

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA SOLDERA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE *Physalis peruviana* L.**

CURITIBA

2014

ANDRESSA SOLDERA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE POLISSACARÍDEOS DE *Physalis peruviana* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Bello Baron Maurer

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Selma Faria Zawadzki Baggio

CURITIBA

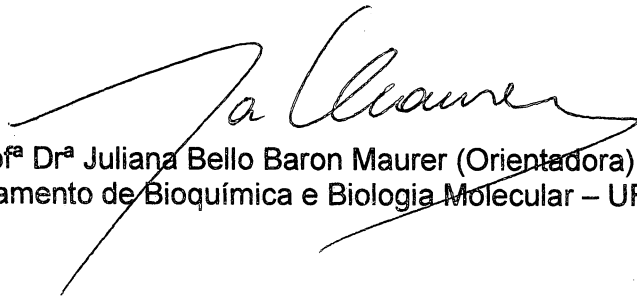
2014

TERMO DE APROVAÇÃO

ANDRESSA SOLDERADA SILVA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE *Physalis peruviana* L.

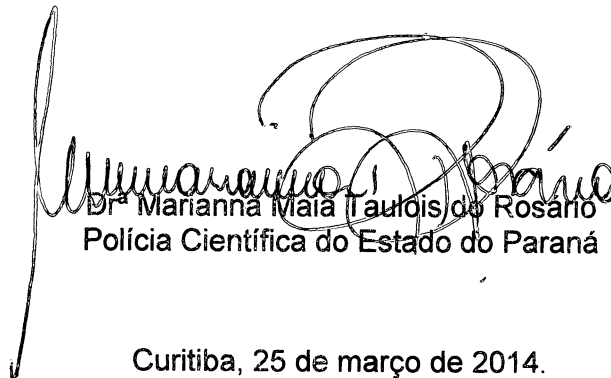
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profª Drª Juliana Bello Baron Maurer (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profª Drª Lucimara Mach Cordeiro
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Drª Marianna Maia Taulois do Rosario
Polícia Científica do Estado do Paraná

Curitiba, 25 de março de 2014.

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida,
a família, por tornar a vida mais fácil
e aos amigos, por torna-la mais divertida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar a oportunidade de enfrentar os desafios que a vida nos apresenta. Agradeço pela sabedoria e discernimento para compreender que nem sempre aquilo que é bom aos nossos olhos é o certo para a nossa vida.

Agradeço à minha mãe, Edite, por enfrentar tudo e todos para me conceber, me amar e me ensinar tudo o que sei hoje. Ao meu pai, Ademir, que apesar de tudo, me criou e possibilitou que a minha educação fosse a melhor possível. Ao meu irmão, Rodrigo, com quem eu aprendi e ensinei a dividir.

Agradeço ao meu novo pai, Pacheco, pela paz que a sua presença trouxe a minha vida, pela paciência, pelo amor, pela confiança, pela confidencialidade, pela amizade sem igual, pela simples e pura relação que todo pai tem com uma filha. Agradeço pela sua coragem, seu esforço e sua simplicidade que eu tomei como exemplo de vida. Agradeço à minha “boadrasta”, Iracema, pelo carinho e por me considerar a terceira filha... Agradeço à minha irmã, Francine, por ser àquela que eu sempre sonhei em ter! Por ser minha companheira, amiga, cúmplice, alma gêmea, e tantas outras coisas. Obrigada por me dar o prazer de ser a madrinha da menina mais linda do universo, a qual eu também agradeço pelo simples fato de existir, de tornar minhas manhãs de terça e quarta e noites de quinta mais agradáveis e revigorantes, e por me chamar de “Madi” com tamanha inoscência. Agradeço ao meu irmão, Pedro, por me fazer companhia nas tardes intermináveis de escrita da dissertação, por gostar das minhas panquecas improvisadas e pelo carinho de sempre.

Essa dissertação não teria sido possível se, ainda no primeiro ano de faculdade, uma professora maravilhosa não tivesse despertado o meu interesse pelo mundo fantástico e, nem sempre compreendido, da bioquímica. Fabíola, uma parte disto é dedicado à você, não há razão, forma ou circunstância na qual eu não agradeça à você pela amizade, pelo carinho, por me acompanhar durante toda a minha vida acadêmica e por compartilhar a paixão pela bioquímica. Agradeço também, sem sombra de dúvidas, às

minhas amadas orientadoras, Juliana e Selma, por serem verdadeiras mães que nos carregam no colo nas dificuldades, que têm paciência nos momentos de desespero pré-seminário de tese e para responder todas as perguntas. Por solucionarem os problemas que, aos meus olhos, não tinham solução, por serem alegres apesar das dificuldades, por serem esforçadas, inteligentes e por proporcionarem que os dois anos de mestrado fossem bem vividos e bem aproveitados.

Agradeço aos meus companheiros *“together”* de laboratório pelas risadas, pelos fumos passivos, pela confiança, pelas queimaduras com ácido e pelas vidrarias lavadas. Obrigada Mel, por ser a minha companheira de experimentos e pela cumplicidade! Obrigada Japa, por ajudar a resolver os problemas com a matemática. Obrigada “Tio Lú” por me orientar, por me ensinar tudo que eu sei e, mais importante que isso, por me ensinar a me virar sozinha. Agradeço aos colegas de mestrado, pelos trabalhos e momentos de estudo nas disciplinas e pela diversão nos intervalos! Sem vocês não teria sido tão especial.

Agradeço aos amigos que acompanharam a minha trajetória até aqui. Mari e Babi, obrigada pelos momentos de descontração! Amo vocês! Agradeço também ao anjo que Deus colocou na minha vida e que eu chamo de namorado. Obrigada, meu amor, por ter tido paciência e compreensão nos momentos de estresse nesses últimos meses!

Agradeço ao Sr. Herculano S. Reis Filho do Laboratório de Histotecnologia, Departamento de Biologia Celular, por ceder os reagentes necessários para a elaboração das lâminas para as análises de morfologia celular.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Bioquímica pelo apoio e incentivo e à todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao CNPq, PRONEX-Carboidratos e UGF/SETI/Gov.PR pelo apoio financeiro.

Enfim, á todos os que, de alguma maneira, tornaram o meu sonho de ser mestre possível, o meu mais puro e sincero: muito obrigada.

“O saber é como um jardim: se não for cultivado não pode ser colhido.”

Provérbio Africano

~ v ~

RESUMO

Physalis peruviana (Família Solanaceae) é uma planta medicinal frutífera, originária dos Andes e é produzida em diversos países, incluindo o Brasil. Seus frutos são amplamente utilizados na culinária. Além disso, esta planta apresenta propriedades medicinais, as quais estão relacionadas com a presença de compostos do metabolismo secundário, como fenólicos e terpenos. Em relação a compostos do metabolismo primário, como polissacarídeos e glicoconjugados (arabinogalactana-proteínas, AGPs), presentes nos frutos desta espécie, poucas informações estão descritas na literatura, tanto em relação às suas características químicas como propriedades biológicas. O presente trabalho teve como objetivo geral: obter, caracterizar e investigar as propriedades imunomoduladora e antioxidante - *in vitro* de frações polissacarídicas presentes em frutos de *Physalis peruviana*. Os frutos inteiros de *P. peruviana* foram submetidos a dois métodos de extração. O primeiro método, denominado de “A”, consistiu no tratamento com metanol : água para a inativação das enzimas e posterior secagem. O segundo método, denominado de “A (2)”, a inativação enzimática não foi realizada, sendo o material submetido diretamente à secagem. Depois da remoção de lipídeos e pigmentos, o material foi submetido a extrações sequenciais: aquosa à temperatura ambiente [Frações 1A, 2A, 1A(2), e 2A(2)] e a 60 °C [Frações 3A, e 3A(2)], com ácido cítrico 0,1% (m/v) a 60 °C [Frações 4A e 4A(2)] e em banho fervente [Frações 5A e 5A(2)], com ácido cítrico % (m/v) a 60 °C [Frações 6A(2)] e em banho fervente [Fração 7A(2)], com ácido cítrico 2,5% (m/v) a 60 °C [Fração 8A(2)] e em banho fervente [Fração 9A(2)], com ácido cítrico 5% (m/v) a 60 °C [Fração 10A(2)] e em banho fervente [Fração 11A(2)], com hidróxido de sódio (NaOH) a 2 M [Fração 12A(2)], e (h) com hidróxido de sódio (NaOH) a 4 M [Fração 13A(2)]. As frações obtidas foram submetidas a diferentes análises colorimétricas, cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas. De acordo com os resultados obtidos, o procedimento de inativação enzimática influenciou o conteúdo de AGPs e na presença de carboxilas esterificadas. Os resultados obtidos mostraram que as frações obtidas nas extrações aquosas e com ácido cítrico apresentam características de polissacarídeos pécticos, apresentando como principais monossacarídeos, ácido urônico, Gal e Ara. As frações obtidas nas extrações alcalinas apresentam características de polissacarídeos do tipo hemicelulose. A análise de RMN da fração 1A sugere a presença de assinalamentos característicos para polissacarídeo do tipo ramnohomogalaturonana esterificada. A atividade biológica da fração 1A foi avaliada *in vitro* através do efeito exercido sobre cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. Esta fração não apresentou citotoxicidade no teste do MTT e nem influenciou na produção de NO em nenhuma das condições testadas. Porém provocou ativação de macrófagos, verificado pela avaliação morfológica e também em relação à produção de IL6 e IL10. A atividade antioxidante das frações testadas [1A, 3A, 5A, 1A (2), 3A (2), 5A (2), 7A (2), 9A (2), 11A (2) e 12A (2)] foi baixa, quando comparada com padrões comerciais, para os métodos testados independente do tipo de polissacarídeo presente nas frações. O melhor resultado foi obtido no teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), onde a média de atividade foi de 35%. Nas condições testadas, as propriedades imunomoduladoras e antioxidantes das frações polissacarídicas dos frutos parecem não ter uma influência significativa nas propriedades terapêuticas desta espécie.

Palavras chave: *Physalis peruviana*, pectina, atividade antioxidante, atividade imunomoduladora.

ABSTRACT

Physalis peruviana (Family Solanaceae) is a medicinal plant, native to the Andes and is produced in several countries, including Brazil. Its fruits are widely used in cooking. In addition, this plant has medicinal properties, which are related to the presence of secondary metabolism compounds such as terpenes and phenolic. In respect of primary metabolism compounds such as polysaccharides and glycoconjugates (arabinogalactan-protein, AGPs), present in fruits of this species, few information are described in the literature, both in relation to their chemical characteristics as to the biological properties. The aim of the present work is obtain, characterize and investigate the *in vitro* immunomodulatory and antioxidant properties of the polysaccharide fractions present in fruit of *Physalis peruviana*. The fruits of *P. peruviana* were submitted to two extraction methods. The first method, called "A", consisted in the treatment with methanol: water for the inactivation of enzymes. The second method, called "the A(2)", the enzymatic inactivation was not performed, being the material submitted directly to drying. After removal of lipids and pigments, the material was subjected to sequential extractions: aqueous at room temperature [Fractions 1A, 2A, 1A (2), and 2A (2)] and the 60° C [Fractions 3A, and 3A (2)], with citric acid 0.1% (w/v) at 60° C [Fractions 4A and 4A (2)] and in boiling water [Fractions 5A and 5A (2)], with citric acid 1% (m/v) 60° C [Fractions 6A (2)] and in boiling water [Fraction 7A (2)], with citric acid 2.5% (m/v) 60° C [8A Fraction (2)] and in boiling water [Fraction 9A (2)]citric acid with 5% (m/v) 60° C [Fraction 10A (2)] and in boiling water [Fraction 11A (2)], with sodium hydroxide (NaOH) to 2 M [Fraction 12A (2)], and (h) with sodium hydroxide (NaOH) to 4 M [Fraction 13A (2)]. The fractions obtained were subjected to different colorimetric, chromatographic, spectroscopic and spectrophotometric analyses. According to the results, the enzymatic inactivation procedure influenced the contents of AGPs and in the presence of the esterified carboxyl. The results showed that the fractions obtained in aqueous and with citric acid extractions presented characteristics of pectin-type polysaccharides. These fractions were composed mainly by uronic acid, Gal and Ara. The fractions obtained in the alkaline extraction presented characteristics of hemicellulose-type polysaccharides. NMR analysis of fraction 1A suggests the presence of signals characteristics to rhamno-homogalacturonan-type polysaccharide. The *in vitro* biological activity of the fraction 1A was evaluated by using the culture of murine peritoneal macrophages. This fraction showed no cytotoxicity in MTT test nor influenced in NO producing at conditions tested. However, the fraction 1A caused activation of macrophages, verified by morphological evaluation and also for the production of IL6 and IL10. The antioxidant activity of the fractions tested [1A, 3A, 5A, 1A (2), 3A (2), 5A (2), 7A (2), 9A (2), 11A (2) and 12A (2)] was low, when compared with commercial standards, for the methods tested regardless of the type of polysaccharide present in fractions. The best result was obtained in the test of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), where the average activity was of 35%. At conditions tested, the antioxidant and immunomodulatory properties of polysaccharide fractions of the fruits do not seem to have a significant influence on the therapeutic properties of this species.

