrado por Lachman, Fernández e Orsák (2003).

Em seguida a amostra foi moída, colocada num sistema de refluxo com solvente orgânico (CH₃OH/CHCl₃ 2:1 v.v⁻¹) a 40 °C, o procedimento foi repetido ate esgotamento do material, o que gerou um extrato que denominamos extrato não polar (RYAF) com um rendimento de 1,5%.

O resíduo da extração com CH₃OH/CHCl₃, foi submetida à extração com água fervente até que o extrato não apresentou mais carboidratos (foi controlado pelo teste do fenol-sulfúrico), o extrato da extração com água fervente foi concentrado a vácuo em rotaevaporador, seguidamente foram adicionados 3 volumes de etanol e esfriado a 5 °C por 18 h, o material foi então centrifugado e o precipitado e o sobrenadante liofilizados; o sobrenadante foi denominado de fração RYPF e o precipitado de fração RYHW. A Fração RYPF teve um rendimento de 4,9%, alguns grupos de pesquisa acreditam que seja pela presença de FOS, já que as Asterales em geral (família a que pertence o yacon) armazenam frutooligosacarídeos lineares como material de reserva (GOTO et al., 1995; OHYAMA et al 1990 e ASAMI et al 1991).

A análise da composição monossacarídica da fração RYPF mostrou os seguintes dados: 87,9% de glucose (Glc), 3,7% de arabinose (Ara), 2,7% de manose (Man), 2,3% de galactose (Gal), 1,5% de ramnose (Rha), 1,1% de xilose (Xyl) e 0,7% de fucose (Fuc).

O perfil de homogeneidade (GPC) da fração RYPF se apresenta heterogêneo, o perfil apresenta oligossacarídeos no minuto 60 até 70, acompanhados de moléculas de maior tamanho (provavelmente polissacarídeos) entre 40 e 50 min (FIGURA 14).

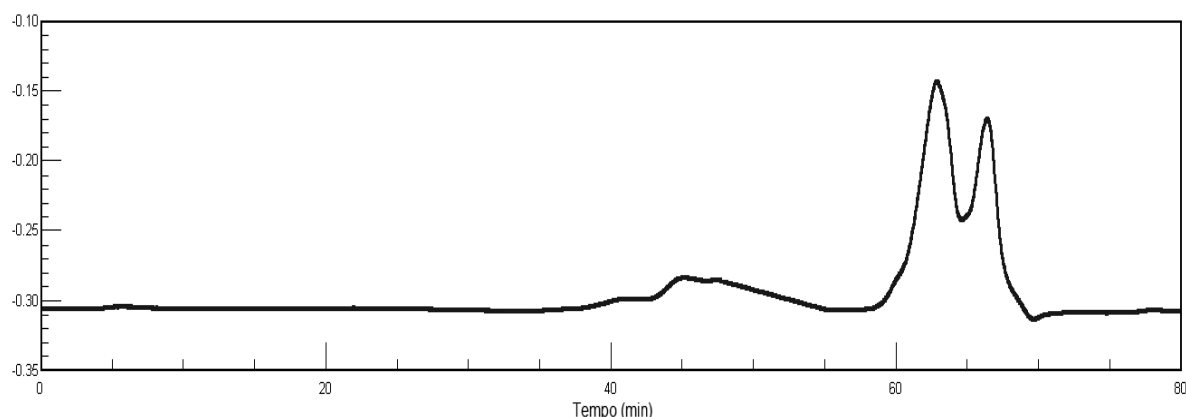


FIGURA 14 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-IR DA FRAÇÃO RYPF

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Análise dos FOS presentes na fração RYPF, utilizando o detector de índice de refração (IR)

A fração RYPF foi submetida a ultrafiltração para separar os frutooligossacarídeos das moléculas maiores, posteriormente foi empregada novamente a ultrafiltração devido à propriedade de adsorver água da fração RYPF, o que impossibilitou realizar dialise (para eliminar sais).

O material eluído na ultrafiltração (membrana de 10 kDa) (fração RYPFE10) foi liofilizada, dissolvida e submetida novamente a ultrafiltração em membrana de 5 kDa, o retido deste procedimento foi denominada fração RYPFR5 e o perfil de eluição em HPSEC-IR está representado na Figura 15, onde observa-se picos referentes a oligossacarídeos no minuto 60 até o minuto 70 do perfil de eluição.

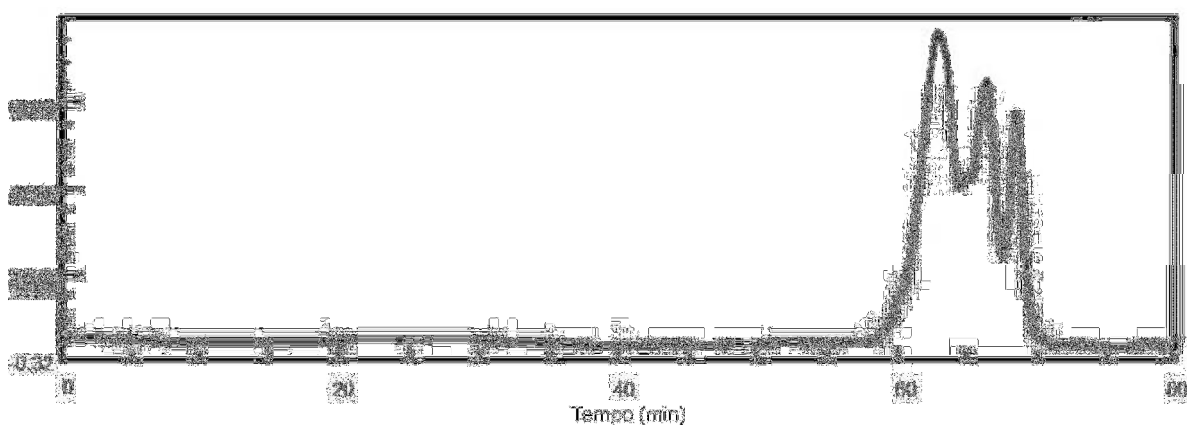


FIGURA 15 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO RYPF5R

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: detector de índice de refração (RID)

Com a finalidade de observar os oligossacarídeos foi realizada uma cromatografia de camada delgada (TLC) (descrita no item 4.5.1.2) (Fig. 16).

A TLC da Figura 16, confirma a existência de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização (DP), observa-se na Figura 16 que as frações de DP menor provavelmente até DP 7 sejam as que se apresentem em maior quantidade, a banda 3 ficou com menor intensidade que as 1, 2, 4 e 5; devido a menor quantidade deste oligossacarídeo, as bandas 8, 9 e 10 se mostraram menos intensas quando detectadas pelo reativo de orcinol- H_2SO_4 , sugerindo uma baixa concentração de oligossacarídeos de maior DP(8-10).

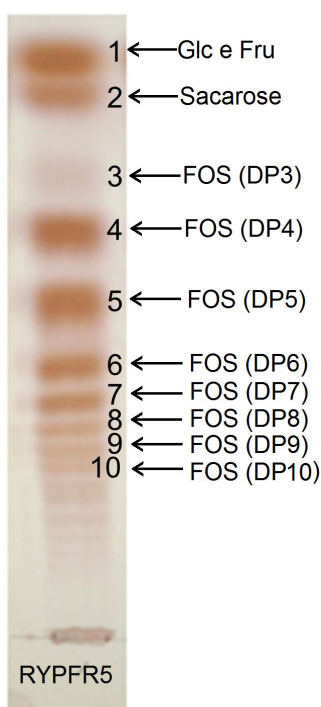


FIGURA 16 - CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DA FRAÇÃO RYPFR5

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: No TLC dos FOS de yacon, os números representam: os monômeros (glucose e frutose) e FOS com diferentes graus de polimerização, a fase móvel foi propanol:água (6:1, v.v⁻¹), e o revelador utilizado foi orcinol: H_2SO_4

Foram realizadas análises de RMN ^{13}C para conhecer a estrutura química fina destes FOS, o perfil dos deslocamentos químicos estão apresentados na Figura 17, nela o deslocamento em δ 104,3 corresponde ao carbono anômérico da β -Fru f -redutor, os deslocamentos em δ 103,6, δ 103,5, δ 103,1 e δ 102,9 correspondem ao carbono anomérico da frutose (Fru) em ligação β dos FOS o que foi descrito de forma similar por Chandrashekar et al. (2009) e por Baumgartner et al. (2000), o deslocamento em δ 103,6 corresponde ao carbono anomérico da frutose (Fru) em ligação β da sacarose; o deslocamento em δ 101,4 corresponde ao carbono

anomérico da Fru em ligação α -Fru f -reductor; o deslocamento em δ 97,9 corresponde ao carbono anomérico da α/β -Fru p . O deslocamento em δ 95,8 corresponde ao C1 reductor da β -Glc p -reductor, δ 92,4, δ 92,1 e δ 92,0 são correspondentes aos C1 da glucopiranosose em α -Glu p -FOS, α -Glu p -SAC e α -Glu p -Red respectivamente (CHANDRASHEKAR et al., 2009; HORII et al., 1983; BRUYN & VAN LOO, 1991).

Braz de Oliveira et al. (2011) reportaram que os sinais em δ 77,5 e δ 74,4 são referentes ao C3 e C4 da β -D-Fru f respectivamente, os quais também foram observados nos FOS de yacon (Fig. 17), o mesmos pesquisadores atribuíram que os sinais referentes ao anel da glucopiranosose em δ 69,6 e δ 72,7 são referentes ao C2 e C3 respectivamente, os quais foram detectados para FOS de yacon (Fig. 17). Foram encontrados sinais de δ 81,0, δ 75,8 e δ 74,4 correspondentes aos C5, C3 e C4 da β -D-Fru f , Baumgartner et al. (2000) reportam em posições similares os carbonos 3, 4 e 5; confirmando que estas sinais correspondem ao anel de β -D-Fru f , para a mesma os sinais de C6 e C1 foram δ 63,3 e δ 60,1 respectivamente, dados similares foram reportados por Chandrashekar et al. (2009) e por Wack e Blaschek (2006). O sinal em δ 63,3 corresponde ao C6 da β -D-Fru f , os frutanos ramificados em C6 (frutanos tipo Levan) apresentam várias sinais para C6, devido as ligações de cadeia e ramificações (Baumgartner et al., 2000; Chandrashekar et al., 2009). A análise de RMN ^{13}C e os dados de literatura sugerem que os FOS de yacon são frutooligosacarídeos do tipo inulina (oligos lineares sem ramificação em C6 da β -D-Fru f).

Os resultados da metilação da fração RYPFR5 indicaram uma estrutura linear dos FOS, composta principalmente por ligações β -(2 \rightarrow 1) de unidades frutofuranosil, devido à presença do derivado 3,4,6-tri-*O*-metilado (84.2%). Pelo que foi observado nas análises da TLC, RMN ^{13}C e metilação, a fração RYPFR5 esta composta de Glc, Fru, sacarose e uma mistura de FOS lineares tipo inulina com diferentes graus de polimerização (DP).

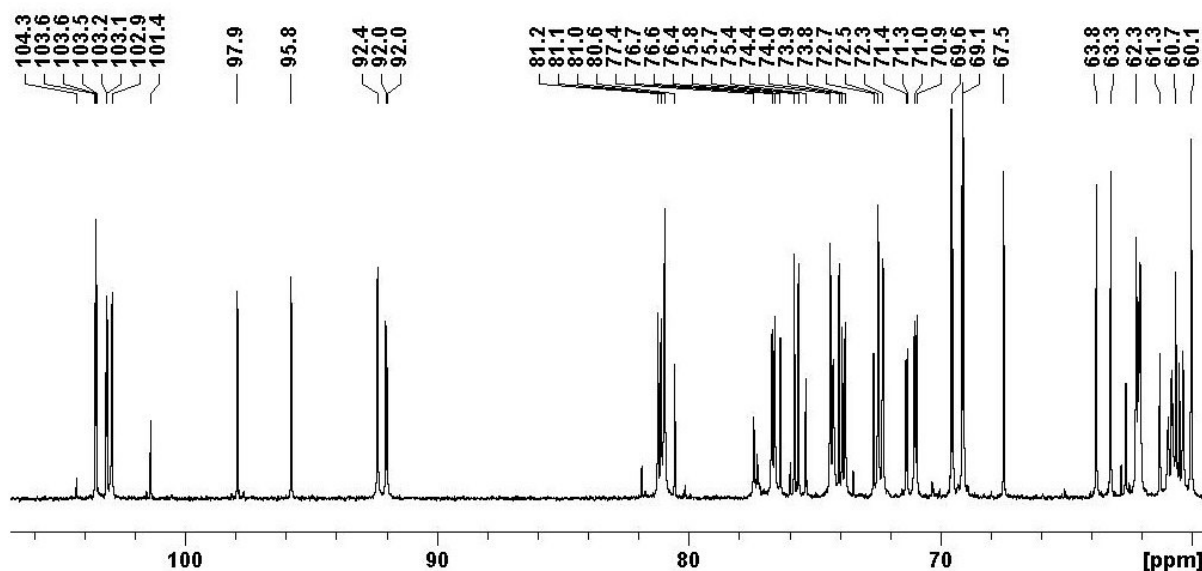


FIGURA 17 – ESPECTROS DE RMN-¹³C DA FRAÇÃO RYPF5R

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Experimentos realizados em D₂O, a 70 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

Para a determinação da massa molecular média e dos DPs dos FOS, foi realizado o experimento de ESI-MS em modo positivo (Fig. 18).

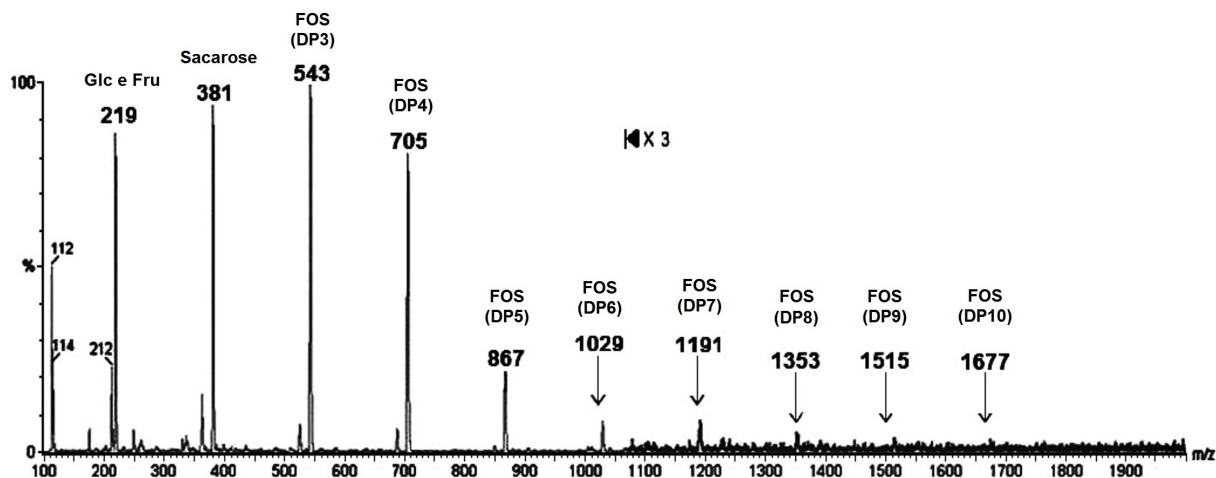


FIGURA 18 – ESPECTRO DE ESI-MS DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DE FOS DE YACON

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Espectro de ESI-MS do DP dos FOS da fração RYPF5R, nota-se uma diferença constante entre os valores dos picos de m/z 162, correspondentes à relação m/z que apresenta a frutose

O ESI-MS permitiu medir as massas dos FOS. O primeiro pico com m/z 219 corresponde a m/z de uma unidade de hexose na forma cationizada com o íon K⁺. A diferença com o próximo pico com m/z 381 é 162, correspondente a uma soma neutra de uma unidade de frutose. Este mesmo perfil foi observado até o último pico

com m/z 1677; esta análise mostrou a presença majoritária de hexose (Glc ou Fru), sacarose, FOS de DP3, DP4 e DP5, além de quantidades pequenas de FOS de DP6, DP7, DP8, DP9 e DP10, comprovando o perfil observado na TLC.