Key-words : *Physalis peruviana*, pectin, antioxidant, immunomodulatory.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES TIPOS DE PECTINAS .	8
FIGURA 2 - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS ACEA, APIOSE, KDO E DHA ENCONTRADOS NAS RG-II.	10
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO REAGENTE DE YARIV.	13
FIGURA 4 - <i>Physalis peruviana</i> EM DETALHES. A – DETALHES DA FLOR; B E D- DETALHES DOS FRUTOS; C – DETALHE DAS FOLHAS; E E F – DETALHE DA PLANTA.....	18
FIGURA 5 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO <i>BURST</i> RESPIRATÓRIO.	24
FIGURA 6 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FAGOCITOSE.....	26
FIGURA 7 – REDUÇÃO DO O ₂ NA MITOCÔNDRIA ATÉ A FORMAÇÃO DE H ₂ O.	33
FIGURA 8 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.	40
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DE PROCEDIMENTOS DE OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL	50
FIGURA 10 – PERFIS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMAÇÃO COM DETETOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO E ESPALAHAMENTO DE LUZ (HPSEC-RI-MALLS) DAS FRAÇÕES AQUOSAS DE <i>Physalis peruviana</i> OBTADAS PELOS DOIS MÉTODOS.....	63
FIGURA 11 – PERFIS CROMATOGRÁFICOS E ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES CÍTRICAS DE <i>Physalis peruviana</i> OBTIDAS PELOS DOIS MÉTODOS.	64
FIGURA 12 – PERFIS CROMATOGRÁFICOS E ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES HEMICELULÓSICAS DE <i>Physalis peruviana</i> OBTIDAS PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO A (2).	65
FIGURA 13 – PERFIL MONOSSACARÍDICO POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE FRUTOS DE <i>Physalis peruviana</i>	70
FIGURA 14 – PERFIL MONOSSACARÍDICO POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE FRUTOS DE <i>Physalis peruviana</i>	71
FIGURA 15 - DOSAGEM DE ARABINOGALACTANA-PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DE FRUTOS DE <i>Physalis peruviana</i>	72
FIGURA 16 – ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES AQUOSAS A FRIO E A QUENTE DE <i>Physalis peruviana</i> OBTIDAS PELOS DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	76
FIGURA 17 – ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES CÍTRICAS 4A E 4A (2) DE <i>Physalis peruviana</i> OBTIDAS PELOS DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	77
FIGURA 18 – ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES HEMICELULÓSICAS 12A (2) HEMI A E 12A (2) HEMI B DE <i>Physalis peruviana</i>	78
FIGURA 19 - ESPECTRO PARCIAL DE RMN ¹ H (REGIÃO 5,4 A 1 PPM) DA FRAÇÃO 1A EM D ₂ O, A 50°C.....	82

FIGURA 20 - ESPECTROS DE CORRELAÇÃO (^{13}C , ^1H) DA FRAÇÃO 1A EM D ₂ O, A 50°C..	83
FIGURA 21 - EFEITO DO TRATAMENTO DE 24h COM A FRAÇÃO 1A DE <i>Physalis peruviana</i> SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS .	86
FIGURA 22 - EFEITO DA FRAÇÃO 1A DE <i>Physalis peruviana</i> SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS DE LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS APÓS 24h E 48h DE INCUBAÇÃO.	88
FIGURA 23 – EFEITO DAS FRAÇÕES 1A DE <i>Physalis peruviana</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS	89
FIGURA 24 – EFEITO DA FRAÇÃO 1A DE <i>Physalis peruviana</i> APÓS 24 h DE TRATAMENTO SOBRE A CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE LISOSSOMOS DE CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS	92
FIGURA 25 - EFEITOS DAS AMOSTRAS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS TNF α (A), IL6 (B), IL10 (C) e IL1 β (D) POR CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL INCUBADAS POR 24 h, NA AUSÊNCIA (CONTROLE) E PRESENÇA DA FRAÇÃO DE <i>Physalis peruviana</i>	93
FIGURA 26 – PORCENTAGEM DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO PELAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DE FRUTOS DE <i>Physalis peruviana</i>	97
FIGURA 27 - ÍNDICE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE LIPÍDEOS DE GEMA DE OVO DAS FRAÇÕES DE FRUTOS DE <i>Physalis peruviana</i>	98
FIGURA 28 – PORCENTUAL DE QUELAÇÃO DE FERRO OBTIDA PELAS FRAÇÕES DE FRUTOS DE <i>Physalis peruviana</i>	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EFEITOS BIOLÓGICOS DE ARABINO GALACTANAS, ARABINO GALACTANA- PROTEÍNAS E PECTINAS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	15
TABELA 2 - TABELA COMPARATIVA DAS CITOCINAS QUE ATUAM NAS IMUNIDADES INATA E ADQUIRIDA	28
TABELA 3 – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E NITROGÊNIO (ERNS) DE INTERESSE BIOLÓGICO	32
TABELA 4 – PRINCIPAIS AGENTES ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E NÃO ENZIMÁTICOS	37
TABELA 5 – FRAÇÕES, MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E RENDIMENTOS.....	60
TABELA 6 – ANÁLISES DAS DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DOS FRUTOS DE <i>Physalis peruviana</i>	66
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DE FRUTOS DE <i>Physalis peruviana</i>	69
TABELA 8 – RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DOS FRUTOS DE <i>Physalis peruviana</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	- Oxigênio singlete
AceA	- Ácido acérico
AGP	- Arabinogalactana-proteína
Ara	- Arabinose
BHA	- Butil-hidróxi-anisol
BHT	- Butil-hidróxi-tolueno
DHA	- Ácido-3-desoxi-D-mano-octulosônico
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirubonucleico
DPPH	- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
ERN	- Espécie reativa de nitrogênio
ERO	- Espécie reativa do oxigênio
Fe^{+2}	- Íon ferroso
Fe^{+3}	- Íon férrico
FT-IR	- Espectrometria de infravermelho acoplado a transformador Fourier
Fuc	- Fucose
Gal	- Galactose
GalA	- Ácido Galacturônico
Glc	- Glucose
GPA	- Glucose penta acetato
GSH	- Glutathione
GSH-Px	- Glutathione peroxidase
GSH-Rd	- Glutathione reductase
H_2O_2	- Peróxido de hidrogênio
HClO	- Ácido hipocloroso
HG	- Homogalacturonana
HNO_2	- Ácido nitroso

HO [•]	- Radical hidroxila
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão
HRGP	- Glicoproteínas ricas em hidroxiprolina
IFN γ	- Interferon gama
IL1 β	- Interleucina tipo 1 beta
IL2	- Interleucina tipo 2
IL4	- Interleucina tipo 4
IL5	- Interleucina tipo 5
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
IR/RI	- Índice de refração
KDO	- Ácido-3-desoxi-D-mano-octolosônico
L [•]	- Radical lipídico
LH	- Ácido graxo polinsaturado
LO [•]	- Radical alcoxila
LOO [•]	- Radical peroxila
LOOH	- Hidroperóxido lipídico
LPS	- Lipopolissacarídeo bacteriano
MALLS/LS	- Espalhamento de luz
Man	- Manose
MDA	- Malondialdeído
MTT	- Brometo de 3-metil[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NK	- Natural killer
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
NO [•]	- Óxido nítrico
NO ₃ ⁻	- Nitrato
NO ₃ ⁻	- Nitrito
NOS	- Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	- Superóxido
O ₃	- Ozônio
ONNO	- Peroxinitrito
ONNOH	- Ácido peroxinitroso
RG-I	- Ramnogalacturonana tipo 1

RG-II	- Ramnogalacturonana tipo 2
Rha	- Ramnose
RMN	- Ressonância nuclear magnética
RNA	- Ácido ribonucleico
ROO ⁻	- Radical peroxila
SOD	- Superóxido dismutase
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TMB	- Tetrametilbenzidina
TNF α	- Fator de necrose tumoral alfa
XGA	- Xilogalacturonana
Xyl	- Xilose

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	3
1.2 Objetivo Geral	4
1.3 Objetivos Específicos	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Plantas medicinais e seus usos na medicina tradicional	5
2.2 Compostos vegetais ativos.....	6
2.2.1 Pectinas.....	7
2.2.2 Arabinogalactana-proteínas (AGPs).....	12
2.2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA de polissacarídeos VEGETAIS	16
2.3 <i>Physalis peruviana</i> L.	17
2.4 Sistema Imunológico	21
2.4.1 Macrófagos.....	22
2.4.1.1 Fagocitose	25
2.4.1.2 Citocinas.....	27
2.5 Estresse Oxidativo	30
2.5.1 Radicais Livres	31
2.5.2 Lipoperoxidação	35
2.5.3 Defesa antioxidante.....	36
3MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Material vegetal e procedência.....	39
3.2 Métodos para a obtenção das frações	39
3.3 Dosagens colorimétricas	41
3.3.1 Carboidratos Totais	41
3.3.2 Ácidos Urônicos	41
3.3.3 Proteínas Totais	42
3.3.4 Fenóis Totais.....	43
3.3.5 Dosagem de grupos acetil.....	43
3.4 Dosagem de arabinogalactana-proteínas (AGP).....	44

3.5	Análises cromatográficas	45
3.5.1	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) ..	45
3.5.2	Cromatografia em camada delgada (CCD)	46
3.5.3	Análise por cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC) acoplada a detectores de índice de refração (IR) e espalhamento de luz (MALLS)	46
3.6	Análises espectroscópicas e espectrométricas	47
3.6.1	Espectrometria de Infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR)	47
3.6.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ^1H e HSQC	48
3.7	Atividades Biológicas	48
3.7.1	Ensaio imunomoduladores “ <i>in vitro</i> ” utilizando cultura de macrófagos peritoneais.....	48
3.7.1.1	Preparo dos materiais e soluções.....	48
3.7.1.2	Obtenção dos macrófagos peritoneais	49
3.7.1.3	Determinação da viabilidade pelo método do Azul de Tripán	51
3.7.1.4	Determinação da viabilidade pelo método do MTT	51
3.7.1.5	Produção de óxido nítrico	52
3.7.1.6	Retenção de lisossomos.....	53
3.7.1.7	Dosagem de interleucinas	53
3.7.1.8	Análises morfológicas	54
3.7.2	Ensaio Antioxidantes	55
3.7.2.1	Formação do complexo fosfomolibdênico.....	55
3.7.2.2	Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – <i>Thiobarbituric Acid Reative Species</i>)	56
3.7.2.3	Quelação de ferro	56
3.7.3	Análises estatísticas	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1	Extrações e Rendimentos	59
4.2	Homogeneidade	61
4.3	Dosagens colorimétricas	66