Segundo os resultados obtidos da análise da estrutura da fração RYPFR5, acredita-se que os FOS da fração RYPFR5 tenham a estrutura representada na Figura 19, na qual num extremo da cadeia encontra-se uma molécula de glucose em ligação α -(1 \rightarrow 2) a uma molécula de frutose e esta se une por uma ligação β -(1 \rightarrow 2) a outras unidades de frutose.

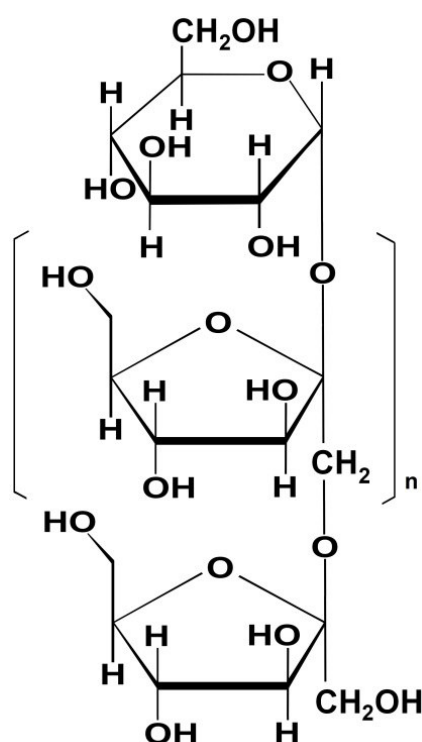


FIGURA 19 - ESTRUTURA DOS FOS DA FRAÇÃO RYPFR5

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Estrutura proposta dos FOS (até DP 10) analisados por ESI-MS, TLC e RMN ^{13}C , onde para o FOS de DP 10 $n = 8$

5.2 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE AGPs

As folhas de yacon apresentaram uma perda de massa de 10,1% quando foram secas, o que foi atribuído a perda de água, a extração com $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$

gerou o extrato LYAF que foi 9,4% e um resíduo, este submetido a extração com água fervente gerou um extrato que foi misturado com etanol, o que gerou um sobrenadante e um precipitado, (com 11,9% de rendimento denominado LYHW). Em seguida a amostra foi submetida ao congelamento-descongelamento, este procedimento foi repetido várias vezes e gerou uma fração solúvel (LYHWS) que foi o 87,65% da fração LYHW e uma insolúvel (LYHWI).

A fração LYHWS se apresentou heterogênea quando analisado por HPSEC-IR (Fig. 20). Na Figura 20, nota-se que o espectro do UV (em verde) co-elui o pico principal do índice de refração.

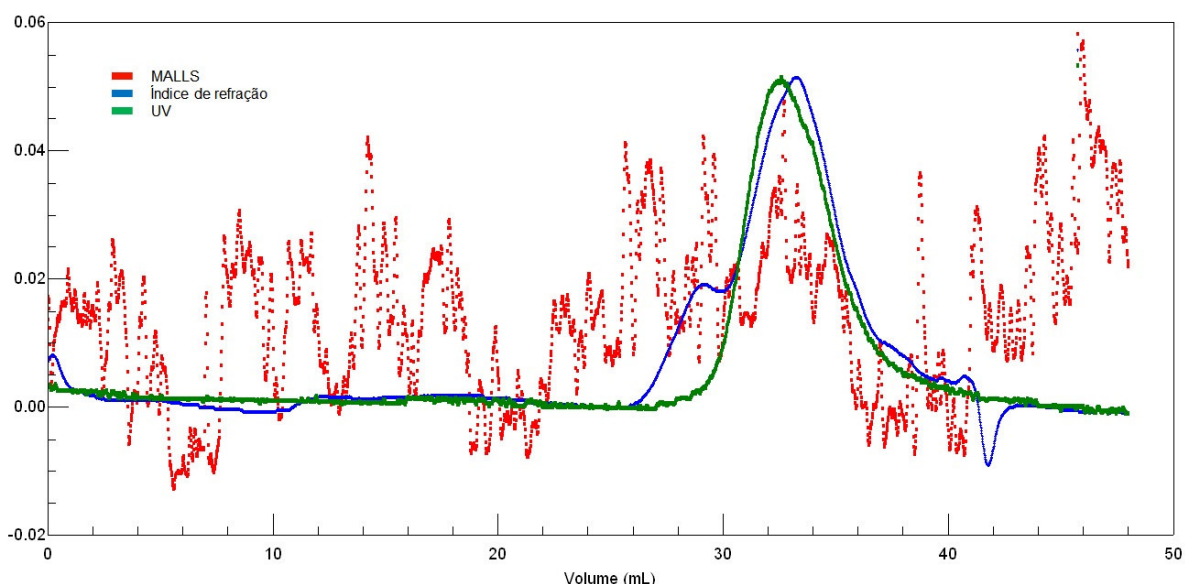


FIGURA 20 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO LYHWS

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Sinais do MALLS em vermelho, índice de refração em azul e UV em verde

A fração LYHWS foi submetida à ultrafiltração como mostrado na Figura 19. A fração LYHWR10 quando observado seu perfil de eluição do HPSEC-MALLS-IR-UV se apresentou com o perfil homogêneo e com um índice de polidispersão de $1,036 \pm 0,227$ (M_w/M_n) (Fig. 21).

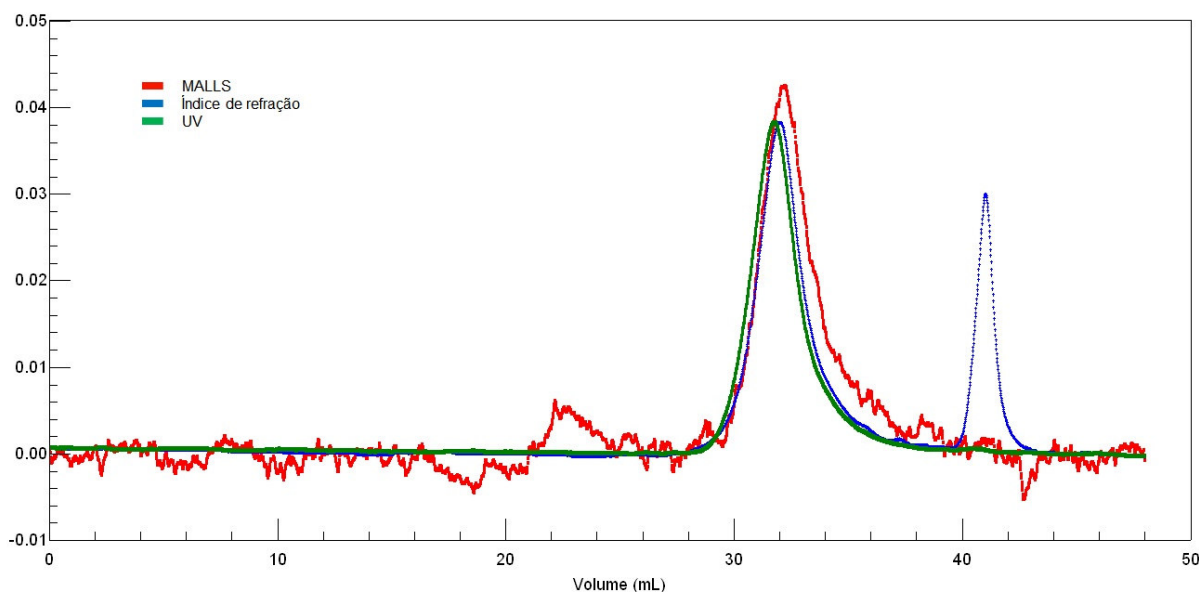


FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO LYHWR10

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Sinais do MALLS em vermelho, índice de refração em azul e UV em verde

Foi realizada uma dosagem de proteínas pelo método de Bradford, (1976) e de carboidratos totais pelo método de Dubois, (1956) que gerou os seguintes resultados: 10,0% de proteínas e 89,9% de carboidratos, as arabinogalactanas-proteínas (AGPs) apresentam aproximadamente esta proporção de proteínas/carboidratos. A fração LYHWR10 foi submetida ao teste de Yariv (Fig. 22). A difusão do precipitado do Reativo Yariv com a AGP de yacon em gel de agarose forma um halo de cor laranja, o qual indica a presença de arabinogalactanas-proteínas (AGPs)

A fração LYHWR10 aparentemente trata-se de uma AGP, formada por um polissacarídeo e um peptídeo com ligação covalente.

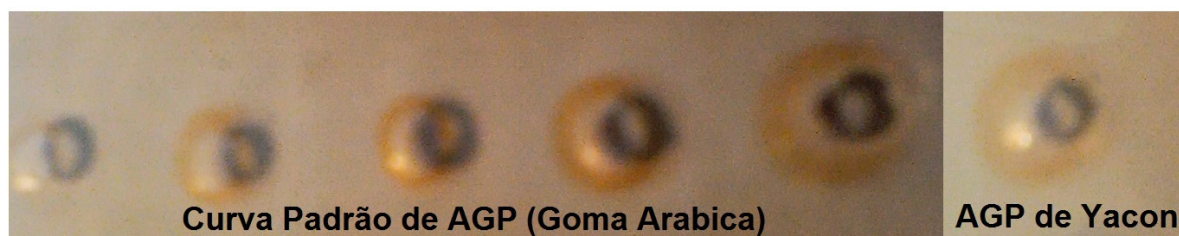


FIGURA 22 - TESTE DO YARIV PARA A FRAÇÃO LYHWR10

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: O halo laranja indica a presença de arabinogalactanas-proteínas, a curva padrão foi preparada com 0,25, 0,50, 1,0, 2,0 e 3,0 μ g

A Fração LYHWR10 será denominada de AGP de yacon para posteriores referências a esta fração.

A composição monossacarídica da AGP foi obtida por Q-HSQC (previamente a AGP foi hidrolisada com TFA 2M, 8h e 100 °C), os principais monossacarídeos encontrados foram: ácido galacturônico, arabinose, ramnose e galactose em menor porcentagem foram detectados sinais de ácido glucurônico, fucose, manose e glucose (TABELA 2).

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AGP DE YACON

GalA	GlcA	Fuc	Ara	Rha	Man	Gal	Glc
9,3	1,8	6,3	16,5	22,8	5,7	29,2	9,0

Fonte: O autor (2015)

Notas: Composição determinada por Q-HSQC ^1H e ^{13}C , dados em porcentagem relativa

TLC da AGP de yacon indicou a presença de ácido galacturônico (Fig. 23), estes foram também quantificados por método químico (8,1%) (Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991).



FIGURA 23 - CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DA AGP DE YACON APÓS HIDROLISE ÁCIDA TOTAL

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: As linhas vermelhas indicam a presença de ácido galacturônico, a fase móvel utilizada foi; acetato de etila:ácido acético:n-propanol:água (4:2:2:1, v.v⁻¹) e o revelador utilizado foi orcinol:H₂SO₄

O espectro ^1H RMN da AGP (Fig. 24) apresenta sinais do polissacarídeo e do peptídeo presentes na AGP, deste espectro observa-se um deslocamento em δ 1,25 atribuído ao H6 de CH₃ de unidades de Rha_p (TANAKA et al., 2010).

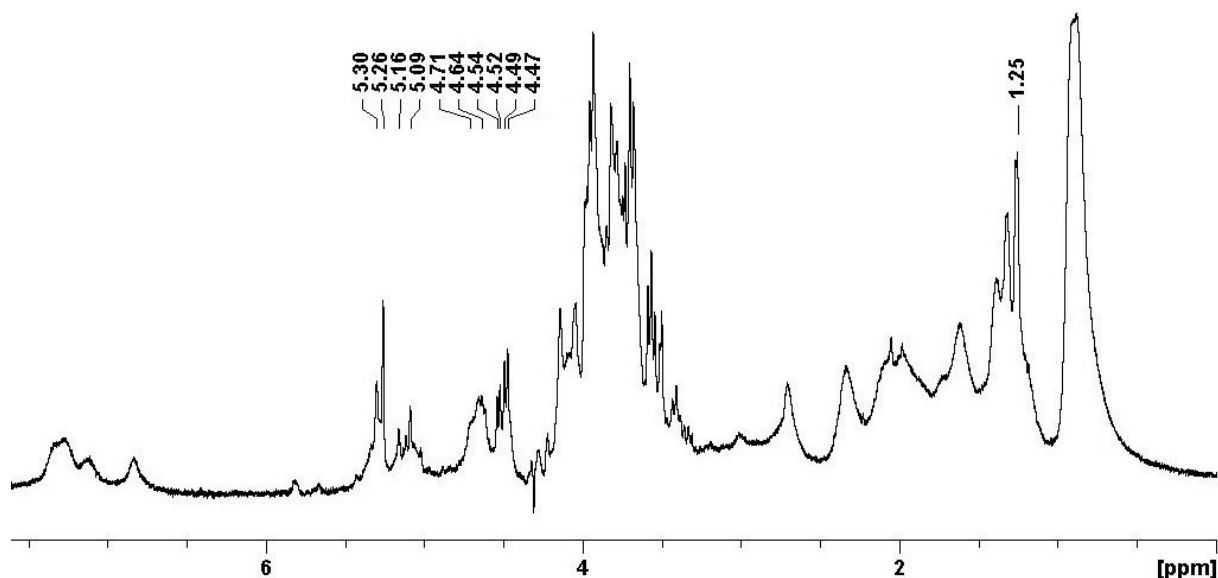


FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN-¹H DA AGP DE YACON

Fonte: O autor (2015)

Notas: Experimentos realizados em D₂O, a 70 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

Os deslocamentos encontrados em δ 4,47, δ 4,49, δ 4,52, δ 4,54 sugerem H1 de β -Galp, deslocamentos similares foram reportados também por Tanaka et al. (2010), Goellner et al. (2011), Qian et al. (2012). Os sinais em δ 4,71 e δ 5,09 foram atribuídos ao H-1 das unidades de GalAp (Fig. 24) (Tanaka et al., 2010). Os deslocamentos em δ 5,16 e δ 5,26 sugerem unidades α -L-Araf, assim como reportado por Steinhorn et al. (2011) e Goellner et al. (2011). O deslocamento identificado em δ 5,30 foi atribuído como H-1 α -Rhap, corroborando com os dados observados por Tanaka et al. (2010).

O espectro de ¹H RMN (Fig. 24) mostra deslocamentos químicos pertencentes a peptídeos o que dificulta a leitura dos deslocamentos do polissacarídeo presente na AGP, para uma melhor visualização e entendimento foi realizado o experimento HSQC. O espectro se apresentou muito complexo e mostra vários deslocamentos para peptídeos, além dos demais atribuídos para o polissacarídeo (Fig. 25).

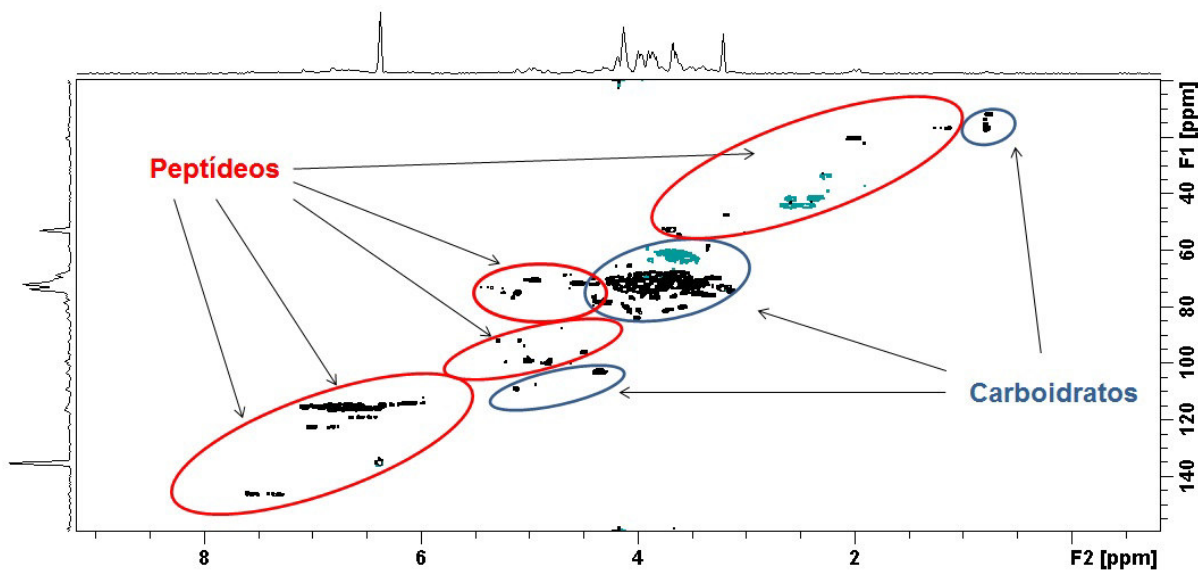


FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN HSQC-(^1H E ^{13}C) DA AGP DE YACON

Fonte: O autor (2015)

Notas: Experimentos realizados em D_2O , a 70°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm., F1 corresponde a ^{13}C e F2 a ^1H

Foi realizado o experimento de oxidação da parte peptídica sem a degradação do carboidrato presente, como demonstraram os pesquisadores Ohno et al, (1999) e Miura et al, (1996), e como o observado nas Figuras 25 e 26.