4.4 Caracterização da estrutura química das frações polissacarídicas de frutos de <i>P. peruviana</i>	67
4.4.1 Composição monossacarídica neutra e ácida.....	67
4.4.2 Dosagens de Arabinogalactanas-Proteínas (AGP)	72
4.4.3 Espectrometria de Infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR)	73
4.4.4 Ressonância Nuclear Magnética mono- e bidimensional da fração 1A...	81
4.5 Atividades Biológicas	84
4.5.1 Avaliação da atividade imunomoduladora da fração 1A obtida de frutos de <i>Physalis peruviana</i>	84
4.5.1.1 Análises morfológicas.....	85
4.5.1.2 Determinação da viabilidade pelo Método do MTT em culturas de células do lavado peritoneal na presença da fração 1A de frutos de <i>Physalis peruviana</i>	87
4.5.1.3 Produção do Óxido Nítrico pelas culturas de células do lavado peritoneal na presença e ausência da fração 1A de frutos <i>Physalis peruviana</i>	89
4.5.1.4 Retenção de lisossomos	91
4.5.1.5 Dosagens de citocinas	92
4.5.2 Atividades Antioxidantes <i>in vitro</i>	96
5. CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas como forma terapêutica para o tratamento de doenças por diversas sociedades antigas, como por exemplo, as populações indígenas, chinesas e indianas (FOGLIO *et al.*, 2006). Nos dias de hoje, cerca de 30% dos medicamentos produzidos são de origem vegetal. No entanto, ainda há uma grande variedade de plantas conhecidas comomedicinais que são utilizadas na medicina tradicional e que não foram estudadas e podem apresentar uma atividade significativa no combate a doenças (FOGLIO *et al.*, 2006), assim como podem gerar efeitos adversos como por exemplo, alergias (JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Outro fato bastante importante é que a utilização tradicional das plantas nem sempre condiz com o seu efeito encontrado através de pesquisas científicas (FOGLIO *et al.*, 2006).

As plantas medicinais servem como fonte de matéria prima farmacêutica, gerando não só os fármacos isolados (FOGLIO *et al.*, 2006) como também produtos elaborados exclusivamente à base de vegetais bem como adjuvantes que são produtos utilizados na formulação de medicamentos (SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

Estas plantas apresentam compostos ativos responsáveis pelas atividades biológicas, tais como os compostos fenólicos, terpenos, saponinas, lectinas, peptídeos, polissacarídeos entre outras (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003). Dentre os polissacarídeos, extraídos de plantas, que apresentaram atividade biológica destaca-se as pectinas.

As pectinas correspondem a um conjunto de polissacarídeos ácidos localizados na parede celular vegetal. Sua função no vegetal é a de promover a troca de nutrientes e, em conjunto com outras moléculas, manter a flexibilidade ou rigidez da planta, além de possuir atividade de proteção contra patógenos invasores (DAAS, *et al.*, 1999).

As pectinas apresentam algumas propriedades medicinais conhecidas, como por exemplo, a atividade gastroprotetora e ação imunomoduladora, envolvendo ações anticarcinogênicas e antimetastática (OVODOV, 2009).

Outro composto ativo com propriedades medicinais presente nas plantas medicinais é a arabinogalactana-proteína (AGP). Este composto representa menos de 10% da matriz da parede celular da planta e apresenta funções diversificadas no vegetal. Dentre estas funções estão o crescimento e a diferenciação das plantas (KREUGER e HOLST, 1996; CLASSEN, *et al.*, 2006; LI, *et al.*, 2013), as interações específicas com outras moléculas, a função informacional, a capacidade de reter água, além de funcionarem de maneira análoga aos glicosaminoglicanos animais, moléculas de reconhecimento celular (FINCHER, STONE e CLARKE, 1983). Como já mencionado, as arabinogalactanas-proteínas de diversas fontes vegetais tem apresentado propriedades medicinais, tais como ativação do sistema complemento (ALBAN *et al.*, 2002; LENZI *et al.*, 2013), atividade imunomoduladora (CLASSEN, *et al.*, 2006) entre outras.

Physalis peruviana é uma planta medicinal frutífera promissora, principalmente para pequenos produtores, devido ao seu baixo custo de implantação, bom retorno econômico em curto prazo, boa adaptação às condições ambientais, possibilidade de cultivo no sistema orgânico e demanda maior do que a oferta (MUNIZ, 2011). A planta é originária dos Andes e produzida em diversos países, entre eles o Brasil. Seus frutos são amplamente utilizados na culinária no preparo de doces, bolos, tortas e saladas evidenciando seu alto poder econômico (RAMADAN e MOERSEL, 2007). Esta planta, incluindo todos os seus órgãos como os frutos, as folhas e raízes, apresenta diversas propriedades medicinais, tais como: atividades antiasmática, diurética e antisséptica, usada para fortificar o nervo óptico, no tratamento de infecções de garganta e na eliminação de parasitas intestinais (RAMADAN e MOERSEL, 2007), antiespasmódico, sedativo, analgésico e antidiabético (PUENTE *et al.*, 2011).

Com relação aos compostos presentes nesta planta, os compostos fenólicos e terpenos, derivados do metabolismo secundário, são responsáveis por parte de suas propriedades medicinais. Estes compostos, além de conferirem a planta a sua propriedade antioxidante, são responsáveis pelo aroma, cor e sabor do fruto (SEVERO, 2012). Outro composto importante encontrado somente neste gênero (*Physalis*) é o pseudo-esteróide fisalina. Este composto isolado apresentou atividade antiinflamatória *in vitro* (PUENTE

et al., 2011). Os vitanólidos são lactonas esteroidais encontrados na família Solanaceae que apresentaram diversas propriedades medicinais atuando como protetora contra Insetos e microorganismos, antitumoral, hepatoprotetora e imunomoduladora (AHMAD *et al.*, 1999). Entretanto, em relação aos polissacarídeos e AGPs provenientes dos frutos desta espécie poucas informações estão descritas na literatura, tanto em relação às suas características químicas como propriedades biológicas.

1.1 JUSTIFICATIVA

As plantas medicinais são extensivamente utilizadas para o tratamento de diversas doenças. No entanto pouco se sabe sobre os compostos vegetais ativos que as compõe. Estes compostos podem agir de maneira benéfica proporcionando um tratamento para doenças de diversas magnitudes, desde as corriqueiras até as mais agressivas como, por exemplo, o câncer. Contudo, estes mesmos compostos podem agir de maneira contrária e causar toxicidade prejudicial a quem os utiliza.

Dentre os compostos ativos presentes nestas plantas, as pectinas e as AGPs são exemplos de compostos que apresentam atividade biológica. Estes compostos ativos pode atuar no sistema imunológico, modulando-o e também possuir atividades antioxidantes promovendo a captura ou neutralização de radicais livres.

Assim sendo sabe-se que polissacarídeos e AGPs podem ser extraídos de diversas plantas e possuem propriedades medicinais. Estes compostos podem ser extraídos de uma ampla quantidade de plantas medicinais ainda não exploradas que apresentam importância econômica, nutracêutica e social. Uma destas plantas é a *P. peruviana*, que possui compostos como os polissacarídeos e as AGPs na constituição de seus frutos e que ainda não foram analisados. Portanto, torna-se relevante a determinação das características químicas e as ações antioxidantes e imunomoduladoras desses compostos e a relação com as propriedades medicinais relatadas para esta espécie.

1.2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral: obter, caracterizar e investigar as propriedades imunomoduladora e antioxidante - *in vitro* de frações polissacarídicas presentes em frutos de *Physalis peruviana*.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- Obter as frações polissacarídicas através de extrações aquosas, cítricas e alcalinas em diferentes condições experimentais;
- Caracterizar a estrutura química parcial das frações escolhidas, através de métodos químicos e físicos;
- Investigar a atividade imunomoduladora *in vitro* das frações polissacarídicas utilizando como modelo experimental olavado peritoneal de camundongos Swiss;
- Verificar a atividade antioxidante *in vitro* das frações polissacarídicas pelos métodos da formação do complexo fosfomolibdênico, quelação de ferro e lipoperoxidação (TBARS);
- Verificar a influência da inativação enzimática na obtenção e caracterização dos polissacarídeos, bem como, na atividade antioxidante;
- Contribuir com o conhecimento científico sobre as propriedades biológicas dos componentes bio-ativos presentes na espécie *P.peruviana*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E SEUS USOS NA MEDICINA TRADICIONAL

As plantas medicinais compreendem um vasto grupo de aproximadamente 8000 espécies conhecidas (SATI *et al.*, 2010). São consideradas plantas medicinais aquelas que exercem ação farmacológica independente da forma como é administrada, utópica ou via oral (FOGLIO *et al.*, 2006). Estas plantas vêm sendo utilizadas a milhares de anos pela medicina tradicional com o objetivo de manter a saúde, prevenir, e tratar doenças físicas e mentais (WHO, 2014). Tal conhecimento deve-se a observação e ao instinto humano e animal que possibilitou a distinção entre as plantas que poderiam servir como alimento, daquelas que serviriam como medicamento ou que seriam venenosas (KUNZ, 2006).

O uso destas plantas pela população mundial é vasto e amplamente utilizado como uma terapia complementar a medicina convencional (MARCHESE *et al.*, 2009). Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, a utilização das plantas é, muitas vezes, a única fonte de tratamento de doenças devido ao baixo custo, a larga distribuição e o fácil acesso (FACHINETO e TEDESCO, 2009). Até o século XX, as plantas medicinais constituíam boa parte do tratamento, sendo sua utilização diminuída no final do século XIX, quando o desenvolvimento de medicamentos tornou-se acelerado. No entanto, ainda hoje, cerca de 30% dos medicamentos prescritos são de origem vegetal e destes, a maioria dos estudos que comprovam as atividades destas plantas, são de origem chinesa, coreana e japonesa (FOGLIO *et al.*, 2006).

As plantas medicinais podem ser classificadas de acordo com a forma como são empregadas na terapia, começando pelas plantas que são utilizadas de maneira direta na forma de chás ou infusões, seguidas pelas que são

usadas como matéria prima e por último, as que são empregadas na indústria na obtenção de princípios ativos isolados (FOGLIO *et al.*, 2006).

Apesar de serem extensamente utilizadas, pouco se sabe sobre estas plantas do ponto de vista científico. Uma planta pode conter centenas de compostos vegetais ativos que quando isolados podem agir tanto de maneira benéfica no tratamento de doenças, desde as corriqueiras até as mais agressivas como o câncer, como também, podem apresentar efeitos tóxicos. Por isso, faz-se necessário o estudo da ação destes compostos para comprovar a sua eficácia e a dose necessária para que não haja uma intoxicação (BRANDÃO, 2010).

2.2 COMPOSTOS VEGETAIS ATIVOS

Os compostos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários, ou também conhecidos como essenciais e os metabólitos secundários ou especiais (BRANDÃO, 2010).

O metabolismo primário de uma planta é aquele que envolve os seus processos vitais, como por exemplo, a fotossíntese, a respiração celular, o transporte de solutos. Os metabólitos envolvidos nestes processos são distribuídos na planta como um todo. Dentre eles estão os aminoácidos, carboidratos, nucleotídeos, lipídeos, clorofila, citocromos, intermediários das vias anabólicas e catabólicas (ALDRED, 2009; BRANDÃO, 2010).