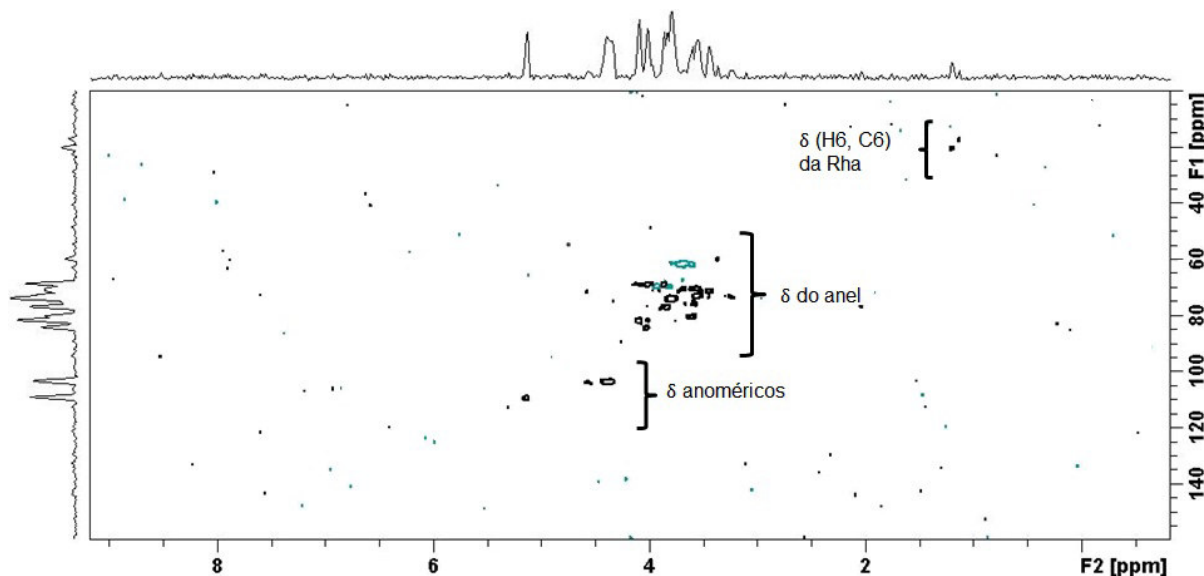


FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN HSQC-(^1H E ^{13}C) DA AGP APÓS DEGRADAÇÃO DO PEPTÍDEO

FONTE: O autor (2015)

Notas: Experimentos realizados em D_2O , a 70°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm., F1 corresponde a ^{13}C e F2 a ^1H . no espectro estão sinalizados os deslocamentos do polissacarídeo.

No espectro HSQC-RMN ^1H e ^{13}C (Figura 27) encontram-se os deslocamentos químicos correspondentes aos H1/C1 anoméricos do polissacarídeo,

entre eles temos o δ 5,13/109,6, identificado como α -L-Araf-5-O-ligado, dados similares foram encontrados por Habibi et al, (2004), o sinal δ 4,57/103,6 foi identificado como β -D-Galp-3-O-ligado o sinal δ 4,40/103,5 foi identificado como β -D-Galp-3,6-O-ligados, da mesma forma, o sinal δ 4,36/103,4 foi identificado como β -D-Galp-6-O-ligado (GOELLNER et al., 2011; MATULUVA et al., 2011). O H6/C6 da Rhap foi assinalado em δ 1,21/20,4 e 1,14/17,2 foram identificadas como α -L-Rhap-2-O-ligado (HABIBI et al., 2004). Estes dados são corroborados pelos resultados da metilação apresentados na Tabela 3. O derivado metilado 2,4,6-Me₃-Gal com 24,3% indica a ligação química β -D-Galp-3-O-ligado, como a maioritaria, o derivado metilado 2,4-Me₂-Gal indica a ligação química β -D-Galp,-3,6-O-ligados, ramificada em C6, o derivado metilado 2,3,4-Me₃-Gal indica ramificações de β -D-Galp-6-O-ligado, os derivados metilados 2,3-Me₂-Ara (17,6%) e 2,3,5-Me₃-Ara (9,4) indicam ramos de unidades de arabinose ligadas em \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf finalizadas por terminais de arabinofuranose. Os derivados metilados 3,4-Me₂-Rha e 2,3,4-Me₃-Rha confirmam a a presença de α -L-Rhap-2-O-ligado e Rhap terminal. Os resultados da metilação e a análise da metilação indicam uma arabinogalactana do tipo II. Na Figura 28, o espectro de HSQC dos carbonos e hidrogênios dos anéis dos carboidratos, esclarece algumas ligações químicas que acontecem na AGP de yacon.

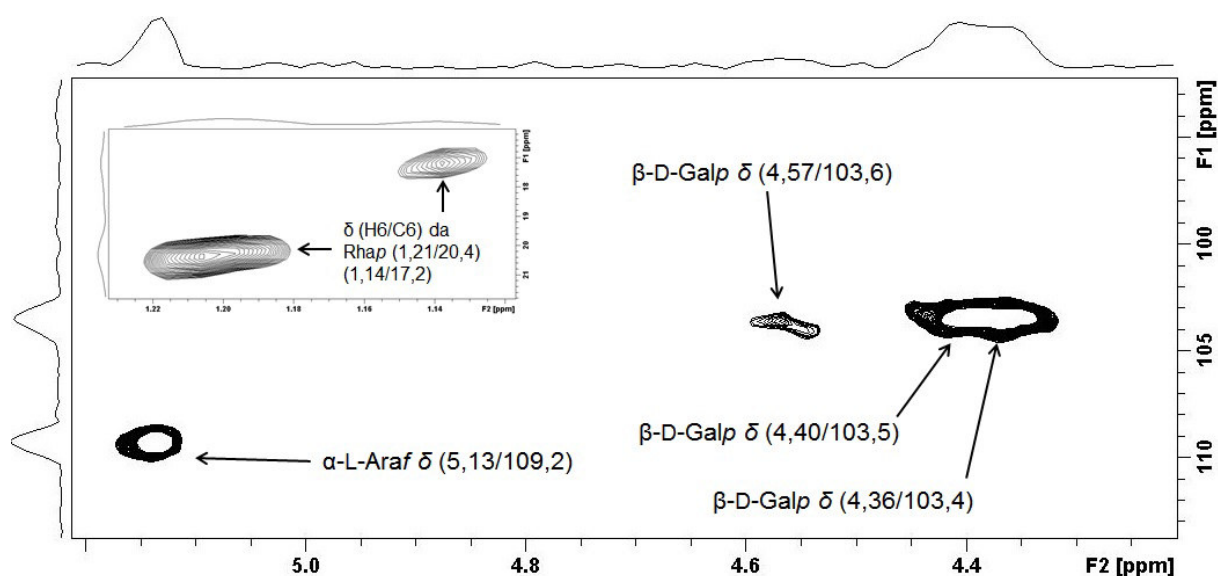


FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN HSQC-(¹H E ¹³C) DA PORÇÃO GLICÍDICA DE AGP

Fonte: O autor (2015)

Notas: Experimentos realizados em D₂O, a 70 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm., F1 corresponde a ¹³C e F2 a ¹H

Na Figura 28 o H5/C5 da α -L-Araf e o H6/C6 da β -D-Galp apresentam-se em fase negativa em δ 3,69/61,6 e 3,62/61,6 respectivamente, indicando que não estão O-substituídos (LIANG et al., 2014). O sinal H6/C6 da Galp-6-O substituída, foram encontrados em δ 3,83/69,7 e 3,80/69,6, o sinal de H5/C5 de unidades de α -L-Araf-O-5-substituídas foram encontrados em δ 3,93/69,6 (LIANG, et al., 2014; CAPEK et al., 2003; SHAKMATOV et al., 2014; WAGNER & JORDAN, 1988).

Os dados de RMN e análise de metilação sugerem uma cadeia principal de \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow com ramificações no C6 da - β -D-Galp-. Além disso, a porção polissacarídica da AGP de yacon apresenta ramificações em \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow que terminam com unidades de terminais não redutoras de \rightarrow 1)- α -L-Araf, ramificações em \rightarrow 6)- α -L-Galp-(1 \rightarrow , ramificações de \rightarrow 1)- α -L-Rhap-(2 \rightarrow que terminam em \rightarrow 1)- β -D-Rhap, pelo derivado metilado 2,3,4,6-Me₄-Gal, a -GalpA poderia se encontrar no final de uma ramificação provavelmente depois de -Araf ou -Galp. A estrutura da AG da AGP encontra-se ramificada. As unidades de arabinoses poderiam estar formando ramos de oligos de Araf-(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow , constituindo em parte à AGP.

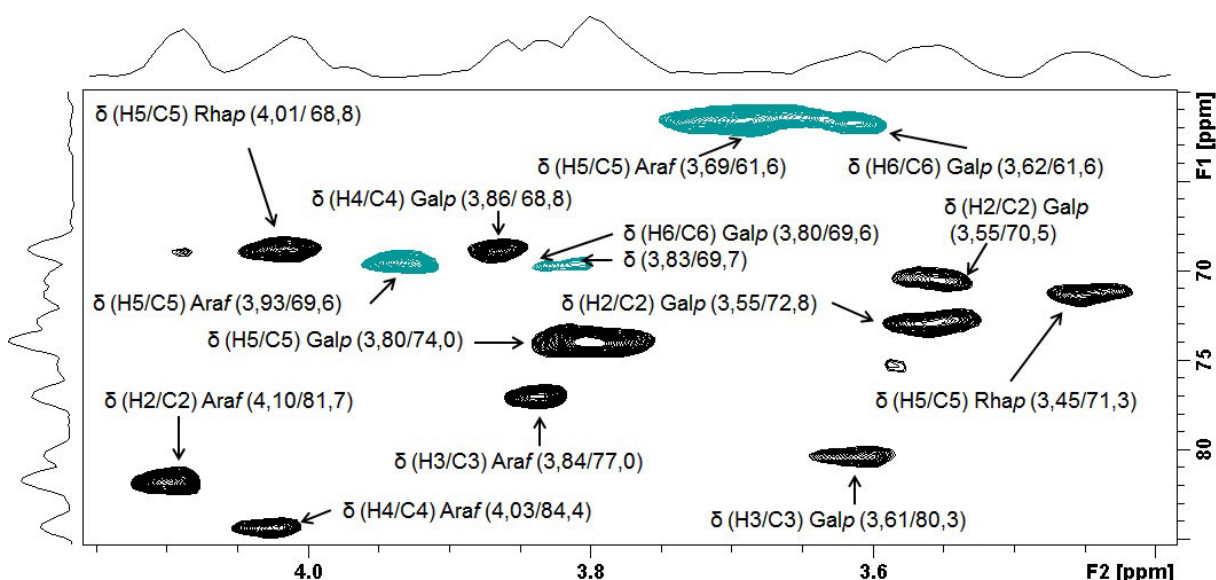


FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN HSQC-(¹H E ¹³C) (EDITADO EM DEPT) PRESENTES NO POLISSACARÍDEO DA AGP DE YACON

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Experimentos realizados em D₂O, a 70 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. F1 corresponde a ¹³C e F2 a ¹H

TABELA 3 – ANÁLISE DOS ALDITOIS ACETATOS PARCIALMENTE METILADOS (PMAA) DOS POLISSACARÍDEOS DA AGP DE YACON

PMAA	% Relativa	Tipo de ligação
2,3,4-Me ₃ -Gal	5,4	→6)-Galp-(1→
2,4,6-Me ₃ -Gal	24,3	→3)-Galp-(1→
2,4-Me ₂ -Gal	13,7	→3,6)-Galp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	5,9	Galp-(1→
2,3-Me ₂ -Ara	17,6	→5)-Araf-(1→
2,3,5-Me ₃ -Ara	9,4	-Araf-(1→
3,4-Me ₂ -Rha	8,2	→2)-Rhap-(1→
2,3,4-Me ₃ -Rha	15,4	Rhap-(1→

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Dados em mol%

5.2.1 Caracterização dos peptídeos da AGP de yacon

Foram realizadas TLC para determinar a presença de aminoácidos da AGP de yacon, uma TLC monodimensional (Item 3.7.1.3) quando comparada com padrões de aminoácidos identificou a presença de valina (Val), fenilalanina (Phe), ác. Glutâmico (Glu), arginina (Arg), treonina (Thr) e/ou alanina (Ala) e glicina (Gly) (Fig. 29). Na TLC Thr, Ser e Ala se encontram sobrepostas, com a finalidade de separar em diferentes bandas este aminoácidos foi realizada uma TLC bidimensional.

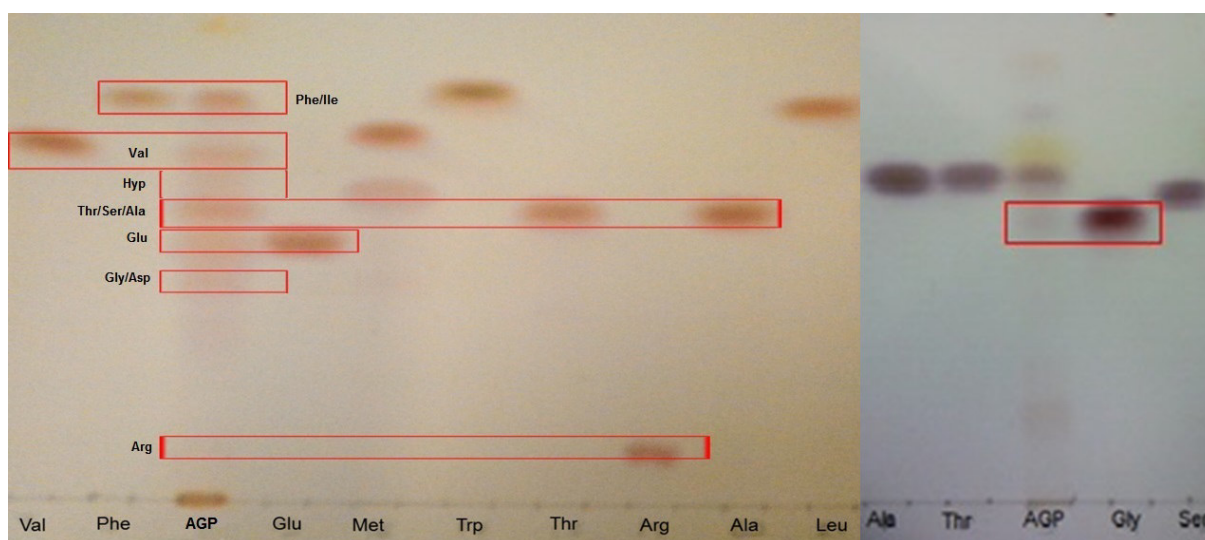


FIGURA 29 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS AMINOÁCIDOS DA AGP DE YACON.

Fonte: O autor (2015)

Notas: Os retângulos vermelhos representam um aminoácido da AGP de yacon com um aminoácido padrão, a fase móvel utilizada foi uma mistura de propanol: água (70:30, v.v⁻¹) e o revelador utilizado foi uma solução etanólica 2% de ninhidrina

Na cromatografia bidimensional da AGP de yacon foi colocado também o Glu por não ser sobreposto na mesma banda que arginina, treonina e alanina (Fig. 30), identificaram-se a presença dos aminoácidos Arg e Glu, não foi possível determinar a presença de Thr e/ou Ala.

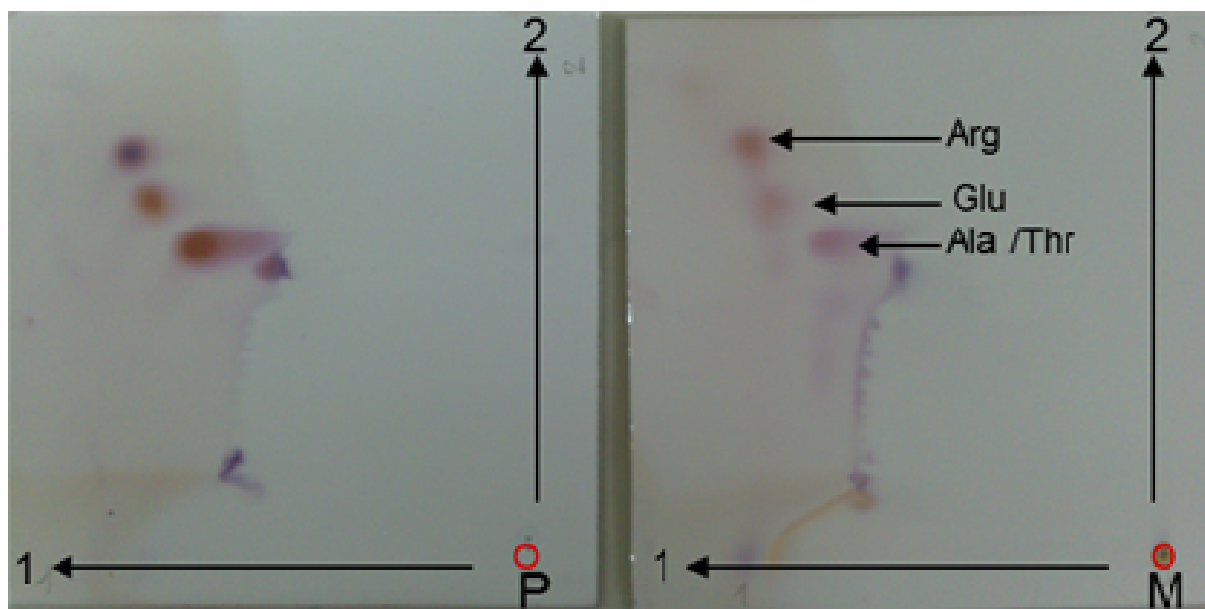


FIGURA 30 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA BIDIMENSIONAL DOS AMINOÁCIDOS DA AGP DE YACON

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: As setas indicam a direção da corrida na TLC bidimensional, padrão (P) (Arg, Glu, Ala, Thr) e AGP de yacon (M) indicam o ponto de início, para a primeira corrida a fase móvel foi piridina:dioxano:hidróxido de amônio:água (35:35:15:15) e na segunda corrida perpendicular à primeira, a fase móvel foi n-butanol:acetona:ácido acético:água (35:35:10:20), sendo o revelador uma solução 2% de ninhidrina

Para quantificar e determinar os aminoácidos presentes na AGP de yacon foi realizado a derivatização destes na forma derivados di-metil-silil-terbutil aminoácidos e sua detecção por GC-MS (Item 3.6.3) (TABELA 4) (FIGURA 31). A valina e isoleucina foram os aminoácidos mais abundantes, seguidos de serina, ácido glutâmico, alanina, hidroxiprolina e asparagina, sendo os de menor quantidade os aminoácidos fenilalanina, treonina e glicina.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS DA AGP DE YACON POR GC-MS

Aminoácidos da AGP de yacon	Eluição (min)	% Relativa
Fenilalanina (Phe)	17,66	4,02
Valina (Val)	10,27	17,16
Ácido glutâmico (Glu)	21,33	12,78
Alanina (Ala)	8,08	12,57
Treonina (Thr)	16,92	3,55
Isoleucina (Ile)	11,20	15,85
Serina (Ser)	16,54	13,8
Asparagina (Asp)	19,25	8,35
Glicina (Gly)	8,47	1,95
Hidroxiprolina (Hyp)	26,94	9,96
Arginina (Arg)	nd	nd

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Dados em min e % relativa, nd não detectado

Através das análises de TLC e GC-MS foi possível identificar e quantificar os aminoácidos presentes na AGP de yacon. Pode-se observar claramente a dificuldade desta análise, a qual não seria possível sem a integração das diferentes técnicas de análise como podemos observar nas Figuras 29 e 30 e os dados da Tabela 5. A isoleucina nas TLCs desenvolvidas mostra a mesma distancia de retenção que a fenilalanina e o mesmo ocorre com a treonina, serina e alanina.

A massa molar (M_w) da AGP de yacon foi calculada utilizando o modelo de Debye, a massa aproximada foi de $1,041 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ (Fig. 31) e radio de giro (R_g) foi de 35,4 nm, os dados foram observados no HPSEC-MALLS usando o software ASTRA 4.5. (Summary-Report). Os resultados são consistentes com descobertas anteriores de outras amostras e confirma que as moléculas têm uma estrutura compacta (MAHENDRAN et al., 2008; AL-ASSAF, PHILLIPSA & WILLIAMS, 2005)

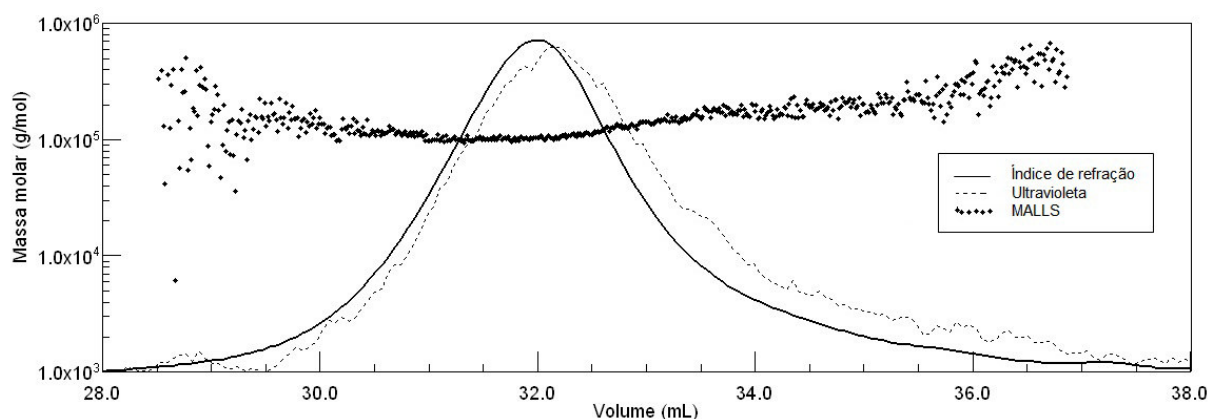


FIGURA 31 – DISTRIBUIÇÃO-MM vs VOLUME DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA AGP DE YACON

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Os detectores utilizados foram: índice de refração, ultravioleta (280nm), MALLS (light scattering (LS)).

As AGPs se apresentam de diferentes formas, com um ou mais grupos de polissacarídeos ligados à cadeia peptídica. São conhecidos três modelos que descrevem as AGPs: o modelo “Wattle Blossom” proposto por Fincher et al, (1983), o “Twisted-hairy rope” proposto por Qi et al, (1991) e o “Wattle Blossom” modificado por Ellis et al, (2010). Para conhecer a forma em que se apresenta a AGP de yacon, foi degradada de forma seletiva a parte peptídica da AGP sem modificar os polissacarídeos presentes. Foi realizado o experimento proposto por Akiyama et al, 1994, com a degradação alcalina de peptídeos utilizando NaOH/NaBH₄ (Item 4.6).

Na Figura 32 são apresentados os espectros de HPSEC-UV (280 nm) da AGP de yacon (Fig. 32A), esta apresentou um perfil homogêneo, depois da primeira degradação (0,2 M de NaBH₄ e 0,5 M de NaOH por 18 h a 50 °C) (Fig. 32B) o perfil de eluição mostrou-se heterogêneo, sugerindo que o peptídeo foi degradado parcialmente. Akiyama et al. (1994) e Mahendran et al. (2008) acreditam que a degradação corresponde a clivagem de O-glicanos nas ligações de polissacarídeo-polipeptídeo, que podem ser de serina ou treonina mas não de hidroxiprolina (esta ligação se apresenta mais estável). Em contraposição a segunda degradação (2 M de NaBH₄ e 1 M de NaOH por 6 h a 100 °C) degrada as ligações mais resistentes como a da hidroxiprolina O-ligada do peptídeo da AGP de yacon, mas não degrada o polissacarídeo (Fig. 32C).

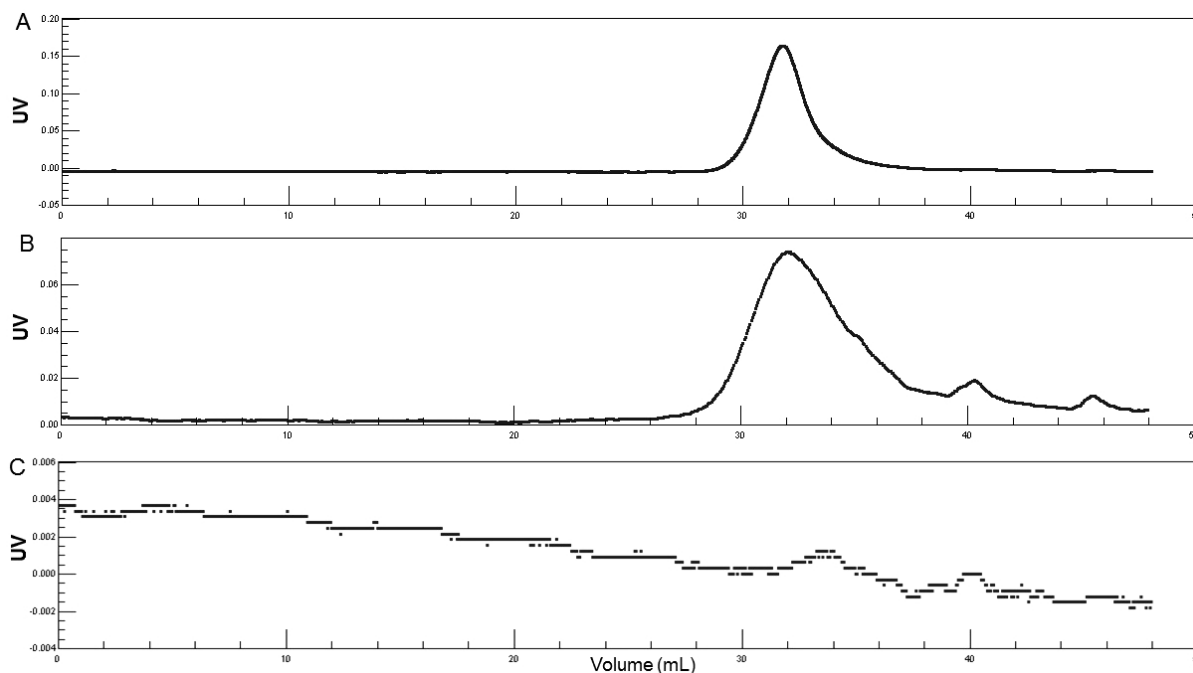


FIGURA 32 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA AGP DE YACON, COMPARAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

FONTES: O autor (2015)

NOTAS: O espectro UV foi realizado a 280 nm. (A) espectro de AGP de yacon. (B) espectro de AGP de yacon degradado com 0,2 M de NaBH_4 e 0,5 M de NaOH por 18 h a 50 °C. (C) espectro de AGP de yacon degradado com 2 M de NaBH_4 e 1 M de NaOH por 6 h a 100 °C

Na Figura 32 foram observadas por HPSEC--UV (280 nm) as degradações do peptídeo da AGP, na Figura 33 são apresentadas as mesmas degradações observadas por HPSEC-IR, depois da primeira degradação alcalina (Fig. 33A) são observados 3 picos (TABELA 5). Na segunda degradação (Fig. 33B) estes picos foram mantidos, da Figura 33 podemos deduzir que os polissacarídeos destes três picos se apresentam em diferentes tamanhos e que o pico 1 se apresenta em menor quantidade que o 2 e este outro em menor quantidade que o 3, estes três polissacarídeos se encontram ligados a uma cadeia peptídica que foi hidrolisada desde a primeira degradação o que sugere que a ligação química entre o polissacarídeo e o peptídeo da AGP de yacon é *O*-glicosídica, provavelmente através da Thr ou Ser.

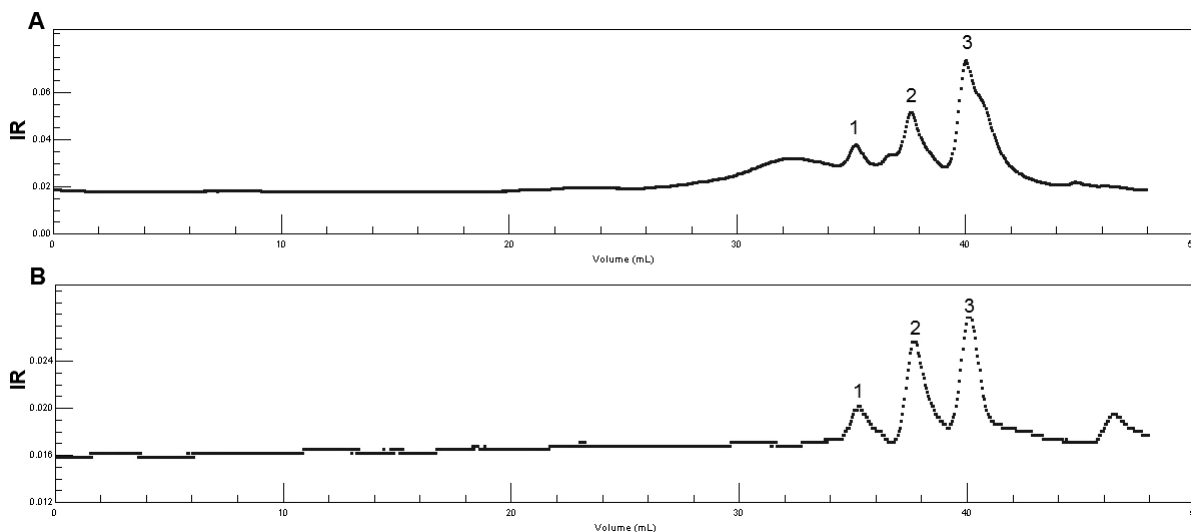


FIGURA 33 - PERFIL DE ELUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA AGP DE YACON APÓS DEGRADAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Os números (1, 2 e 3) indicam os picos encontrados no espectro do HPSEC (índice de refração). (A) degradação realizada com 0,2 M de NaBH_4 e 0,5 M de NaOH por 18 h a 50 °C. (B) degradação realizada com 2 M de NaBH_4 e 1 M de NaOH por 6 h a 100 °C

Para conhecer a massa aproximada dos polissacarídeos presentes na AGP de yacon, foi utilizado o software ASTRA 4.5. A massa aproximada foi calculada utilizando o modelo de Debye, a massa aproximada do pico 1 foi de $8,090 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$, para o pico 2 foi $3,300 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ e para o pico 3 foi de $5,786 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ (Fig. 34) dados observados por HPSEC-MALLS-IR.