Os metabólitos secundários são aqueles produzidos a partir dos primários, geralmente possuem estrutura complexa, baixo peso molecular e atividade biológica marcante. Estes metabólitos são encontrados em quantidades relativamente baixas e em grupos restritos de plantas (BRANDÃO, 2010). Acredita-se que a sua função esteja relacionada com a reprodução vegetal com a interação da planta com o ambiente, atuando na sua defesa contra microorganismos invasores e ainda com a atração de polinizadores (TAIZ e ZEIGER, 2006; BRANDÃO, 2010).

Dentre os metabólitos primários, as pectinas são exemplos de polissacarídeos que apresentam atividades biológicas. Estes compostos

podem modular o sistema imunológico, interferindo na atuação de macrófagos, além de possuir atividades antioxidantes (SRIAMORNSAK, 2003; PAULSEN e BARSSET, 2005; OVODOV, 2009).

2.2.1 PECTINAS

Pectina é o termo utilizado para definir uma mistura complexa de polissacarídeos encontrados na parede celular de plantas superiores (SRIAMORNSAK, 2003; PAULSEN e BARSSET, 2005; OVODOV, 2009). A estrutura das pectinas é difícil de ser determinada, pois ela muda de acordo com o desenvolvimento da planta, na forma de estocagem e com o processamento do material, e, além disso, impurezas podem se associar aos compostos da planta (SRIAMORNSAK, 2003).

As pectinas pertencem ao grande grupo dos polissacarídeos ácidos cuja cadeia principal é formada por unidades de ácido galacturônico (GalA) 1,4-ligadas com diferentes ramificações constituídas por arabinose (Ara), galactose (Gal), xilose (Xyl) e ramnose (Rha) na maioria dos casos (SRIAMORNSAK, 2003; OVODOV, 2009). O GalA compreende aproximadamente 70% dos polissacarídeos que compõem a pectina (MOHNEN, 2008). A Rha é o monossacarídeo presente em menor escala na cadeia principal e a sua função é de promover uma torção na mesma. Além disso, estes polissacarídeos possuem grupamentos carboxil que podem ser naturalmente metil esterificados. Difrações de raio X mostraram que as pectinas formam hélices com três subunidades de GalA por volta, com um período de identidade de 1,31 nm e a volta é realizada para a direita. Entretanto, a forma como estas hélices são arranjadas se difere de pectina para pectina (SRIAMORNSAK, 2003).

As pectinas podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura em quatro grandes grupos (FIGURA 1): as homogalacturonanas (HG), rhamnogalacturonanas tipo I (RG-I) e tipo II (RG-II) e as xilogalacturonanas (XGA).

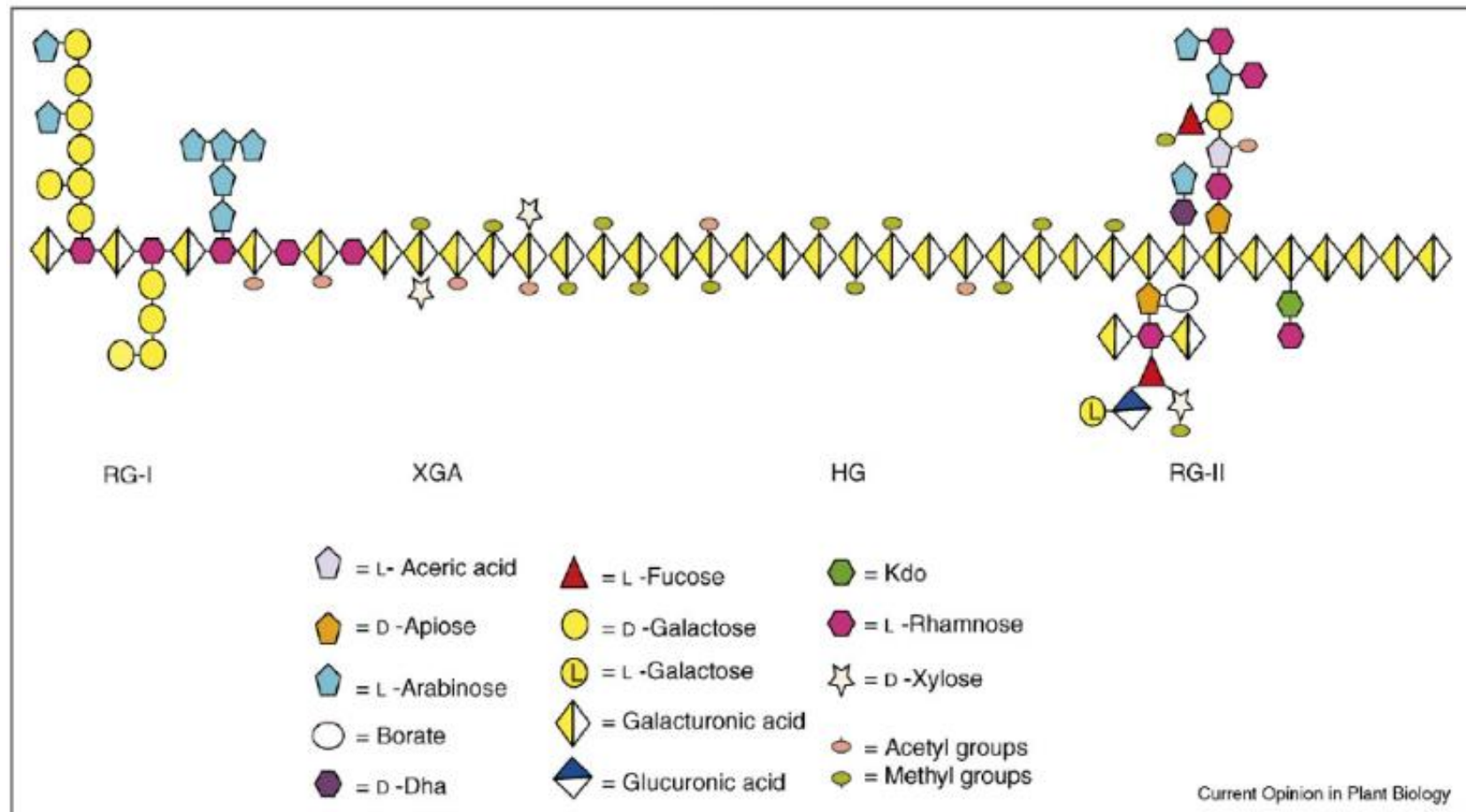


FIGURA 1 -REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES TIPOS DE PECTINAS
FONTE: MOHNEN, 2008

As HG são os polissacarídeos pécticos mais abundantes. Este tipo depectina é um polímero homogêneo formado por GalA com ligação $\alpha(1\rightarrow4)$. Estas unidades podem estar 1,2-ligadas com uma ou duas unidades de α -L-ramnopiranoses (MOHNEN, 2008; OVODOV, 2009). Algumas HG tem mostrado cerca de 100 resíduos de GalA seguidos, no entanto, em algumas regiões mais curtas foram identificados outros monossacarídeos pécticos (MOHNEN, 2008).

As heterogalacturonanas se diferem no grau de ramificação e nos resíduos presentes no polímero representando de 20 a 30% dos polissacarídeos que compõe as pectinas. As RG-I são variadas nos diferentes tipos de pectina, porém todas são constituídas por uma cadeia principal que alterna unidades de GalA 1,4-ligadas e unidades de Rha 1,2-ligadas, sendo estas últimas parcialmente substituídas por unidades de Gal 1,4-ligadas. Estes polissacarídeos podem apresentar cadeias laterais compostas por arabinogalactanas (OVODOV, 2009, MOHNEN, 2008).

A RG-II é o componente encontrado em menor quantidade na parede celular (aproximadamente 10%) e é diferenciado pela sua estrutura extremamente complexa. No entanto, sabe-se que possui uma função essencial na arquitetura da parede celular. Além disso, a estrutura básica descrita para as RG-II é conservada entre as espécies o que também evidencia sua importância funcional na planta. É uma estrutura resistente à ação de endopoligalacturonases e frequentemente é isolada de pectinas após a ação desta enzima (OVODOV, 2009, MOHNEN, 2008). Sua cadeia principal é formada por oito ou mais unidades de GalA 1,4-ligadas e as cadeias laterais podem possuir até 12 unidades diferentes e mais de 20 tipos de ligações glicosídicas. Monossacarídeos como GalA, Rha, Gal, Ara, Xyl, glucose (Glc), fucose (Fuc), manose (Man) e ácido glucurônico (GlcA) são comumente identificados. Entretanto, também é comum encontrar unidades de monossacarídeos incomuns, como por exemplo, apiose, monossacarídeos naturalmente metilados como 2-O-metil-fucose, 2-O-metil-xilose, e ainda compostos como o DHA (ácido 3-desoxi-D-lixo-2-heptulosárico), AceA (Ácido acérico) e KDO (ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico) (FIGURA 2) e boro. Com a presença de boro, há a formação de ésteres de borato-diol que promovem um *cross-link* e a consequente formação de dímeros de RG-II. Os dímeros são

ligados pela apiose β 1,3-ligada e representam um importante papel no crescimento da planta, uma vez que estudos comprovam que mutações que causam a diminuição da dimerização da RG-II provocam um déficit no crescimento. A RG-II tem a capacidade de se acumular em polpas de frutos, sendo importante na produção dos mesmos. (OVODOV, 2009, MOHNEN, 2008)

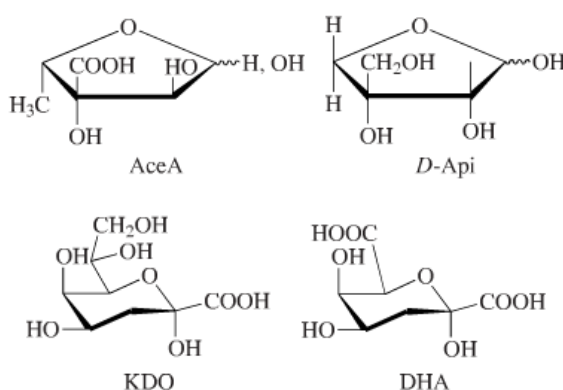


FIGURA 2 - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS ACEA, APIOSE, KDO E DHA ENCONTRADOS NAS RG-II.

FONTE: OVODOV, 2009.

A XGA é uma HG O-3 substituída com uma Xyl 1,3-ligada. Este tipo de polissacarídeo péctico é mais frequentemente encontrado em tecidos do sistema reprodutor das plantas, no entanto, também está presente em caules e folhas do gênero *Arabidopsis*. O estudo dos genes que realizam a biossíntese de XGA demonstrou que em resposta aos patógenos a sua produção é aumentada sugerindo que esta pectina é responsável por tornar as HG mais resistentes às endopoligalacturonases produzidas durante o ataque de patógenos (MOHNEN, 2008).

As funções das pectinas nas plantas são extensas, participando do crescimento das plantas, seu desenvolvimento, na morfogênese, na defesa, na adesão célula-célula, atuando na estrutura, na sinalização, na expansão celular, na porosidade da parede, na quelação de íons, nos fatores de crescimento e enzimas, no crescimento do tubo polínico, na hidratação das

sementes, na abscisão das folhas e no desenvolvimento do fruto (MOHNEN, 2008).