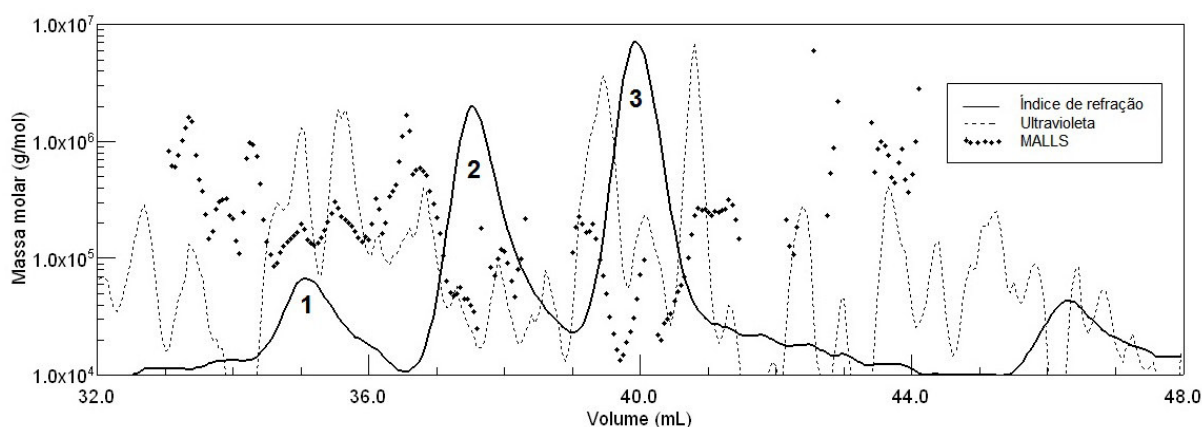


FIGURA 34 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS AG DA AGP DE YACON (MASSA MOLAR/VOLUME)

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Os números (1, 2 e 3) indicam os picos encontrados no espectro do HPSEC (índice de refração). Degradação realizada com 2 M de NaBH_4 e 1 M de NaOH por 6 h a 100 °C

Na Tabela 5 são apresentados os volumes de eluição destes 3 polissacarídeos (arabinogalactanas tipo II) que se encontram ligados ao peptídeo da AGP de yacon. Os picos da primeira e segunda degradação são os mesmos, e os

volumes de eluição foram muito próximos, 37,5 mL e 37,6 mL, sugerindo que se trata dos mesmos glicanos nos dois tratamentos.

TABELA 5 – POLISSACARÍDEOS ELUIDOS APÓS DEGRADAÇÃO DO PEPTIDEO DA AGP DE YACON

AGP de yacon	Primeira degradação			Segunda degradação		
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 1	Pico 2	Pico 3
Volume de Eluição (mL)	35,1	37,5	39,9	35,1	37,6	40,0

FONTES: O autor (2015)

NOTAS: Dados referentes a Figura 35

Pelos dados obtidos pode-se sugerir que a AGP de yacon é formada por uma cadeia peptídica constituída por valina, isoleucina, serina, ácido glutâmico, alanina, hidroxiprolina, asparagina, fenilalanina, treonina, glicina e arginina. Sugere-se que a cadeia peptídica encontra-se ramificada desde a treonina e/ou serina *O*-ligada a polissacarídeos de arabinogalactanas do tipo II de três diferentes tamanhos, a quantidade presente de α -L-Araf-5-*O*-ligados sugere a presença de oligossacarídeos pequenos (DP4) *O*-ligados. Os dados sugerem que a AGP de yacon se apresenta como o modelo proposto na Figura 35.

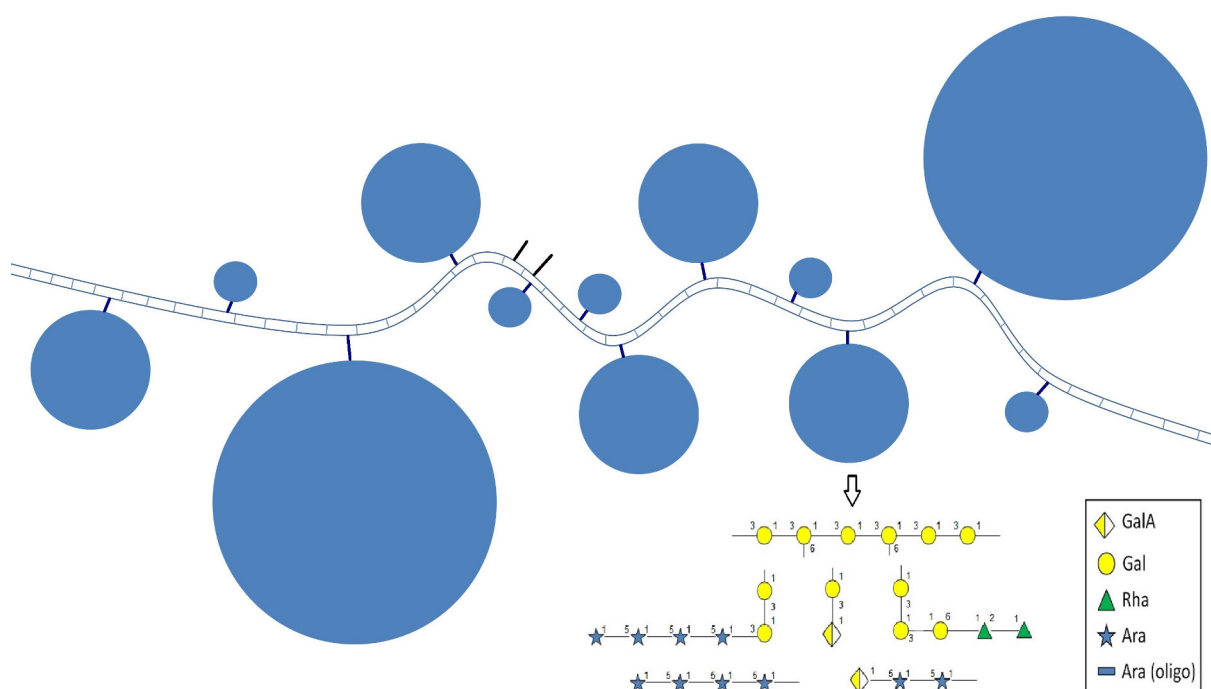


FIGURA 35 – ESTRUTURA DA AGP DE YACON PROPOSTA

FONTES: o autor

NOTAS: AGP de yacon, os círculos em azul representam as AG do tipo II

5.3 FOS DE YACON: CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE SOBRE A FAGOCITOSE DE LEVEDURAS POR MACRÓFAGOS

Nestes experimentos foi analisado o efeito da fração RYPFR5 rica em FOS, sobre macrófagos derivados da linhagem de monócitos THP-1 e livres de LPS (teste realizado por GC-MS).

Primeiramente foram realizados testes de viabilidade celular das células THP-1 após exposição à fração RYPFR5 pelo método MTT (Fig. 36) para concentrações de 250, 50 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de RYPFR5 por 24 e 48 horas de tratamento. Neste teste os resultados não apresentaram diferenças estatísticas significativas (teste do *Tukey*). A média do grupo de 24 h foi de 99,7, 95,8 e 91,5% para 10, 50 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, esta se encontra perto do 100% (controle), por outro lado para 48 horas, esta se encontra entre 70 e 80% aproximadamente (Fig. 36), para o experimento de fagocitose o período de contato dos macrófagos com a fração RYPFR5 foi de 24 horas.

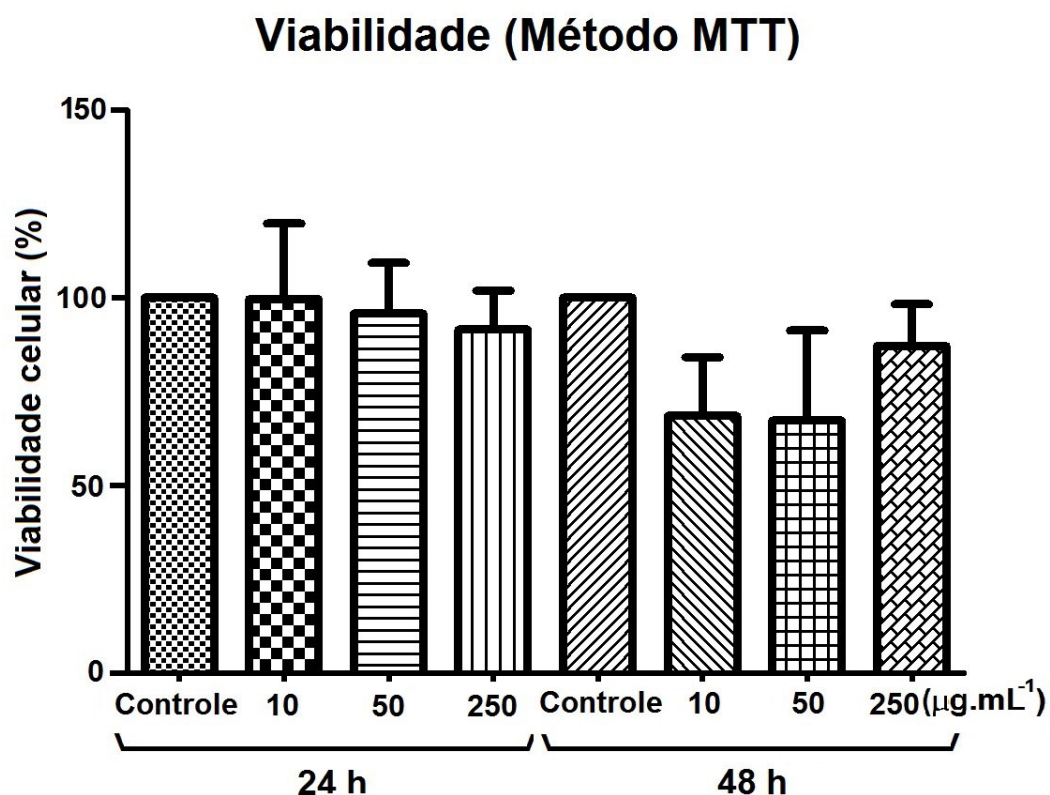


FIGURA 36 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT

FONTE: O autor

NOTAS: O controle representa o 100% de viabilidade

As leveduras internalizadas mostram uma cor mais intensa, estas encontram-se rodeadas por uma cor de menor intensidade que as delinea, as leveduras ao redor dos macrófagos não foram contabilizadas (Fig. 37).

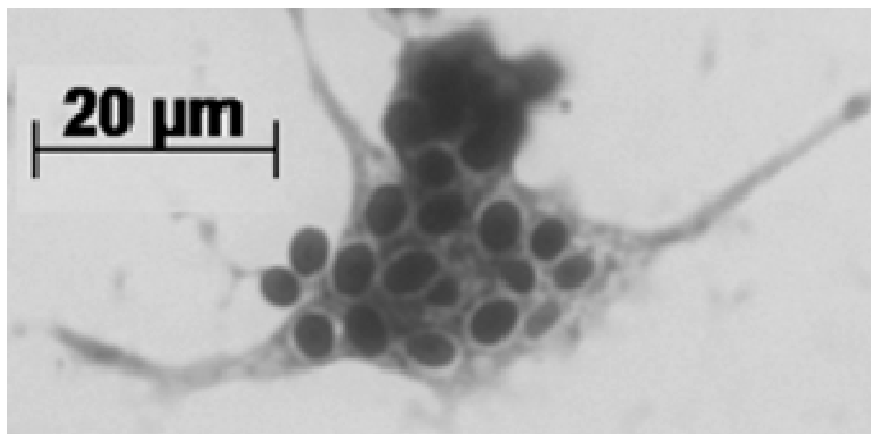


FIGURA 37 - FAGOCITOSE DE LEVEDURAS POR MACRÓFAGOS

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Na figura o macrófago internalizou varias leveduras

A porcentagem de fagocitose indica quantos macrófagos de 100 são capazes de internalizar leveduras, por outro lado o IF avalia a eficiência dos macrófagos na fagocitose; por exemplo, na Figura 37 o macrófago internalizou 12 leveduras, então é um macrófago com mais de 10 leveduras internalizadas, na equação da Figura 38 este macrófago corresponde a macrófagos do tipo "D", então a quantidade de macrófagos com este comportamento recebe o índice de 20.

$$\% \text{ Fagocitose} = \frac{\text{N}^\circ \text{ macrófagos com leveduras}}{\text{Total de macrófagos}}$$

$$\text{IF} = \frac{100 \times \{A + (3,5B) + (8C) + (20D)\}}{\text{Total de macrófagos}}$$

FIGURA 38 - CÁLCULO DO % DE FAGOCITOSE E ÍNDICE DE FAGOCITOSE

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: IF (índice de fagocitose), A= macrófagos com uma levedura internalizada, B= macrófagos com 2 a 5 leveduras internalizadas, C= macrófagos com 6 a 10 leveduras internalizadas, D= macrófagos com mais de 10 leveduras internalizadas

A porcentagem de fagocitose (Fig. 39A) representa a quantidade de leveduras internalizadas no macrófago, o índice de fagocitose (IF) (Fig. 39B)

incrementa-se com o tempo. A concentração dos FOS de yacon demonstrou um efeito dependente da concentração de RYPFR5 até 60 minutos, quando analisados nos primeiros 30 minutos acontece um efeito inverso ao observado em 60 e 90 minutos. Estes dados sugerem que os macrófagos necessitam de um tempo inicial para iniciar a fagocitose.

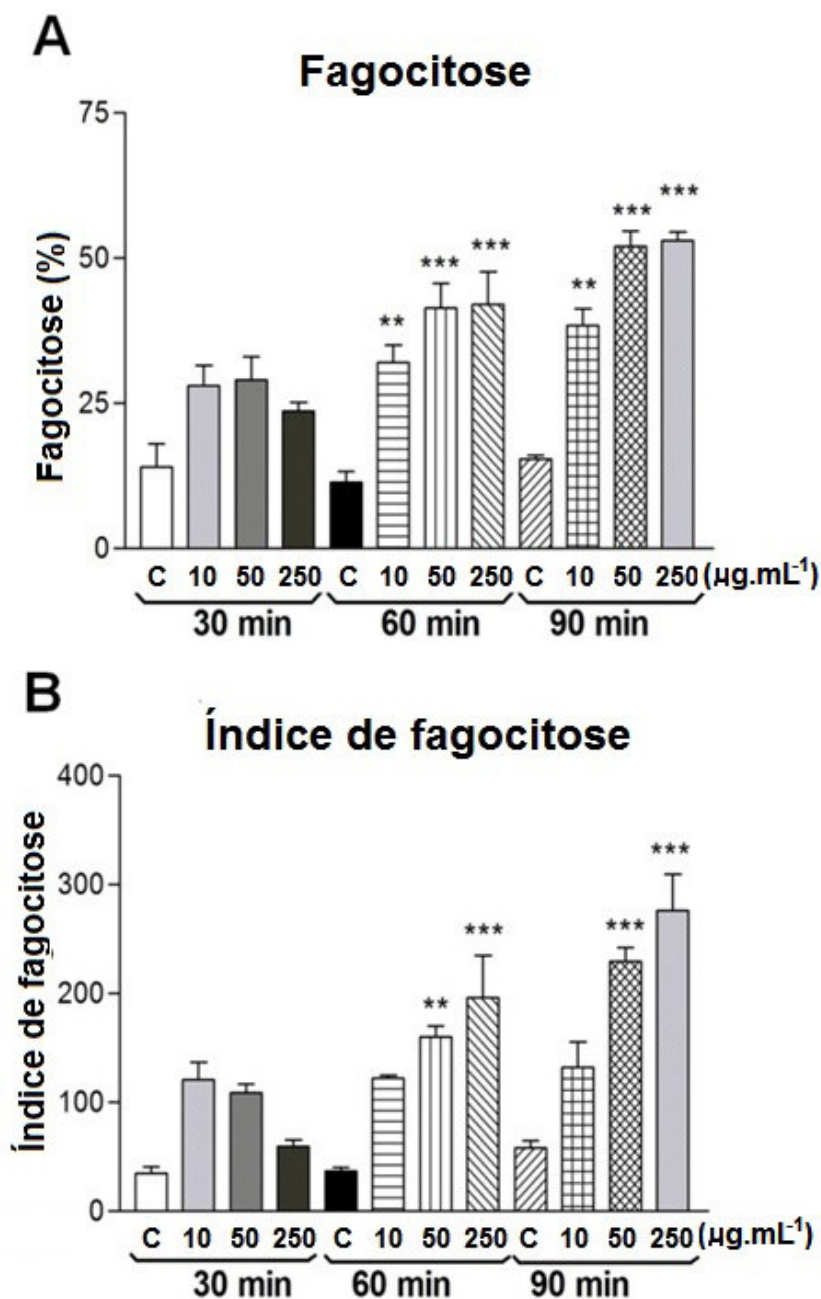


FIGURA 39 - FAGOCITOSE E ÍNDICE DE FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Contagem de leveduras e macrófagos realizado sobre a lamínula com ajuda de microscópio ótico, para tempos de incubação de 30, 60 e 90 min. E 10, 50 e 250 µg.mL⁻¹, ***= 0,01, **=0,05 (significância estatística em relação ao controle)

Segundo os perfis da porcentagem de fagocitose e índice de fagocitose (Fig. 39A e 39B) quando comparado ao controle e com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 30 minutos do tratamento, observa-se que este é 3 vezes mais eficiente na fagocitose. Provavelmente a pouca diferença de IF para as concentrações de 50 e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, nos tempos de 60 e 90 minutos no cálculo de % de fagocitose, podem ser explicados pela saturação dos receptores de membrana do macrófago (SASSAKI et al., 2014).