Estes polissacarídeos pécticos são altamente solúveis em água. Pectinas liofilizadas, quando em contato com a água tendem a hidratar rapidamente formando pequenos grumos que solubilizam lentamente. Em relação à sua viscosidade, a maioria das pectinas apresenta um comportamento Newtoniano, porém, em altas concentrações, este comportamento passa a ser pseudoplástico. Assim como a solubilidade está relacionada com amassa molecular, com o grau de esterificação e com o pH, a viscosidade também apresenta as mesmas relações. Por exemplo, os fatores que promovem a viscosidade da amostra são os mesmos que diminuem a solubilidade e vice versa. Estas propriedades estão relacionadas com a sua estrutura de poliânion linear. Pectinas são altamente ionizadas em solução e tendem a se manter estendidas, prevenindo a agregação das cadeias. Desta forma, cada cadeia é hidratada de maneira independente mantendo sua viscosidade Newtoniana. Com a diminuição do pH a ionização da molécula é diminuída e a repulsão entre as moléculas não ocorre mais, fazendo com que se formem grumos, aumentando a viscosidade e tornando-a pseudoplástica (SRIAMORNSAK, 2003).

Em função destas propriedades, as pectinas são utilizadas como espessantes e como agentes estabilizadores tanto na indústria alimentícia e cosmética, além de serem utilizadas na culinária no preparo de tortas, geleias e doces. Além disso, as pectinas também são utilizadas na produção de uma grande variedade de produtos, como por exemplo, produtos biodegradáveis, adesivos, substitutos de papel, espumas e plastificantes (MOHNEN, 2008). Na indústria farmacêutica, as pectinas são utilizadas como modificadores de superfície e podem atuar na distribuição de drogas a órgãos específicos (MOHNEN, 2008).

As pectinas, ainda, possuem diversas propriedades medicinais benéficas para a saúde humana (SRIAMORNSAK, 2003; MOHNEN, 2008), sendo capazes de diminuir as taxas de colesterol (SRIAMORNSAK, 2003; MOHNEN, 2008) e glucose sanguínea e estimular a resposta imune (MOHNEN, 2008). Além disso, as pectinas agem de forma profilática contra envenenamento com cátions tóxicos, como os metálicos (KOHN, 1982). Outra ação importante das

pectinas é a redução do tempo de coagulação (JOSEPH, 1956). Em virtude da sua capacidade de reter líquidos, as pectinas promovem a sensação de saciedade o que diminui o consumo de alimentos auxiliando no emagrecimento (SRIAMORNSAK, 2003).

Além das pectinas, existem muitos outros compostos vegetais que apresentam atividades biológicas. É o caso das arabinogalactanas-proteínas que estão descritas a seguir.

2.2.2 ARABINO GALACTANA-PROTEÍNAS (AGPS)

As arabinogalactana-proteínas (AGPs) são uma classe de glicoproteínas encontradas nos vegetais, ocorrendo na membrana celular, na matriz extracelular e em gomas de exsudato. Esta glicoproteína está incluída no grupo das glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) e é produto do metabolismo primário de plantas de diferentes grupos taxonômicos (CLARKE, ANDERSON e STONE, 1979). As AGPs vêm sendo utilizadas para diversas finalidades há várias décadas. A primeira descrita foi a goma arábica a qual é extraída do exsudato vegetal da *Acacia senegal* (ALI, ZIADA e BLUNDEN, 2009). Esta goma é utilizada na indústria alimentícia como aditivo emulsificante, além de ser utilizada nas indústrias farmacêutica, cosmética e litográfica devido às suas propriedades geleificantes (KREUGER e HOLST, 1996; MAJEWSKA-SAWKA e NOTHNAGEL, 2000; ALI, ZIADA e BLUNDEN, 2009).

Em termos gerais, a estrutura da AGP é composta por 10% de proteína e 90% de carboidrato e frequentemente apresenta uma âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (KREUGER e HOLST, 1996; SHOWALTER, 2001). De acordo com a constituição da porção protéica, pode-se classificar as AGPs em dois grupos, as AGPs clássicas e as não-clássicas. As clássicas são ricas em hidroxiprolina/prolina, alanina, glicina, serina e tirosina, enquanto que as não-clássicas têm o conteúdo de aminoácidos altamente variável (RUMYANTSEVA, 2005).

A cadeia principal da porção glicídica é ligada à porção proteica por uma ligação glicosídica entre os resíduos de hidroxiprolina e serina que se repetem no início da cadeia proteica. Ara e Gal são os principais monossacarídeos encontrados, em torno de 30 a 40%, entretanto, ácidos urônicos são frequentemente encontrados em quantidades consideráveis. A cadeia glicosídica principal é formada por galactanas β 1,3-ligadas, denominada de arabinogalactana tipo II (AG tipo II). As ramificações ocorrem no C-6 das Gal e são constituídas de Gal, Ara e GlcA, formando cadeias de 50 ou mais monossacarídeos (KREUGER e HOLST, 1996; SHOWALTER, 2001).

As AGPs apresentam a propriedade de se ligar ao reagente Yariv (β -glucosil – FIGURA 3). Este reagente é empregado no isolamento e quantificação o conteúdo de AGP pelo ensaio da difusão radial simples (KREUGER e HOLST, 1996; SHOWALTER, 2001).

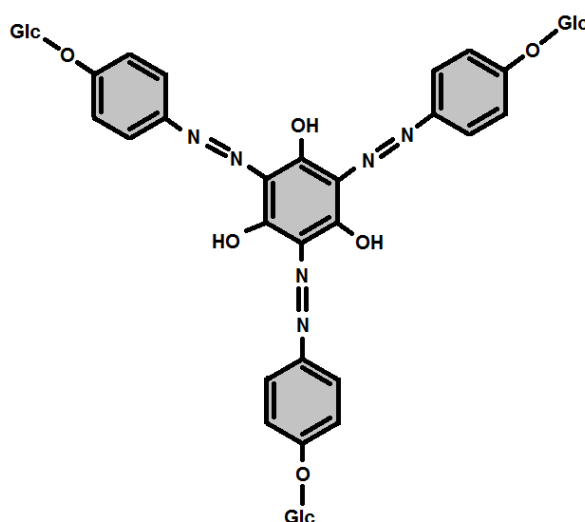


FIGURA 3 -ESTRUTURA QUÍMICA DO REAGENTE DE YARIV.

FONTE: O autor

NOTA: Os terminais monossacarídicos são fundamentais para a ligação com a AGP. Alguns terminais possibilitam a ligação, outros não, como é o caso dos terminais α -D-galactosil e β -D-manosil.

As AGPs não exercem uma função estrutural nas células onde são produzidas, uma vez que são, na sua maioria, secretadas na forma de gomas. Acredita-se que a sua função esteja relacionada com a defesa física da planta,

pois, a goma formada age como uma barreira em ferimentos feitos por patógenos (KREUGER e HOLST, 1996). Possivelmente, possam exercer uma função morforegulatória em briófitas, visto que são capazes de inibir a divisão celular e o crescimento em locais específicos da planta. Tal efeito se deve a presença de altas concentrações de hidroxiprolina (KREUGER e HOLST, 1996).

Segundo Showalter (1993) a abundância de AGPs na lamela média da parede celular das angiospermas leva a crer que elas possam exercer também uma função de reconhecimento celular. Também foram encontradas evidências da sua ação no desenvolvimento de flores, embriões e raízes, dado que estes processos envolvem interação e reconhecimento entre as células. Por isto se acredita que as AGPs tenham função análoga às moléculas de reconhecimento celular, as glicosaminoglicanas, presente em animais. Foram identificadas AGPs no interior de vesículas como corpos multivesiculares intravacuolares sugerindo que estão envolvidas nos processos de endocitose vacúolo-mediadas (SHOWALTER, 1993). Outra função comprovada cientificamente das AGPs é a sua ação na divisão celular e na morte celular programada (SEIFERT e ROBERTS, 2007).

Espécies vegetais de interesse medicinal que contém AGPs vêm sendo utilizadas como ativadoras do sistema complemento e como moduladoras do sistema imune (MAJEWSKA-SAWKA e NOTHNAGEL, 2000). Na TABELA 1 estão descritas algumas espécies vegetais de interesse medicinal as quais apresentam propriedades biológicas relacionadas com a presença de AGPs, arabinogalactana ou pectinas.

TABELA 1 -EFEITOS BIOLÓGICOS DE ARABINOGLACTANAS, ARABINOGLACTANA-PROTEÍNAS E PECTINAS DE PLANTAS MEDICINAIS.

Nome botânico (nome comum) Parte usada	Propriedades medicinais da planta	Polímero (Estrutura química)	Atividades biológicas relatadas	Ref.
<i>Achyrocline satureoides</i> (macela) Parte aérea	Digestiva, hepatoprotetora, anti- inflamatória, antioxidante e anti-microbiana	Pectinas (RG tipo 1)	Fagocitose de granulócitos; efeito no sistema complemento	PAULSEN (2001)
<i>Anacardium occidentale</i> , (cajuero) Fruto - castanha, pseudofruto - caju, raiz, casca do fruto e do tronco, goma de exsudato	Diurética, anti- inflamatória, anti-sifilítica, anti-diabética, laxativa, anti-parasitária, fungicida e inseticida, anti-tumoral	Arabinogalactana e AGP da goma de exsudato	Efeito inibitório de crescimento do sarcoma 180; efeito de alteração de adesão celular em HeLa e B16F10; cicatrização; estimulação de macrófagos; produção de óxido nítrico	MENESTRINA <i>et al.</i> (1996); STEVAN <i>et al.</i> (2000) e (2001); SCHIRATO <i>et al.</i> (2006)
<i>Angelica acutiloba</i> (angelica chinesa) - Raiz	Expectorante, antigripal e anti-inflamatória	Pectinas	Atividade anti-tumoral; efeito no sistema complemento	KIYOHARA <i>et al.</i> (1988); KIYOHARA & YAMADA (1989)
<i>Calendula officinalis</i> (calêndula) - Flores	Dermatológica, cicatrizante, anti- inflamatória, anti- microbiana	ArabinogalactanasPectinas ácidas (RG tipo 1)	Fagocitose de granulócitos; atividade citotóxica e anti-tumoral com sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich	PAULSEN (2001)
<i>Echinaceae purpurea</i> (equinacea) - Raiz, parte aérea e cultura de células	Imunomoduladora, anti- inflamatória, anti- parasitária, cicatrizante, anti-gripal e expectorante	Arabinogalactanas, AGPs, Pectinas (RG tipo 1)	Estimulação de macrófagos, aumento da produção de leucócitos, Liberação de interferon, interleucinas e TNF α pelos macrófagos, Atividade fagocítica de macrófagos	WAGNER <i>et al.</i> (1988); CLASSEN; WITTHOHN; BLASCHEK (2000); ALBAN <i>et al.</i> (2002); CLASSEN <i>et al.</i> (2006); THUDE <i>et al.</i> (2006)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (alcaçuz) - Raiz	Expectorante, imunestimulante, gastroprotetora e anti- inflamatória	Pectinas (RG tipo 1)	Atividade fagocítica de macrófagos; liberação de interferon pelos macrófagos; atividade mitogênica; efeito no sistema complemento	PAULSEN (2001)
<i>Malva sylvestris</i> (malva) – Folhas	Anti-inflamatória de vias respiratórias, hipoglicemiante e laxativa	Pectinas (RG tipo 1)	Efeito expectorante; efeito hipoglicemiante, Atividade fagocítica de macrófagos; efeito no sistema complemento	PAULSEN (2001)
<i>Plantago major</i> (tanchagem) - Folhas	Depurativa, cicatrizante, anti-inflamatória, diurética e adstringente	Arabinogalactanas Pectinas	Indução de TNF- α pelos macrófagos. Efeito no sistema complemento	SAMUELSEN <i>et al.</i> (1999); SAMUELSEN <i>et al.</i> (2000); MICHAELSEN <i>et al.</i> (2000)
<i>Uncaria tomentosa</i> (unha de gato) casca, folhas, raízes	Antirreumática, antibacteriana, anti- inflamatória, antimutagênica, antioxidante, anti- tumoral, anti-viral, citostática, depurativa, diurética, hipotensora, imunestimulante, regeneradora celular, vermífuga	AGPs	Atividade imunestimulante em macrófagos e ativação da via clássica do sistema complemento	OKUMURA (2009), LENZI <i>et al.</i> , (2013)

FONTE: O autor

Tanto as pectinas como as AGPs são encontradas em uma grande variedade de plantas medicinais. Entretanto, em relação estes compostos provenientes dos frutos de *P. peruviana* há poucas informações descritas na literatura, tanto em relação às suas características químicas como propriedades biológicas.

2.2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS VEGETAIS

Os modificadores da resposta imunológica tem como função modificar o sistema imunológico estimulando-o a desenvolver uma resposta contra agentes patógenos. Estes modificadores estão incluídos na classe de moléculas imunomoduladoras onde podem ser incluídos os polissacarídeos (BOHN e BEMMILLER, 1995; SANTA, 2006).

Existem diversas fontes de extração de polissacarídeos com ações imunomoduladoras, entre elas encontram-se os vegetais. Estas moléculas geralmente apresentam baixa toxicidade e não provocam efeitos colaterais significativos para o organismo. Por isso são uma forma de tratamento alternativo ideal aos medicamentos sintéticos, os quais geram efeitos colaterais prejudiciais ao organismo (SCHEPETKIN e QUINN, 2006; SHEU e LAI, 2012).

A atividade biológica predominante encontrada para os polissacarídeos é a ativação de macrófagos, induzindo-os a aumentar a sua citotoxicidade contra células tumorais e microorganismos, a intensificar a atividade fagocítica e aumentar a produção de espécies reativas do oxigênio e óxido nítrico bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α , IL1, IL6, IL8, IL12, IFN γ - e IFN- β 2 (SCHEPETKIN e QUINN, 2006). Devido a esta variedade de modificações, os macrófagos ficam aptos a gerar uma resposta ampla e rápida a diversos tipos de patógenos (BEUTLER, 2004).

Estudos revelam que a atividade imunomoduladora dos polissacarídeos está relacionada à sua complexa constituição de monossacarídeos e diversificadas ligações glicosídicas. Leung e colaboradores (2006) afirma que os parâmetros que afetam a atividade biológica destes compostos é a sua

carga, solubilidade, massa molecular, grau de ramificação e conformação da molécula. Polissacarídeos vegetais comumente apresentam alto grau de ramificação, são compostos por altas quantidades de monossacarídeos ácidos e ramificações diversificadas (SHEPETKIN e QUINN, 2006).

A ação destes polissacarídeos se dá pelo reconhecimento celular dos mesmos pelas células do sistema imune (GORDON, 2002; LEUNG *et al.*, 2006). Este reconhecimento é feito por proteínas transmembrana, como por exemplo, os receptores de reconhecimento padrão e proteínas plasmáticas. Tais moléculas são capazes de reconhecer epítomos conservados entre os patógenos e gerar uma resposta imune contra estes agentes patogênicos. Os polissacarídeos com ações biológicas também podem ser reconhecidos por estes receptores e gerar as mesmas respostas, induzindo o sistema imune a ativar-se (GORDON, 2002).

2.3 *Physalis peruviana* L.

A *Physalis peruviana* L. pertence à família Solanaceae, é originária do Peru e se distribui pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tais como a América Central e do Sul, tendo alguns exemplares distribuídos no sudeste da Europa e no centro da Ásia (FRANCO *et al.*, 2007). O nome *Physalis* é originário do grego “physis” que significa bolha ou bexiga, referindo-se ao cálice que encerra seus frutos comestíveis. É conhecida como capulí e aguaymanto no Peru e como uchuva na Colômbia (FIGURA 4) (TOMASSINI, *et al.*, 2000).

A planta é produzida e comercializada por diversos países como os EUA, África do Sul, Índia, Nova Zelândia, Austrália e Egito (RAMADAN e MOERSEL, 2007). No entanto, de acordo com a *Corporación Colombia Internacional* (2001), o país que apresenta a maior produção comercial do fruto é a Colômbia. O país ocupou, em média, 533.5 hectares em 2000, chegando a produzir 28 toneladas do fruto em 1998. No entanto, este valor diminuiu para cerca de 20 toneladas em 2002. Esta diminuição de produção do fruto na Colômbia se deu devido à popularização do fruto em outros países e

consequente baixa nas exportações e pela dificuldade de cultivo da planta (CCI, 2001).

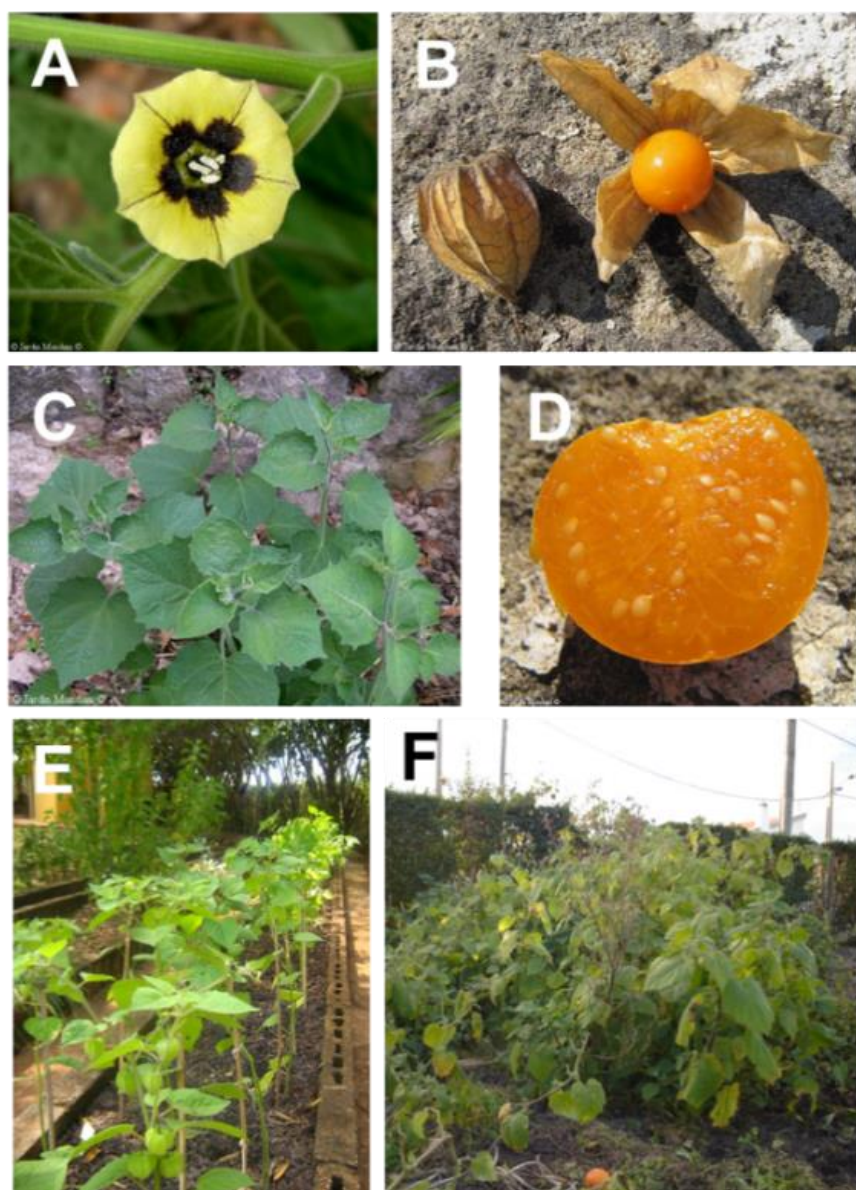


FIGURA 4 -*Physalis peruviana* EM DETALHES. A – DETALHES DA FLOR; B E D- DETALHES DOS FRUTOS; C – DETALHE DAS FOLHAS; E E F – DETALHE DA PLANTA

FONTES: <http://jardin-mundani.blogspot.com.br/2012/03/physalis-peruviana-el-bombon-andino.html>; <http://plantas-ornamentais.blogspot.com.br/2011/01/physalis-physalis-peruviana-l.html>

A *P. peruviana* é a espécie mais conhecida do gênero, possui hábito perene e é muito usada na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, tais como malária, asma, hepatite, dermatite e artrite reumatoide.

Além disso, é usada como anticancerígeno, antimicótico, antibacteriano antipirético, diurético e apresenta efeitos imunomoduladores (FRANCO *et al.*, 2007; TOMASSINI, *et al.*, 2000; ZAVALA, *et al.*, 2006).

Esta espécie possui porte arbustivo e robusto, que pode chegar a 2 metros de altura, com flores amarelas contendo cinco máculas na base das pétalas e cálice frutífero circular. O denso revestimento de tricomas simples está presente nos ramos, folhas, flores e frutos, conferindo a estes órgãos uma superfície aveludada ao tato. Os frutos constituem-se em uma baga carnosa, em forma de globo, com diâmetro que oscila entre 1,25 e 2,50 cm e o peso entre 4 e 10 g. São alaranjados e saborosos quando maduros e podem ser consumidos *in natura* ou em geleias e doces (LIMA, 2009). As sementes são abundantes, chegando a 300 por fruto e germinam com facilidade em solos com relativa umidade. As folhas são triangulares e de coloração verde-escuro, enquanto o talo principal é herbáceo (LIMA, 2009).

Os benefícios associados à ingestão dos frutos de *P. peruviana* estão relacionados com a sua composição química e nutricional (PUENTE *et al.*, 2011). Os mesmos autores relatam a presença de ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas A, B, C, E e K1, fitoesteróides, vitanólidos, fisalinas, além dos carboidratos e proteínas que agem conjuntamente para beneficiar a saúde e reduzir o risco de algumas doenças (CHAVES, SCHUCH e ERIG, 2005).

A planta possui em suas folhas, frutos e cálices um composto denominado de vitanólido (MUNÓZ *et al.*, 2009). Este composto é uma lactona esteroideal natural produzida como metabólito secundário em plantas do gênero Solanaceae (AHMAD, *et al.*, 1999). Os vitanólidos apresentam atividades biológica tais como antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatória, hepatoprotetora, imunomodulatória e antialimentar para insetos (AHMAD, *et al.*, 1999; PUENTE *et al.*, 2011). De acordo com Lan e colaboradores (2009), já foram encontrados 17 tipos diferentes deste composto na *P. peruviana*, dos quais 4 apresentaram atividade citotóxica em células cancerígenas de pulmão, mama e fígado.

Outro metabólito secundário importante encontrado exclusivamente em plantas do gênero *Physalis* são as fisalinas (PUENTE *et al.*, 2011). Trata-se de pseudoesteróides que possuem diversas atividades biológicas (PUENTE *et al.*,

2011). As principais fisalinas encontradas na *P. peruviana* são as do tipo A, B, D e F que apresentaram atividade anticancerígena (WU *et al.*, 2004). Segundo Puente e colaboradores (2011) as fisalinas B e F possuem uma atividade supressora potente, uma vez que são capazes de inibir a proliferação de linfócitos. Os mesmos autores ainda afirmam que as fisalinas D e F também tem a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e de impedir a ativação de macrófagos.

Em relação a compostos do metabolismo primáriodesta espécie vegetal, comoos polissacarídeos, nenhum relato foi encontrado. No entanto há evidências de que os polissacarídeos presentes nas espécies do mesmo gênero apresentam atividades biológicas. Frações polissacarídicas do cálice da *Physalis alkekengi* var.*francheti* apresentaram atividade antioxidante *in vitro* (GE *et al.*, 2009).