Alguns polissacarídeos e oligossacarídeos são conhecidos por serem modificadores exógenos da resposta biológica, e por isso são denominados de alimentos funcionais (LEUNG et al., 2006). Os FOS são considerados alimentos funcionais por serem prebióticos, pois promovem uma série de benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol sérico até o auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer (PASSOS; PARK, 2003, QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009). Neste experimento os FOS apresentaram atividade imunomoduladora ao incrementar o índice de fagocitose de macrófagos.

5.4 INFLUÊNCIA DOS FOS DE YACON NA PROLIFERAÇÃO E MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16-F10

Os FOS são conhecidos por apresentar propriedades imunomoduladores, são conhecidos polissacarídeos que se associam aos receptores de membrana para estimular os macrófagos, os FOS poderiam atuar sobre as células cancerígenas. Diante destes efeitos foram realizados testes de proliferação celular com a linhagem celular B16-F10 na presença de FOS de yacon.

Os resultados destes testes (Fig. 40) indicaram um efeito dependente da concentração de RYPFR5, os resultados apresentaram significância estatística entre as concentrações de 25, 50 e 100 com a de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os carboidratos presentes na fração RYPFR5 aparentemente foram utilizados como fonte de carbono, o que explica a dose dependência e maior proliferação. Yang et al. (2012) encontraram que maiores quantidades de carboidratos no meio, inibem a apoptose de B16-F10 quando expostas a L-ascorbato de sódio (indutor de apoptose em B16-F10). Como

demonstrado na Figura 16 e 18 os dados de ESI-MS e TLC a fração RYPFR5 apresentaram frutose e/ou glucose livre como constituintes, isso poderia explicar o efeito de aumento na capacidade proliferativa em BF16-F10, uma vez que células tumorigênicas tem elevada capacidade metabólica visando o crescimento e sua multiplicação celular.

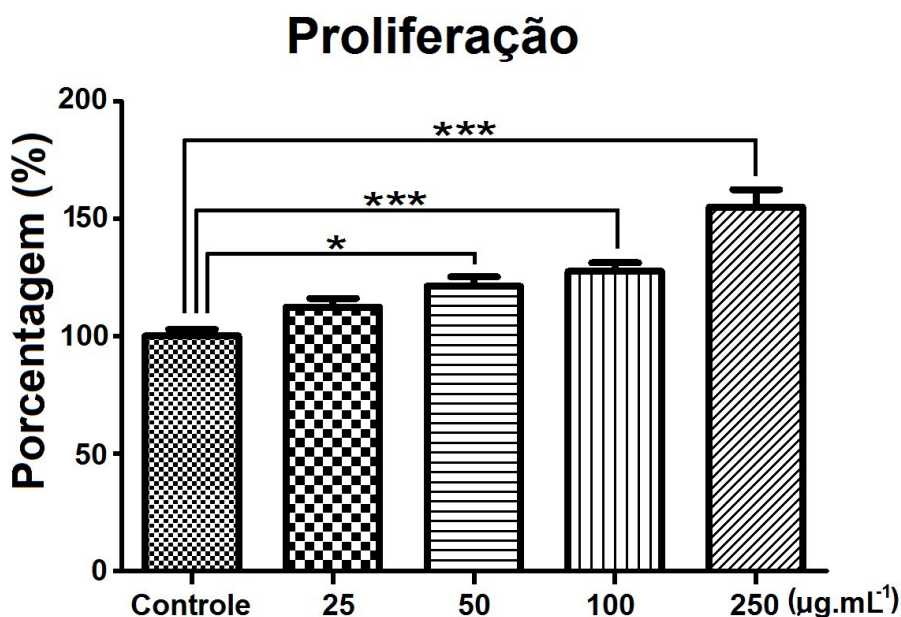


FIGURA 40 - PROLIFERAÇÃO CELULAR DE B16F10 EM PRESENÇA DE FOS

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: * = 0,05 (significância estatística)

As células B16-F10 se apresentam em variadas formas e tamanhos, possuem grandes extensões que lhes permite a mobilidade, neste trabalho apresentamos fotografias de microscopia de varredura a 3500x (Fig. 41A) e 5000x (Fig. 41B).

A morfologia de células B16-F10 testadas com FOS de yacon foi observada com microscopia de varredura (25 e 50 µg.mL⁻¹) (Fig. 41C e 41D, Fig. 41E e 41F respectivamente).

Comparada a morfologia de células B16-F10 da Figura 41(A, B, C, D, E, F), estas não apresentam diferenças significativas, observa-se extensões similares entre as células do controle e as do tratamento com FOS (Fig. 41). Os resultados sugerem que a presença de FOS de yacon nas concentrações de 25 e 50 µg.mL⁻¹, não modificam a morfologia de células B16-F10.

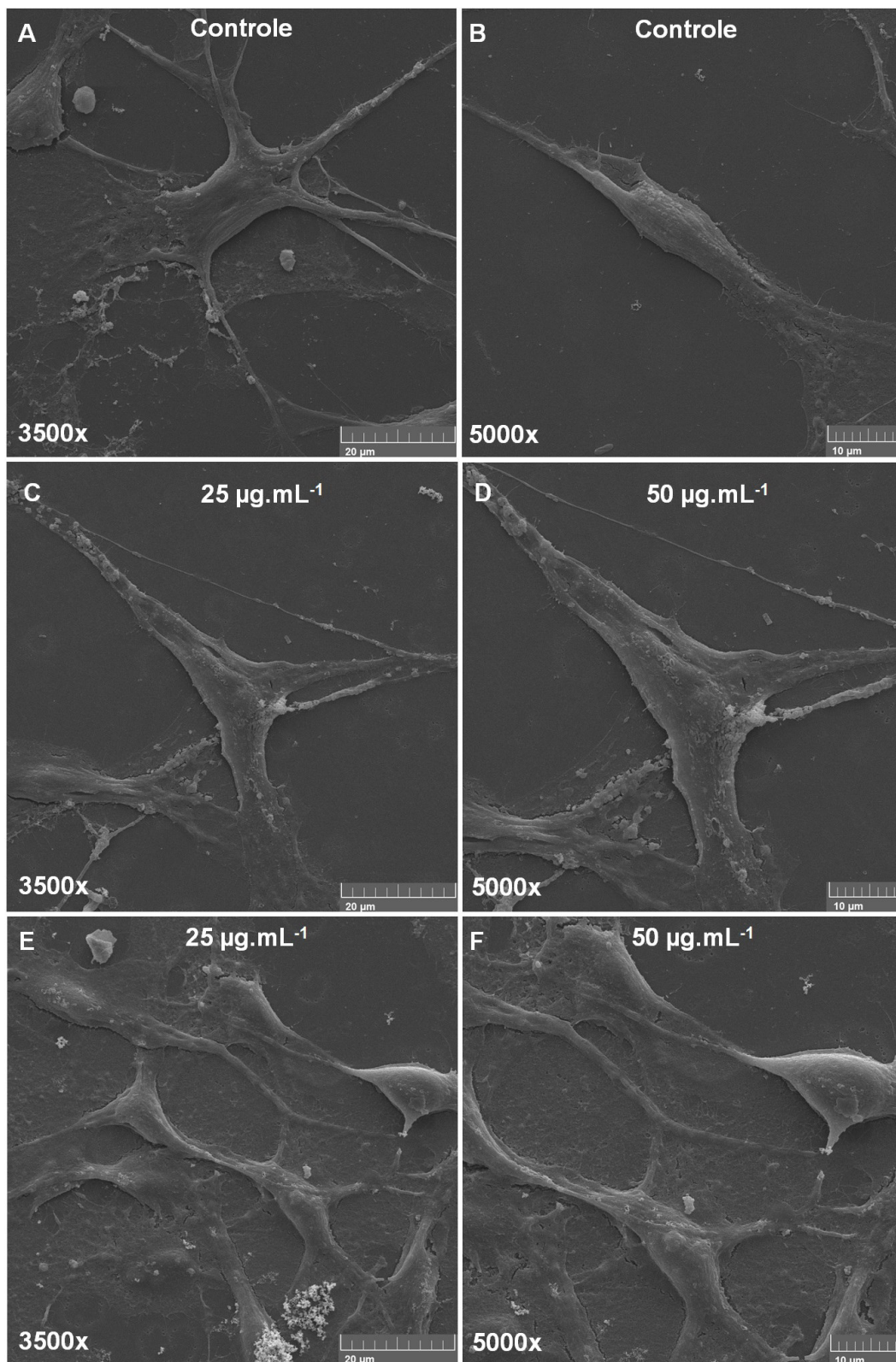


FIGURA 41 - MICROSCOPIA DE VARREDURA DE CÉLULAS B16F10

Fonte: O autor (2015)

Notas: Células sem tratamento, (A) aumento a 3500x, (B) aumento a 5000x, (C) tratamento com 25 g.mL⁻¹ (3500x), (D) tratamento com 25 µg.mL⁻¹ (5000x), (E) tratamento com 50 µg.mL⁻¹ (3500x), (F) tratamento com 50 µg.mL⁻¹ (5000x)

5.5 REOLOGIA DOS FOS DE YACON

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo da matéria. Estruturas sensíveis a uma força podem ser danificadas, modificando assim as suas propriedades reológicas, conhecer o comportamento reológico dos materiais está relacionado com um bom processo industrial (SCHRAMM, 1998; BARNES, 1994). A reologia encontra-se presente na indústria de alimentos desde os cálculos na engenharia de processos, no desenvolvimento de novos produtos, controle de qualidade em produtos intermediários e finais, na avaliação na qualidade e preferência do consumidor. As provas sensoriais, bem como as medidas reológicas e de plasticidade influenciam, por exemplo, a forma de escoamento no recipiente que o contém.

As curvas de fluxo da fração RYPFR5 (Fig. 43) mostraram um comportamento mixto, inicialmente apresenta um comportamento Newtoniano e posteriormente pseudoplástico.

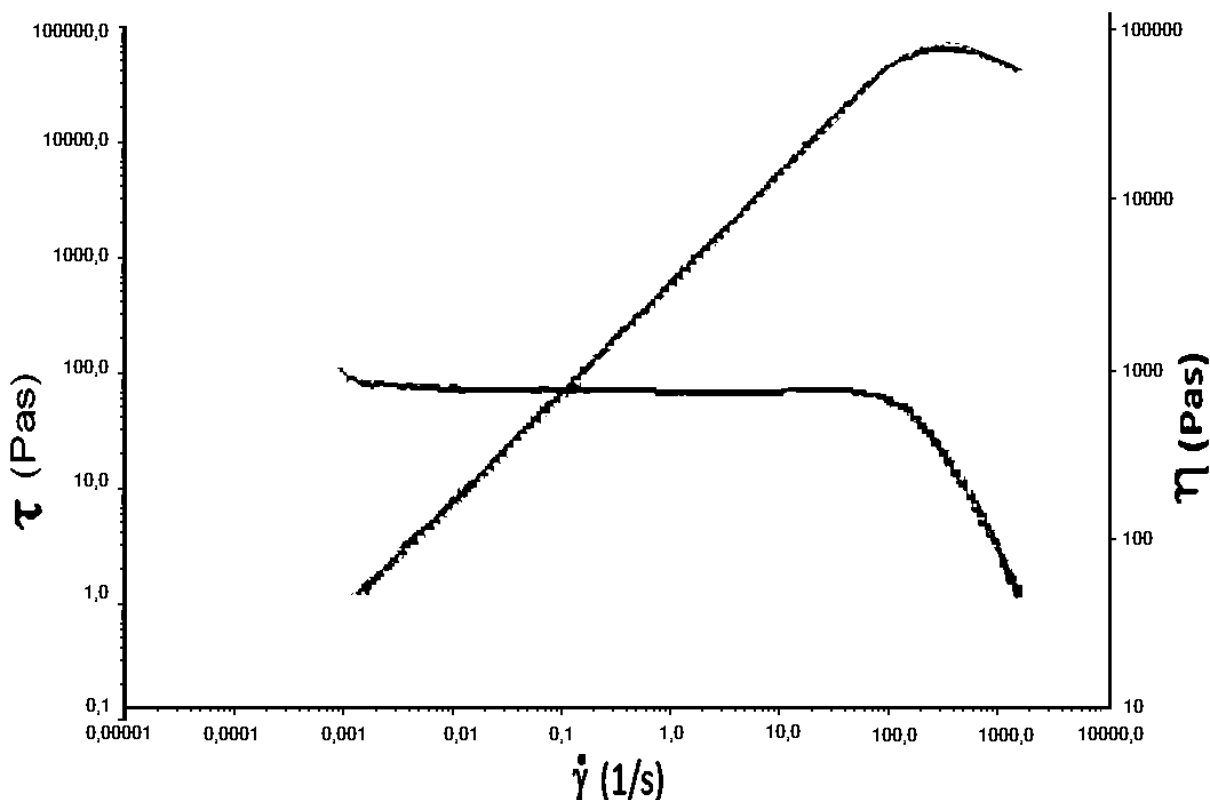


FIGURA 42 - CURVAS DE FLUXO DE FOS CONCENTRADO

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: tensão de cisalhamento contra taxa de cisalhamento e viscosidade contra taxa de cisalhamento

Os fluidos pseudoplásticos apresentam uma relação não linear entre τ e $\dot{\gamma}$ e respondem a equação de Oswald de Waele ou lei da potência, representados pela equação:

$$\tau = k \dot{\gamma}^n$$

Onde: τ (tensão de cisalhamento) é a força aplicada tangencialmente sobre a área do líquido e é medida em Pa (Pascal); $\dot{\gamma}$ (taxa de cisalhamento) K e n são parâmetros do modelo de fluxo. K se denomina índice de consistência e n é o índice de fluxo. Para fluidos pseudoplásticos $n < 1$. Os cálculos realizados para a curva de fluxo da fração RYPFR5 resultaram em coeficientes de $k = 588$ e $n = 0,89$.

Ahmed et al. (2007) identificaram que um mel da Índia apresentava comportamento reológico tipo Herschel-Bulkley ($\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n$), com valores de 0,005 até 0,04 Pa, k de 0,47 até 15,98 Pa.sⁿ e n de 0,92 até 0,99; os autores mencionam que outros meis apresentam um comportamento newtoniano. As propriedades reológicas estão correlacionadas com a estrutura dos materiais, os materiais com comportamento newtoniano possuem uma estrutura mínima e não exige força para iniciar o fluxo (exemplo água), os que apresentam comportamento de Bingham tem uma estrutura fraca (exemplo pasta de dentes) esta precisa de um esforço maior para fluir. Já os fluídos pseudoplásticos apresentam uma estrutura enfraquecida na reorganização dos elementos estruturais durante o cisalhamento (exemplo FOS de yacon), fluidos Herschel-Bulkley possuem estruturas que precisam ser interrompidas antes de fluir (a existência dessa rede resulta num comportamento de pseudoplasticidade) o que se consegue mediante deformação adicional (exemplo géis alimentares) (ZHONG; DAUBERT, 2007). Pelos dados bibliográficos analisados fluidos pseudoplásticos precisam de menor esforço para fluir que os fluidos Herschel-Bulkley, em consequência os FOS de yacon fluem com um menor esforço que o mel da Índia estudado por Ahmed et al. (2007).

A Adição de inulina em iogurtes incrementa a viscosidade aparente no produto no período de armazenamento (DEBON et al., 2010), está adição melhora a viscosidade deste produto. As inulinas de cadeia curta como os FOS de yacon poderiam resultar em melhoras na apresentação de outros produtos processados, atendendo as necessidades almejadas pelos consumidores destes produtos.