Na medicina tradicional, o uso do suco das frutas é utilizado para o tratamento do pterígio (PARDO *et al.*, 2008). Os frutos são usados, ainda, nos tratamentos de estomatite, faringite, diabetes, como descongestionante ocular e diurético (MUNÕZ *et al.*, 2009) além de possuírem ações antioxidantes e anticancerígenas, sendo devido a essas propriedades muito procuradas pelos consumidores (CHAVES; SCHUCH; ERIG, 2005). Preparações obtidas através da raiz amassada com água são utilizadas para tratamento de icterícia em crianças (RAI, 2004). Suas folhas e frutos são utilizados no tratamento de reumatismo, gota, contusões (GONZÁLEZ *et al.*, 2007) e têm-se demonstradoimportantes atividades antimicrobianas e antiinflamatórias (QUISPE-MAURICIO *et al.*, 2009).

Em estudos científicos, o extrato etanólico com a planta inteira de *P. peruvianainibiu* o crescimento celular, apresentou atividade antioxidante, potente atividade citotóxica e induziu a morte celular por apoptose das células Hep G2 (células provenientes de carcinoma hepatocelular) crescidas em cultura (WU, *et al.*, 2004). Os extratos das folhas apresentam significativa atividade antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória (ZAVALA *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2007; ROCKENBACH *et al.*, 2008).

2.4 SISTEMA IMUNOLÓGICO

A palavra imunidade tem sua origem no termo latino *immunitas* que se refere às atitudes protetoras que senadores romanos tomavam no decorrer de seu mandato (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008). Imunidade significa proteção contra doenças infecciosas (MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010). No corpo humano, as células e moléculas responsáveis por essa defesa formam o sistema imunológico (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

A função do sistema imunológico é defender o organismo não só de patógenos, mas também de substâncias não infecciosas (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008). Para defender o organismo de forma eficaz, o sistema imunológico deve atender a quatro principais aspectos. O primeiro é o reconhecimento imunológico, no qual a infecção deve ser identificada. Este trabalho é feito pelas células brancas presentes no sangue que proporcionarão uma resposta imediata. O segundo aspecto é controlar e eliminar a infecção, tarefa realizada pelo sistema complemento, anticorpos e por células com capacidade destrutiva, tais como linfócitos e macrófagos. No entanto, esta resposta deve ser controlada, o que preenche o terceiro aspecto. O sistema imunológico deve ter a capacidade de controlar a sua resposta, evitando maiores danos ao organismo como alergias e doenças autoimunes. O quarto aspecto é proteger o indivíduo de uma reincidência de uma doença causada pelo mesmo patógeno, produzindo uma memória imunológica (MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Dentre os aspectos estudados neste trabalho estão os macrófagos e a fagocitose realizadas por eles, bem como as citocinas que medeiam aspectos da inflamação e a ativação destas células, bem como a produção de óxido nítrico por estas células.

2.4.1 MACRÓFAGOS

Macrófagos são células derivadas dos monócitos sanguíneos e desempenham papel importante do sistema imunológico. São capazes de internalizar e degradar antígenos e microorganismos patogênicos. Estão localizadas nos tecidos e possuem período de vida relativamente longo (2 a 4 meses). Participam tanto da resposta imune inata como a adaptativa, sendo considerados os primeiros a atuarem na defesa do organismo (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; ROITT; MALE; BROSTOFF, 2003; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Os macrófagos podem ser ativados por diversas vias, como por exemplo, produtos microbianos, através de endotoxinas e citocinas produzidas por linfócitos T, como o $\text{IFN}\gamma$. Depois de ativados os macrófagos são capazes de reconhecer os organismos invasores, internalizá-los e apresentá-los para as células T efectoras, as quais ativam outros macrófagos para destruir os antígenos. Por este motivo, são consideradas células apresentadoras de antígenos. Este tipo de célula tem a capacidade de interligar as respostas imune primária e a adquirida e por isso são consideradas células de ambos os sistemas (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

A ativação dos macrófagos ocorre de duas maneiras. A primeira envolve o contato direto dos antígenos com os macrófagos, ativando-os. Esses macrófagos ativados atuam não só como células apresentadoras de antígenos, como também são responsáveis pela secreção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) e a interleucina 1beta ($\text{IL1}\beta$) responsáveis pelo recrutamento de células T efectoras. Estas citocinas induzem células epiteliais a expressarem selectinas e integrinas as quais se ligam à receptores das células T efectoras possibilitando a sua entrada no tecido atingido. As células T efectoras produzem o interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) que é a principal citocina ativadora de macrófagos gerando a destruição do antígeno (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

A segunda forma de ativação dos macrófagos é via sinalização das células T efectoras, processo denominado de inflamação. Esta via se inicia com o recrutamento de monócitos sanguíneos para o tecido por meio de sinais enviados pelas células T efectoras que entraram em contato com os antígenos. As células T, quando em contato com os antígenos, secretam citocinas, principalmente o $\text{IFN}\gamma$, e expressam em suas membranas, receptores CD40L. A interação física deste receptor com o receptor CD40 presente na membrana dos macrófagos faz com que eles se diferenciem em macrófagos ativados, desencadeando uma via de transdução de sinal semelhante à via ativada por TNF. Macrófagos também são capazes de produzir fatores de crescimento para fibroblastos e células endoteliais que participam da moldagem dos tecidos após a infecção e lesão (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

As principais características observadas no macrófago ativado, independente da via de ativação, são: uma grande atividade respiratória devido à alta atividade de degradação dos patógenos, aumento na sua taxa de migração para o local de concentração dos antígenos e aumento na taxa de metabolização da glucose para a produção de ATP (adenosina trifosfato) (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Os macrófagos podem desenvolver morfologias diferentes após a ativação. Alguns possuem um citoplasma abundante e são chamados de epitelióides por se parecerem com as células epiteliais; outros se fundem e formam uma célula multinucleada (KARNOVSKY & LAZDINS, 1978; ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Depois de ativados, os macrófagos produzem uma gama de proteínas que realizam as funções efectoras com o objetivo de eliminar os patógenos. Dependendo da sinalização química que recebem podem promover a destruição dos antígenos, a estimulação da inflamação via $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$ e a remoção de tecido morto a fim de facilitar a reparação do tecido danificado (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

A ativação dos macrófagos tem como função a destruição dos microrganismos invasores por meio da fusão dos fagossomos com os

lisossomos, formando os fagolisossomos. Esta destruição se dá por três diferentes vias: enzimas proteolíticas presentes no fagolisossomo, ação das espécies reativas do oxigênio (ERO) e intermediários dos reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$). As enzimas proteolíticas são essenciais na eliminação de bactérias. As ERN são produzidas através de processo de chamado *burst* respiratório. Neste processo há a conversão do oxigênio molecular pela enzima NADPH oxidase que é capaz de reduzir o oxigênio formando o radical superóxido e liberando de NADP^+ (FIGURA 5) (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

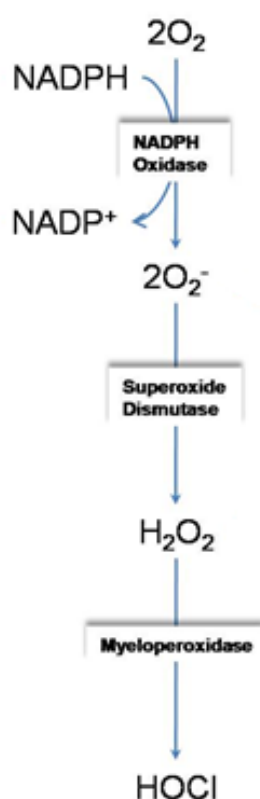


FIGURA 5 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO *BURST* RESPIRATÓRIO.

FONTE: adaptado de <http://www.ihtc.org/medical-professionals/blood-disorders/other-hematological-disorders/white-blood-cell-disorders/>

NOTA: As enzimas NADPH oxidase, superóxido dismutase e mieloperoxidase são as responsáveis pela formação dos ERO no interior dos fagolisossomos.

Outra função da formação de ERN é produzir as condições fundamentais para a atividade das enzimas proteolíticas, uma vez que estes radicais são responsáveis por manter o pH nas condições ideais para o

funcionamento destas enzimas (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Além da formação de ERN, os macrófagos produzem os reativos do oxigênio, em especial o $\text{NO}^\bullet$. Este composto é produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A iNOS é uma enzima localizada no citosol e está ausente em macrófagos não ativos. A sua síntese pode ser induzida em resposta ao $\text{IFN}\gamma$. A enzima catalisa a conversão da arginina em citrulina, liberando $\text{NO}^\bullet$ que se difunde pelo fagolisossomo e pode se ligar com o peróxido ou superóxido de hidrogênio e produzir radicais peroxinitrito altamente reativos que podem eliminar microorganismos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Algumas consequências podem ser geradas se o processo de destruição dos patógenos e a inflamação não forem controlados. Um exemplo disto é que produtos microbicidas liberados pelos macrófagos ativados podem causar lesões teciduais, uma vez que estes produtos são incapazes de diferenciar os antígenos dos tecidos próprios (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

2.4.1.1 Fagocitose

O processo pelo qual macrófagos internalizam antígenos é denominado de fagocitose. Neste processo, o antígeno é circundado pela membrana fagocítica e então internalizado. A princípio este é um processo simples, no entanto envolve uma gama de proteínas e eventos particulares (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

O primeiro evento da fagocitose é o reconhecimento do microorganismo invasor pelos fagócitos. Este evento é realizado pelos receptores de membrana que reconhecem os antígenos de forma específica. Alguns destes receptores são padrões e capazes de reconhecer a manose, como os receptores de lectina tipo C. Outro grupo de receptores é capaz de reconhecer proteínas do hospedeiro que revestem microorganismos. Estas proteínas são denominadas

de opsoninas e abrangem os anticorpos, proteínas do complemento e lectinas. Para que um microorganismo seja reconhecido e fagocitado, é necessário um processo chamado de opsonização, onde o microorganismo é envolvido com as opsoninas (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

O modo mais eficaz de fagocitar microorganismos é opsonizá-los com anticorpos. Estes anticorpos possuem duas regiões distintas, uma que se liga aos antígenos e a outra que interage com as células do sistema imunológico denominada de região Fc. Os receptores expressos pelos fagócitos tem alta afinidade para a região Fc dos anticorpos, chamados de $Fc\gamma R1$. Dessa maneira, se os microorganismos forem opsonizados com anticorpos, os fagócitos terão maior facilidade de internalizá-los e posteriormente destruí-los como descrito no item 2.4.1. Visto que os fagócitos se ligam ao microorganismo, a membrana estende uma projeção de forma côncava (pseudópode) em torno do micróbio, envolvendo-o, de forma que a membrana externa do fagócito engloba o antígeno isolando-o do lado de dentro da célula, como mostra a FIGURA 6 (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

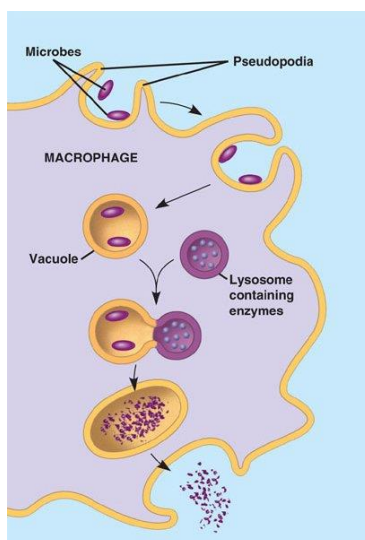


FIGURA 6 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FAGOCITOSE.

FONTE: <http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch43/phagocytosis.html>

NOTA: Depois de internalizado, os microorganismos ficam isolados dentro de vesículas que se fundem com lisossomos, formando o fagolisossomo. É neste local onde ocorre a digestão dos microorganismos.

2.4.1.2 Citocinas

Segundo Abbas e colaboradores (2008) “citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a microorganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias”.