6 CONCLUSÕES

Os carboidratos presentes na fração RYPFR5 de yacon foram identificados como hexoses (Glc ou Fru) e FOS de cadeia linear, com grau de polimerização variável, este se inicia com uma glucose α -(1→2)-ligada a frutose β -D-(1→2) que se liga a outra frutose até atingir um grau de polimerização de 10 unidades.

Os carboidratos presentes na fração RYPFR5 de yacon aumentaram o índice de fagocitose de macrófagos derivados de monócitos THP-1 quando testadas em leveduras, aumentando o índice de fagocitose 3 vezes mais que o controle.

Os FOS de yacon estimularam a proliferação de melanoma murino (linhagem celular B16-F10) e não alteram a sua morfologia nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Os carboidratos presentes na fração RYPFR5 de yacon apresentam um comportamento reológico mixto, inicialmente Newtoniano e posteriormente pseudoplástico, podendo ser usado para alguns fins industriais (na incorporação de alimentos processados).

As AGPs das folhas de yacon foram identificadas como arabinogalactana-proteínas que apresentam uma cadeia principal peptídica formada por: valina, isoleucina, serina, ácido glutâmico, alanina, hidroxiprolina, asparagina, fenilalanina, treonina, glicina e arginina, e ligadas ao polissacarídeo via serina e/ou treonina (ligação O-glicano). A porção glicídica das AGPs são formadas por arabinogalactanas do tipo II com três diferentes massas moleculares aproximadas de $8,090 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $3,300 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e de $5,786 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, e as análises RMN e metilação sugerem que estas são compostas por uma cadeia principal de β -D-Galp-(1→3), ramificadas em (O-6) por terminais de β -D-Galp, 1,6- β -D-Galp e de cadeias α -L-Rhap-(1→2)- α -L-Rhap e/ou α -L-Araf-(1→5)- α -L-Araf-(1→5)- α -L-Araf-(1→5)- α -L-Araf.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. *Immunologia celular e molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: *Elsevier*, 2005.

ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, n. 5, p.269-276, 1965.

AHMED, J., PRABHU, S. T., RAGHAVAN, G. S. V. & NGADI, M. Physico-chemical, rheological, calorimetric and dielectric behavior of selected Indian honey. **Journal of Food Engineering**. n. 79, p. 1207–1213, 2007.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Review**, n. 124, p. 783-801, 2006.

AKIYAMA, Y., SHIGERU, E. & KATO, K. Gum Arabic is a Kind of Arabinogalactan-Protein. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 48, n.1, p. 235-237, 1984.

AL-ASSAF, S., PHILLIPSA, G. O. & WILLIAMS, P. A. Studies on acacia exudate gums. Part I: the molecular weight of Acacia senegal gum exudate. **Food Hydrocolloids**. n. 19, p. 647-660, 2005.

APOLINÁRIO, A. C., DE LIMA DAMASCENO, B. P. G., ESBERARD DE MACÊDO BELTRÃO, N., PESSOA, A., CONVERTI, A., e DA SILVA, J. A. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**. n. 101 p. 368– 378, 2014.

ASAMI, T.; MINAMISAWA K.; TSUCHIYA T.; KANO K.; HORI I.; OHYAMA T.; KUBOTA M.; SUKIHASHI T. Fluctuations of oligofructan contents in tubers of yacón (*Polymnia sonchifolia*) during growth and storage. **Japan Journal Soil Science Plant Nutrition**, n. 62, p. 621-627, 1991.

ASPINALL, G.O. In: Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. **New York: Academic Press**, p. 95-115, 1973.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p. 143, 1997.

AYBAR, M. J.; RIERA, A. N. S.; GRAU, A.; SANCHEZ S. S. Hypoglycemic effect of the water of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **J. Ethnopharmacol**, n. 74, p. 125–132, 2001.

BACIC, A., GELL, A. C. & CLARKE, A. E. Arabinogalactan proteins from stigmas of *Nicotiana glauca*. **Phytochemistry**. v. 27, n. 3, p. 679-684, 1987.

BARNES H.A. Rheology of emulsions - a review. **Colloids Surfaces. A. Physicochem. Eng. Aspects**, n. 91, p. 89-95, 1994.

BAUMGARTNER S., DAX T.G., PRAZNIK W. and FALK H. Characterisation of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). **Carbohydrate Research**, n. 328, p. 177-183, 2000.

BENKEBLIA, N. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. **Journal of Chromatography A**, n. 1313, p. 54-61, 2013.

BENTO, J. F., NOLETO, G. R. & PETKOWICZ, C. L. O. Isolation of an arabinogalactan from *Endopleura uchi* bark decoction and its effect on HeLa cells. **Carbohydrate Polymers**. n. 101, p. 871– 877, 2014.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**. n. 72, p. 248-254, 1976.

BRAZ DE OLIVEIRA, A. J., CORDEIRO, L. M. C., GONÇALVES, R. A. C., CEOLE, L. F., UEDA-NAKAMURA, T. & IACOMINI, M. Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1→6)-d-galactan core from *Stevia rebaudiana* leaves. **Carbohydrate Polymers**. n. 94, p. 179–184, 2013.

BRAZ DE OLIVEIRA, A. J.; GONÇALVES, R. A. C.; CHIERRITO, T. P. C.; MÜLLER DOS SANTOS, M.; MERA DE SOUZA, L.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii. **Food Chemistry**, n. 129, p. 305–311, 2011.

BRECKER, L., WICKLEIN, D., MOLL, H., FUCHS, E. C., BECKER, W. M. & PETERSEN, A. Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phleum pratense* L.). **Carbohydrate Research**. n. 340, p. 657-663, 2005.

BUCHI, D. F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Struct. Funct.** Kyoto, n. 18, p. 399-407, 1993.

BRUYN, A. & VAN LOO, J. The identification by ¹H- and ¹³C-n.m.r. spectroscopy of sucrose, I-kestose, and neokestose in mixtures present in plant extracts. **Carbohydrate Research**. n. 211, p. 131-136, 1991.

CAPEK, P.; HRIBALOVÁ, V.; SVANDOVÁ, E.; EBRINGEROVÁ, A.; SASINKOVÁ, V.; MASAROVÁ, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 33, p. 113-119, 2003.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: Courier, p. 52-108, 2000.

CARPITA, N.C., GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, n. 3, p. 1-30, 1993.

CAUSEY, J.L., FEIRTAG, J.M., GALLAHER, D.D., TUNGLAND, B.C., AND SLAVIN, J.L. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. **Nutrition Research**. n. 20, p. 191-201, 2000.

CHANDRASHEKAR P.M. and VENKATESH Y.P. Identification of the protein components displaying immunomodulatory activity in aged garlic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 124, p. 384-390, 2009.

CHEN, X. & TIAN, G. Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan. **Carbohydrate Research**. n. 338, p. 1235–1241, 2003.

CHERBUT, C. Inulin and oligofructose in the dietary fiber concept. **British Journal of Nutrition**. n, 87: S159-S162, 2002.

CHIBA, K., KAWAKAMI, K. & TOHYAMA, K. Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. **Toxicology in Vitro**. n. 12, p. 251-258, 1998.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, M. L. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, n. 115, p. 687–690, 2009.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; M. DE SOUZA, L.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, n. 74, p. 274–278, 2008.

CIPRIANI, T. R. **Polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (ESPINHEIRA-SANTA) com atividade gastroprotetora**. Tese (Doutorado em Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2007.

CIPRIANI, T. R., MELLINGER, C. G., SOUZA, L. M., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., MARQUES, M. C. A., et al. A polysaccharide from tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, n. 69, p. 1018–1021, 2006.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, n. 131, p. 209-217, 1984.

CLARK, W. H., JR. et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol**, v. 15, n. 12, p. 1147-65, 1984.

DAIGNEAULT, M., PRESTON, J.A., MARRIOTT, H.M., WHYTE, M.K. and DOCKRELL, D.H., The identification of markers of macrophage differentiation in

PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PloS one**, n. 5, 2010.

DAMSKY JR., W. E. & BOSENBERG, M. Mouse melanoma models and cell lines. **Pigment Cell Melanoma Res.** n. 23, p. 853–859, 2010.

DARTORA, N., DE SOUZA, L. M., PAIVA, S. M. M., SCOPARO, C. T., IACOMINI, M., GORIN, P. A. J., RATTMANN, Y. D. & SASSAKI G. L. Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: A potential adjuvant in sepsis treatment. **Carbohydrate Polymers.** n. 92, p. 1776–1782, 2013.

DE ROOVER, J., VANDENBRANDEN, K., VAN LAERE, A., VAN DEN ENDE, W. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). **Planta**, n. 210, p.808-814, 2000.

DEBON, J., PRUDÊNCIO, E. S. & CUNHA PETRUS, J. C. Rheological and physico-chemical characterization of prebiotic microfiltered fermented milk. **Journal of Food Engineering.** n. 99, p. 128–135, 2010.

DEY, P.M.; BROWNLEADER, M.D.; HARBORNE, J.B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry.** Bristol: Academic Press, p. 6-9, 1997.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer.** n. 4, p. 11-22, 2004.

DUAN, J., WANG, X., DONG, Q., FANG, J. & LI, X. tructural features of a pectic arabinogalactan with immunological activity from the leaves of *Diospyros kaki*. **Carbohydrate Research.** n. 338, p. 1291-1297, 2003.

DUBOIS, M. M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, n. 28, p. 350-356, 1956.

ELLIS M., EGELUND J., SCHULTZ C.J. and BACIC A. Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface?. *Plant Physiology.* n. 153, p. 403-419, 2010.

ERDMANN DO NASCIMENTO, G., CORSO, C. R., WERNER, M. F., BAGGIO, C. H., IACOMINI, M. & CORDEIRO, L. M. C. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate Polymers.** n. 116, p. 300–306, 2015

ESPINOZA, C. R. **Elaboración de filtrantes de la hoja de yacón.** Centro Internacional de la Papa (CIP). Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), II imposium Latinoamericano de raíces y tubérculos. Lima, Peru, 2001.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of Uronic Acids without Interference from Neutral Sugars. **Analytical Biochemistry**, n. 197, p. 157-162, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, n. 34, p. 47–70, 1983.

FUKAI, K.; OHNO, S.; GOTO, K.; NANJO, F.; HARA, Y. Seasonal fluctuations in fructans content and related activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Sci. Plant Nutr.**, n. 43, p. 171–177, 1997.

GANE, A. M., CRAIK, D., MUNRO, S. L. A., HOWLETT, G. J., CLARKE, A. E., BACIC, A. Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana alata*. **Carbohydrate Research**, n. 277, p. 67–85, 1995.

GASPAR Y., JOHNSON K.L., MCKENNA J.A., BACIC A., and SCHULTZ C.J. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. **Plant Molecular Biology**, n. 47, p. 161–176, 2001.

GHAFFAR, A., Microbiology and Immunology On-Line Textbook, **University of South Carolina** School of Medicine, 2006.

GIBSON, G. R., & ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**. pp. 1901-1412, 1994

GOELLNER E.M., UTERMOEHLENA J., KRAMER R. and CLASSEN B. Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**, n. 86, p. 1739-1744, 2011.

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, n.142, p. 119-132, 1984.

GOTO, K.; FUKAI, K.; HIKIDA, J.; NANJO, F.; HARA, Y. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, n. 59, p. 2346–2347, 1995.

GRAU, A. & REA, J. Genetic Resources of yacon *Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl. p.198-242. In: Heller, J.; Hermman, M.; Engels, J. Andean roots and tuber genetic resources. **IPGRI - Rome**, 1997.

GRAY-SCHOPFER, V., WELLBROCK, C. & MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-7, 2007.

GREEN, E.L. Handbook of Genetically Standardized JAX Mice. (**Bar Harbor, Maine: Bar Harbor Time Publishing Company**), 1962.

GRIESHOP, C. M., FLICKINGER, E. A. & FAHEY, G. C. Oral administration of arabinogalactan affects immune status and fecal microbial populations in dogs. **Nutritional Immunology**. n. 132, p. 478-482, 2002.

GUGGISBERG, D., CUTHBERT-STEVEN, J., PICCINALI, P., BÜTIKOFER, U., & EBERHARD, P. Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and wholemilk set yoghurt as influenced by inulin addition. **International Dairy Journal**. n. 19, p.107–115, 2009.

HABIBI, Y., HEYRAUD, A., MAHROUZ, M. & VIGNON, M. R. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**. n. 339, p. 1119-1127, 2004.

HARHOLT, J., SUTTANGKAKUL, A., & SCHELLER, H. V. Biosynthesis of Pectin. **Plant Physiology**, n. 153, p. 384–395, 2010.

HORII, F., HIRAI, A. & KITAMARU, R. Solid-State ^{13}C -NMR Study of Conformations of Oligosaccharides and Cellulose Conformation of CH_2OH Group About the Exo-Cyclic C-C Bond. **Polymer Bulletin**. n. 10, p. 357-361, 1983.

INNGJERDINGEN et al., Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 101, p 204-214, 2005.

INOUE, A.; TAMOGAMI, S.; KATO, H.; NAKAZATO, Y.; AKIYAMA, M.; AKATSUKA, T.; HASHIDOKO, Y. Antifungal *melampolides* from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius*. **Phytochemistry**, n. 39, p. 845–848, 1995.

JANSSON, P-E. et al. A Practical Guide to the Methylation Analysis of Carbohydrates. **Chemical Communications** (Stockholm University), n. 8, p. 1-28, 1976.

JOHNSON, G. B.; BRUNN, G. J.; TANG, A. H.; PLATT, J. L. Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors. **Immunology**, n. 24, p. 19-24, 2003.

JOLY, A. B. Botânica : **Introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Nacional, 1998.

JOOS, L., & TAMM, M. Breakdown of pulmonary host defense in the immunocompromised host cancer chemotherapy. **Proceedings of the American Thoracic Society**. n. 2, p. 445-448, 2005.

KAKIHARA, T. S.; CÂMARA, F. L. A.; VILHENA, S. M. C.; RIERA, L. **Cultivo e industrialização de yacon (*Polymnia sonchifolia*): uma experiência brasileira**. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE RAÍZES TROPICAIS 1^{er} CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA 9, São Pedro, (resumo 148), 1996.

KARÁCSONYI, S., PÄTOPRSTÝ, V., KUBAČIKOVÁ, M. Structural study on arabinogalactan-proteins from *Picea abies* L. Karst. **Carbohydrate Research**, n. 307, p. 271-279, 1988.

- LACHMAN, J.; FERNÁNDEZ, E. C.; ORSÁK, M. Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use – a review, **Plant Soil Environ.**, n. 49, p. 283–290, 2003.
- LAPASIN, R; PRICL, S. Rheology of polysaccharide systems. In: LAPASIN, R.; PRICL, S. (eds.). **Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications**. London: Black Academic & Professional , p. 251-293, 1995.
- LEUNG, M. Y. K., LIU, C., KOON, J. C. M. B. & FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**. n. 105, p. 101–114, 2006.
- LIANG, F., HU, C. HE, Z. & PAN, Y. An arabinogalactan from flowers of *Chrysanthemum morifolium*: structural and bioactivity studies. **Carbohydrate Research**. n. 387, p. 37–41, 2014.
- LITMAN, G. W., CANNON, J. P. & DISHAW, L. J., Reconstructing immune phylogeny: New perspectives. **Nature Reviews Immunology**. n. 5, p. 866-879, 2005.
- LIVINGSTONE, D. P. III, CHATTERTON, N. J., HARRISON, P. A. Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). **New Phytol**, n. 123, p. 725–734, 1993.
- LOPES, L., GODOY, L. M. F., de OLIVEIRA C. C., GABARDO, J., SCHADECK R. J. G. and BUCHI D. F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, n. 37, p. 277–287, 2006
- MACFARLANE, S. & MACFARLANE, G. T. Composition and Metabolic Activities of Bacterial Biofilms Colonizing Food Residues in the Human Gut. **Applied and environmental microbiology**. n. 72, p. 6204–6211, 2006.
- MAHENDRAN, T., WILLIAMS, P. A., PHILLIPS, G. O. & BALDWIN, T. C. New Insights into the Structural Characteristics of the Arabinogalactan-Protein (AGP) Fraction of Gum Arabic. **J. Agric. Food Chem.** n. 56, p. 9269–9276, 2008.
- MALKIN, Y. A. **Rheology Fundamentals**. Toronto: ChemTec, 1994.
- MARTIN, S. **Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: Estrutura e Propriedades**. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- MATULOVÁ, M., CAPEK, P., KANEKO, S., NAVARINI, L. & LIVERANI, F. S. Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of *Coffea arabica* instant coffee powder. **Carbohydrate Research**. n. 346, p. 1029-1036, 2011.
- MATZINGER, P., The danger model: A renewed sense of self. **Science**. n. 296, p. 301-305, 2002.

- MAURER J.B.B., BACIC A., PEREIRA-NETTO A.B., DONATTI L., ZAWADZKI-BAGGIO S.F. and PETTOLINO F.A. Arabinogalactan-proteins from cell suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, n. 71, p. 1400-1409, 2010.
- MILLER, A. J., MIHM, M. C., JR. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.
- MILLER, J. F. A. P., Self-nonsel self discrimination and tolerance in T and B lymphocytes. **Immunologic Research**, n. 12, p. 115-130, 1993.
- MIURA, N., OHNO, N., ADACHI, Y. & YADOMAE, T. Characterization of sodium hypochlorite degradation of β -glucan in relation to its metabolism *in vivo*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 44, n. 11, 2137-2141, 1996.
- MONTIEL, V. N. **El cultivo de yacon**. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Lima, Peru. Boletín técnico n. 35, p. 19, 1996.
- MORELLE, W., GUYEÂTANT, R. & STRECKER, G. Structural analysis of oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Rana dalmatina*. **Carbohydrate Research**. n. 306, p. 435-443, 1998.
- MORETÃO, M. P., ZAMPRONIO, A. R., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. & OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, Amsterdam. n. 93, p. 189-197, 2004.
- MORETÃO, M. P., BUCHI, D. F., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. & OLIVEIRA, M. B. M. Effect of acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, Amsterdam, n. 89, p. 175-185, 2003.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Lost crops of the incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation**. Washington: Academy Press, p. 415, 1989.
- NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: Anti-ulcer-, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 96, p. 255–269, 2005.
- NETEA, M. G., BROWN, G. D., KULLBERG, B. J. & GOW, N. A. R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Microbiology**. n. 6, p. 67-78, 2008.
- NIETO, C. C. Agronomical and bromatological studies on yacon (*Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl.). Inst. Nac. Invest. Agropec., Quito-Ecuador. **Arch. Latinoam. Nutr.** (In Spanish), n. 41, p. 213–221, 1991.

NYMAN, M. Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**. n, 87, S163-S168, 2002.

OHNO, N., UCHIYAMA, M., TSUZUKI, A., TOKUNAKA, K., MIURA, N. N., ADACHI, Y., AIZAWA, M. W., TAMURA, H., TANAKA, S. & YADOMAE, T. Solubilization of yeast cell-wall β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction. **Carbohydrate Research**. n. 316, p. 161–172, 1999.

OHYAMA, T.; ITO, O.; YASUYOSHI, S.; IKARASHI, T.; MINAMISAWA, K.; KUBOTA, M.; TSUKINASHI, T.; ASAMI, T. Composition of storage carbohydrate in tuber roots of yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Sci. Plant. Nutr.**, n. 36, p. 167–171, 1990.

OOSTERVELD, A., VORAGEN, A. G. J. & SCHOLS, H. A. characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. **Carbohydrate Polymers**. n. 49, p. 409-413, 2002.

PASSOS L.M.L. and PARK Y.K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural, Santa Maria**. nv.33, n.2, p. 385-390, 2003.

PAULSEN B. S., Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. **Phytochemistry Reviews**. n. 1, p. 379-387, 2002.

PAWLACZYK I. et al., An acidic glycoconjugate from *Lythrum salicaria* L. with controversial effects on haemostasis. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 131, p. 63-69, 2010.

PELLERIN, P., VIDAL, S., WILLIAMS, P., BRILLOUET J. M. Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. **Carbohydrate Research**. N. 277, p. 135-143, 1995.

PETTOLINO F., LIAO M.L., YING Z., MAU S.L., BACIC A. Structure, function and cloning of arabinogalactan-proteins (AGPs): an overview. **Food and Food Ingredients Journal of Japan**. p. 211: 12–25, 2006.

QI, W., FONG, C., ANDLAMPORT, D.T. A. Gumarabicglycoprotein is a twisted hairy rope: a new model based on O-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. **Plant Physiol**. n. 96, p. 848–855, 1991.

QIANG X., YONGLIE C. and QIANBING W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**. n. 77 p. 435-441, 2009.

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; TSUHIDA, T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydr. Polymers**, England, n. 50, p. 79-83, 2002.

RAO, M. A. **Rheology of fluid and semisolid foods: principles and application**. Maryland: Aspen, 1999.

- REID J. S. G. Carbohydrate Metabolism; Structural Carbohydrates. **Plant Biochemistry**, p. 205-236, 1997.
- REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem. Pharmacol.**, New York, n. 55, p. 803-810, 1998.
- RIDLEY, B. L., O'NEILL, M. A., MOHNEN D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, n. 57, p. 929-967, 2001.
- ROSÁRIO, M. M. T., NOLETO, G. R., BENTO, J.F., REICHER, F., OLIVEIRA, M. B. M. & PETKOWICZ, C. L. O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, New York. n. 69, p. 464-472, 2008.
- ROY, B. and RAI, U. Genomic and non-genomic effect of cortisol on phagocytosis in freshwater teleost *Channa punctatus*: an in vitro study. **Steroids** n.74, p. 449-455, 2009.
- SAEMAN, J. F. *et al.*, Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tappi Journal**, n. 37, p. 336-343, 1954.
- SAMPEDRO, M. C., ARTOLA, R. L., MURATURE, M., MURATURE, D., DITAMO, Y., ROTH, G. A., *et al.* Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell line activation and proliferation. **International Immunopharmacology**, n. 4, p. 411-418, 2004.
- SANTANA-FILHO, A. P., NOLETO, G. R., GORIN, P. A. J., SOUZA, L. M., IACOMINI M., & SASSAKI, G. L. GC-MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters. **Carbohydr Polym** n. 87, p. 2730-2734, 2012.
- SASSAKI G.L., GORIN P.A.J., SOUZA L.M., CZELUSNIAK P.A. & IACOMINI M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, n. 340, p. 731-739, 2005a.
- SASSAKI, G. L., IACOMINI, M., & GORIN, P. A. J. Methylation-GC-MS analysis of arabinofuranose- and galactofuranose-containing structures: Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 77, p. 223-234, 2005b.
- SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. (Eds.). **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Boca Raton, USA: CRC Press, p. 255-276, 2008a.
- SASSAKI, G. L., SOUZA, L. M., SERRATO, R. V., CIPRIANI, T. R., GORIN, P. A. J., & IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, 1208(1-2), 215-222, 2008b.

SASSAKI, G. L., GUERRINI, R., SERRATO, R. V., SANTANA FILHO, A. P., CARLOTTO, J., SIMAS-TOSIN, F., CIPRIANI, T. R., IACOMINI, M., TORRI, G. & GORIN P. A. J. Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. **Carbohydrate Polymers**. n. 104, p. 34– 41, 2014.

SCHEPETKIN, I. A., FAULKNER, C. L., NELSON-OVERTON, L. K., WILLEY, J. A., & QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **International Immunopharmacology**, n. 5, p. 1783–1799, 2005.

SCHEPETKINS, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, n. 6, p. 317-333, 2006.

SCHMIDT. **Clinics in dermatology**, School of Pharmacy, thesys (PhD in Pharmacy), University of Wales Institute of Science and Technology, v. 4, n. 2, Wales, 1986.

SCHRAMM G. A Practical Approach to Rheology and Rheometry. **Gebrueder HAAKE GmbH**, D-76227 Karlsruhe, Dieselstrasse 4 Federal Republic of Germany, 1998.

SEIFER G., and ROBERTS K. The Biology of Arabinogalactan Proteins. **Annual Review of Plant Biology**, n. 58, p. 137–161, 2007a.

SEIFERT, S. & WATZL, B. Inulin and Oligofructose: Review of Experimental Data on Immune Modulation. **The Journal of Nutrition**. p. 2563S-2567S, 2007b.

SEMINARIO, J.(ed.). **Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación**. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú, p. 376, 2004.

SEMINARIO, J., VALDERRAMA, M. & MANRIQUE, I. **El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio**. Centro internacional de la papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), Lima, Perú, p. 60, 2003.

SERPE M.D. and NOTHNAGEL E.. Arabinogalactan-proteins in the multiple domains of the plant cell surface. **Advances in Botanical Research**, n. 30 p. 207–289, 1999.

SHAKHMATOV, E. G., TOUKACH, P. V., KUZNETSOV, S. P. & MAKAROVA, E. N. Structural characteristics of water-soluble polysaccharides from *Heracleum sosnowskyi* Manden. **Carbohydrate Polymers**. n. 102, p. 521– 528, 2014.

SHEPHERD, V. L.; LEE, Y. C.; SCLESINGER, P. H.; STAHL, P. D. L-Fucose-terminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptor on macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 78, p. 1019-1022, 1981.

SHIOMI, N. Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in liliaceous plants. **J Plant Physiol**, n. 134, p. 151–155, 1989.

SHIRATSUCHI, H. & BASSON, M. D., Extracellular pressure stimulates macrophage phagocytosis by inhibiting a pathway involving FAK and ERK. **Am. J. Physiol -Cell Ph.** n. 286, p. C1358-C1366, 2004.

SHOWALTER, A. M., Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.** n. 58, p. 1399–1417, 2001.

SILVEIRA, M. L. L., SMIDERLE, F. R., AGOSTINI, F., PEREIRA, E. M., BONATTI-CHAVES, M., WISBECK, E., RUTHES, A. C., SASSAKI, G. L., CIPRIANI, T. R., FURLAN, S. A. & IACOMINI, M. Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: Its chemical structure and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. n. 75, pp. 90-96, 2015.

SILVEIRA, M. L. L., SMIDERLE, F. R., MORAES, C. P., BORATO, D. G., BAGGIO, C. H., RUTHES, A. C., WISBECK, E., SASSAKI, G. L., CIPRIANI, T. R., FURLAN, S. A. & IACOMINI, M. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear -d-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**. n. 113, p. 588–596, 2014.

SIMAS-TOSIN, F. F., BARRAZA, R. R., MARIA-FERREIRA, D., DE P. WERNER, M. F., BAGGIO, C. H., WAGNER, R., SMIDERLE, F. R., CARBONERO, E. R., SASSAKI, G. L., IACOMINI, M. & GORIN, P. A. J. Glucuronoarabinoxylan from coconut palm gum exudate: Chemical structure and gastroprotective effect. **Carbohydrate Polymers**. n. 107, p. 65–71, 2014.

SIMAS-TOSIN, F. F., ABUD, A. P. R., DE OLIVEIRA, C. C., GORIN, P. A. J., SASSAKI, G. L., BUCCHI, D. F. & IACOMINI, M. Polysaccharides from peach pulp: Structure and effects on mouse peritoneal macrophages. **Food Chemistry**. n. 134, p. 2257-2260, 2012.

SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, n. 6, p. 20-24, 1972.

SMITH, C. J. Carbohydrate chemistry. In: LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C. **Plant biochemistry and molecular biology**. England: John Wiley & Sons, p. 106-108, 1993.

SMITH L. M. Evaluation of an *In Vitro* Cytotoxicity Assay for Specific Groups of Chemicals. Thesis of PhD of University of Nottingham, 1991.

STEFFE, J.F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, 2nd Ed. Freeman Press, East Lansing, Michigan State, USA, p. 418, 1996.

STEINHORN G., SIMS I.M., CARNACHAN S.M., CARR A.J. and SCHLOTHAUER R. Isolation and characterisation of arabinogalactan-proteins from New Zealand kanuka honey. **Food Chemistry**, n. 128, p. 949-956, 2011.

TAN, L., SHOWALTER, A. M., EGELUND, J., HERNANDEZ-SANCHEZ, A., DOBLIN, A. & BACIC, A. Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. **Frontiers in plant science**. n. 3, p. 1–10, 2012.

TANAKA et al., An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, n. 82, p. 714–721, 2010.

TAPER, H. & ROBERFROID, M. Possible adjuvant cancer therapy by two prebiotics inulin or oligofructose. **In vivo**. n. 19, p. 201-104, 2005.

TARHINI, A. A. & AGARWALA, S. S. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. **Dermatol Ther**, v. 19, n. 1, p. 19-25, 2006.

TÁRREGA, A., ROCAFULL, A., & COSTELL, E. Effect of blends of short and long-chain inulin on the rheological and sensory properties of prebiotic low-fat custards. **LWT-Food Science and Technology**. n. 43, p. 556–562, 2010.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**, n. 23, p. 901–44, 2005.

THUDE S. & CLASSEN B. High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: An arabinogalactan-protein and an arabinan. **Phytochemistry**, n. 66, p. 1026-1032, 2005.

TISCHER C.A., IACOMINI M. and GORIN P.A.J. Structure of the arabinogalactan from gum tragacanth (*Astragalus gummifer*). **Carbohydrate Research**. n. 337, p. 1647-1655, 2002

TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGUCHI, Y., Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **International Journal of Cancer** . n. 26, p. 171-176, 1980.

VALENTOVÁ, K.; ERSEN, F.; ULRICHOVA, J. Radical scavenging and anti-lipoperoxidative activities of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 53, p. 5577-5582, 2005.

VALENTOVÁ, K., MONCION, A., WAZIERS, I., ULRICHOVA J. The effect of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts on rat hepatic metabolism. **Cell biology and toxicology**. n. 20, p. 109-120, 2004.

VARIN, A.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. **Immunobiology**, n. 214, p. 630–641, 2009.

VEGA, M. A., CORBÍ, A. L. Human macrophage activation: Too many functions and phenotypes for a single cell type. **Inmunologia**. n., 25, p. 248-272, 2006.

VEREYKEN, I. J., VAN KUIK, J. A., EVERS, T. H., RIJKEN, P. J., & DE KRUIJFF, B. Structural Requirements of the Fructan-Lipid Interaction. **Biophysical Journal**. n. 84 p. 3147–3154, 2003.

VIJN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiol** n. 9, p. 120:351, 1999.

VILHENA, S.M.C.; CÂMARA, F.L.A.; KAKIHARA, S.T. O cultivo de yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 5-8, 2000.

VORAGEN A.G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**. n. 9, p. 328-335, 1998.

WACK M. and BLASCHEK W. Determination of the structure and degree of polymerisation of fructans from *Echinacea purpurea* roots. **Carbohydrate Research**, n. 341 p. 1147-1153, 2006.

WAGNER, H. & JORDAN, E. An immunologically active arabinogalactan from *Viscum album* 'berries'. **Phytochemistry**, n. 27, p. 2511–2517, 1988.

WHISTLER, R. L. **The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry**. London: Academic Press., p. 447-458, 1970.

WILLS R.B.H., BONE K., & MORGAN M. Herbal products active constituents, modes of action and quality control. **Nutrition research reviews**. n. 13, p. 47-77, 2000.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, n. 2, p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.** n.2, p. 211, 1963b.

YAMADA, H., KOMIYAMA, K., KIYOHARA, H., CYONG, J. C., HIRAKAWA, Y. & OTSUKA, Y. Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from roots of *Angelica acutiloba*. **Planta Medica**, Stuttgart. n. 56, p. 182-186, 1990.

YAN, X.J.; SUZUKI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; SADA, Y.; NAKANISHI, T.; NAGATA, T. Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **J. Agric. Food Chem.**, n. 47, p. 4711–4713, 1999.

YANG, X., XIA, T., YU, W., XIANG, P. & HE, F. Mouse melanoma cell line B16F10-derived conditioned medium inhibits sodium L-ascorbate-induced B16F10 cell apoptosis. **J. South Med. Univ.** v. 32, n. 2, p. 146-150, 2012.

YARIV, J., RAPPORT, M. M., GRAF, L. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. **Biochem. J.** n. 85, p. 383–388, 1962.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on “yacon”, *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). **Econ. Bot.**, n. 45, p. 72–85, 1991.

ZHONG, Q. & DAUBERT, C. R. Food Rheology. Handbook of Farm, Dairy, and Food Machinery. **Myer Kutz (ed.)**. 391–414, 2007.