Ainda que estruturalmente diferentes, as citocinas apresentam propriedades semelhantes listadas abaixo (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008):

- A secreção de citocinas é um evento breve e limitado, pois elas não são armazenadas. Sua síntese é iniciada com a ativação celular por meio de novas transcrições de genes que geram RNAs mensageiros instáveis que são degradados rapidamente.
- As ações das citocinas são pleiotrópicas, uma vez que uma citocina é capaz de atuar em diferentes tipos celulares e redundantes, já que várias citocinas apresentam a mesma função.
- A ação das citocinas pode ser local, de maneira autócrina (produz o efeito na mesma célula que a produz) ou parácrina (produz o efeito na célula vizinha), ou pode ser sistêmica, de maneira endócrina, uma vez que podem ser produzidas em quantidade, alcançar a circulação sanguínea e atuar em locais distantes do ponto de produção.
- A ação das citocinas é feita mediante a ligação com receptores de membrana específicos, como efeito disto, tem-se que a quantidade necessária para que haja uma resposta é mínima.
- Sinais externos tem a capacidade de regular a expressão destes receptores de membrana, regulando, portanto, a ação das citocinas.
- O tipo de resposta celular às citocinas pode ser de maneira a alterar a expressão gênica modificando algumas funções da célula ou de maneira a proliferar a célula-alvo.
- A resposta celular às citocinas é firmemente regulada através de *feedbacks*.

As citocinas ainda podem ser classificadas de acordo com a sua funcionalidade em três categorias: as mediadoras e reguladoras da imunidade

inata, as mediadoras e reguladoras da imunidade adaptativa e as estimuladoras da hematopoese (TABELA 2) (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

TABELA 2- TABELA COMPARATIVA DAS CITOCINAS QUE ATUAM NAS IMUNIDADES INATA E ADQUIRIDA

Característica	Imunidade Inata	Imunidade Adquirida
Exemplos	TNF, IL1, IL12, IFN γ	IL2, IL4, IL5, IFN γ
Principal fonte celular	Macrófagos, células NK.	Linfócitos T
Principais funções fisiológicas	Mediadores da inflamação (local ou sistêmica)	Regulação do crescimento e diferenciação dos linfócitos; ativação de células efectoras (macrófagos, eosinófilos, mastócitos).
Estímulos	PLS (endotoxina), peptídeoglicanos, RNA viral, citocinas derivadas das células T (INF γ).	Antígenos protéicos
Quantidades produzidas	Podem ser altas; detectáveis no soro.	Geralmente baixas. Normalmente indetectáveis no soro
Efeitos locais ou sistêmicos	Ambos	Em geral, locais.
Papéis em doenças	Doenças sistêmicas (por exemplo, choque séptico).	Lesão tecidual local (por exemplo, inflamação granulomatosa).
Inibidores	Corticoesteróides	Ciclosporina, FK-506

FONTE: ABBAS, LICHTMAN e PILLAI (2008).

As citocinas mediadoras e reguladoras da resposta imune inata são as produzidas por fagócitos em resposta a antígenos. A maioria destas citocinas tem sua ação em células endoteliais e leucócitos para estimular as reações inflamatórias iniciais. Outras têm a capacidade de controlar estas reações. As mediadoras e reguladoras da resposta imune adquirida são produzidas principalmente por linfócitos T em resposta ao reconhecimento de antígenos estranhos. Suas funções são de promover o crescimento e a diferenciação de

grupos de células linfocitárias e recrutamento e ativação destas células. As citocinas estimuladoras da hematopoese são produzidas por células da medula óssea, leucócitos para estimular a maturação de leucócitos imaturos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Dentre as citocinas estudadas neste trabalho estão a IL1, IL6, TNF α e IL10. A IL1 foi descrita inicialmente como um fator que causava febre e danos no organismo. Mais tarde foi identificada a presença de dois tipos distintos de IL1, a IL1 α e a IL1 β . Estas citocinas desempenham suas funções tanto na imunidade inata como na adaptativa e é um importante mediador da resposta inflamatória, uma vez que induz a fagocitose em células mononucleares, como por exemplo, os macrófagos (KHAN, 2008). Quando em grandes quantidades, esta interleucina pode gerar febre em resposta a infecção por bactérias e vírus, redução do apetite e indução da proteólise muscular. A IL1 β pode gerar danos no tecido pancreático por destruir as células beta, gerando diabetes melitus do tipo I. Além destas ações, a IL1 também promove a proliferação de fibroblastos, induzindo a cura de feridas (KHAN, 2008). A IL1 também age de maneira conjunta com o TNF α gerando respostas rápidas e aprimorando a defesa do organismo (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

A IL6 é uma interleucina pró-inflamatória que desempenha funções não só na defesa do organismo como também na reprodução, no metabolismo ósseo e no envelhecimento. Ela é sintetizada por fagócitos, células endoteliais, fibroblastos e por outras células em resposta a traumas como queimaduras, dano tecidual, inflamação por IL1 e, em menor extensão, por TNF α (KHAN, 2008). Assim como as outras interleucinas inflamatórias, como a IL1 e o TNF α , gera febre por incita a mobilização de energia no tecido muscular e adiposo, resultando num aumento na temperatura corporal. Além disso, ela interfere na diferenciação de células B e causa mobilização de neutrófilos. Sua produção é controlada por hormônios esteroidais, que podem agir em níveis pós ou transcripcionais (KHAN, 2008; CRUVINEL *et. al.*, 2010)

O TNF α é mais uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos. É um mediador de ambas as imunidades, inata e adquirida, e, onde está presente, causa calor, inchaço, vermelhidão e dor (KHAN, 2008). Sua função é a de estimular a produção de outras interleucinas pró-inflamatórias como a IL6, IL10 e a si mesmo, além de atuar no aumento da

mobilização e da função efetora de neutrófilos e a sua aderência às células endoteliais (KHAN, 2008).

A IL10 é uma importante interleucina reguladora do sistema imunológico. É produzida por macrófagos células TH2 e mastócitos. As células T citotóxicas também liberam IL-10 para inibir a infecção por células *Natural Killer* estimulada por vírus.. Além disso, a IL-10 inibe a síntese de citocinas envolvidas no processo inflamatório, incluindo a IL-2, IL-3, TNF α e IFN γ . Devido ao seu perfil supressor, a IL10 também funciona como um inibidor de células TH1 e, em virtude da inibição de macrófagos, que funciona como um inibidor de células apresentadoras de antígeno (COUPER *et. al.*, 2008; KHAN, 2008; SABAT *et. al.*, 2010).

Além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a IL10 também é capaz de induzir a produção de interleucinas anti-inflamatórias, desenvolvendo o papel de reguladora das respostas TH1/TH2. Com base na sua função imunoreguladora, IL-10 e os seus receptores são estudados para intervenção terapêutica de doenças auto-imunes, inflamatórias agudas e crônicas, câncer, psoríase e alergias (COUPER *et. al.*, 2008; KHAN, 2008; SABAT *et al.*, 2010).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Nos dias de hoje dá-se grande atenção ao estudo dos antioxidantes devido, principalmente, aos efeitos causados pelos radicais livres no organismo. A oxidação é essencial na vida aeróbica e, assim, os agentes oxidantes são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica.

Estes compostos oxidativos estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, se em excesso, apresentam efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana, a agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

2.5.1 RADICAIS LIVRES

Radical livre é uma estrutura química que apresenta um desemparelhamento de elétrons em um de seus orbitais, o que o torna instável, muito reativo e com uma capacidade de se combinar inespecificamente com qualquer estrutura celular.

O ponto de origem dos radicais livres normalmente é, em maior escala, no interior das mitocôndrias e em menor intensidade no interior do citoplasma ou próximos à membrana plasmática (ANDERSON, 1996; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Devido a esta produção exacerbada de radicais livres nas mitocôndrias, estas organelas desenvolveram mecanismos de defesa pelos quais os radicais são neutralizados (PRYOR, 1986). Um único radical livre pode dar início a uma reação em cadeia provocando danos em inúmeras moléculas, tais como, polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucléicos (ANDERSON, 1996; JONES, 2008), outros podem causar danos somente a lipídeos e outros são pouco reativos, no entanto geram espécies danosas (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). Os principais EROs e ERNs, assim como os precursores, estão detalhados na TABELA 3.

O ânion superóxido $O_2^{\cdot -}$ é o primeiro a ser formado após a primeira redução do O_2 , ocorre em quase todas as células aeróbicas principalmente em neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos em sua ativação máxima (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Sua produção é realizada por enzimas como NADPH oxidases, xantina oxidase e citocromo P-450 ou por compostos redox-reativos como semi-ubiquinona (ARUOMA, 1998). Apesar de o $O_2^{\cdot -}$ ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, são observadas lesões secundárias nos sistemas onde é produzido (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Cerca de 1 a 3% de moléculas de oxigênio são convertidas em radical $O_2^{\cdot -}$ na mitocôndria em condições fisiológicas (ARUOMA, 1998).

O $\cdot OH$ é o radical mais prejudicial ao organismo por ser o mais reativo e mais produzido. É capaz de atacar moléculas, de retirar hidrogênios e de adicionar ligações insaturadas. Sua meia vida é curta, o que dificulta o seu

sequestro *in vivo*. (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; CAMPESTRINI, 2013). Sua formação é feita por meio de duas reações: através da conversão do H_2O_2 , na presença de metais condutores como o íon ferroso (Fe^{2+}) e o íon cúprico (Cu^{+2}) ou pela homólise da água por exposição à radiação ionizante (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; CAMPESTRINI, 2013).

TABELA 3 – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E DE NITROGÊNIO (ERNS) DE INTERESSE BIOLÓGICO

Espécies reativas	Símbolo	Meia vida (s)	Reatividade
ERO			
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6}	Gerado na mitocôndria, sistema cardiovascular e outros.
Radical hidroxila	$\cdot OH$	10^{-9}	Altamente reativo, gerado durante a sobrecarga de ferro e situações semelhantes em nosso corpo.
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Estável	Formado em nosso corpo por uma ampla gama de reações e resultando em radicais potentes como, $\cdot OH$.
Radical peroxila	$ROO^{\cdot}$	Segundos	Reativo e formado a partir de lipídeos, proteínas, DNA, carboidratos etc., durante o dano oxidativo.
Hidroperóxido orgânico	$ROOH$	Estável	Reage com íons metálicos formando espécies reativas.
Oxigênio singlete	1O_2	10^{-5}	Altamente reativo formado por fotossensibilização e reações químicas.
Ozônio	O_3	Segundos	Pode reagir com várias moléculas produzindo 1O_2 .
ERN			
Óxido nítrico	$NO^{\cdot}$	Segundos	Neurotransmissor e regulador da pressão sanguínea podem gerar potentes oxidantes durante estados patológicos.
Peroxinitrito	$ONNO^{\cdot-}$	10^{-3}	Formado a partir do $NO^{\cdot}$ e $O_2^{\cdot-}$, é altamente reativo.
Ácido peroxinitroso	$ONOOH$	Pouco estável	Forma protonada do $ONNO^{\cdot-}$
Dióxido de nitrogênio	NO_2	Segundos	Formado em reações de combustão.

FONTE: DEVASAGAYAM *et. al.*, 2004

O Fe^{2+} é o mais biodisponível nos organismos podendo ser encontrado em proteínas de transporte como a transferrina, e na forma de armazenamento,

como na ferritina. Esta conversão de H_2O_2 em $\cdot OH$ é feita através da Reação de Fenton (Equação 1) (CAMPESTRINI, 2013). Outra maneira de produção do radical $\cdot OH$ é através da redução do íon férrico (Fe^{3+}) à Fe^{2+} com a utilização do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por meio da Reação de Haber-Weiss (Equação 2). (HALLIWELL, 1992; KEHRER, 2000). As reações, de maneira resumida, estão mostradas na FIGURA 7.

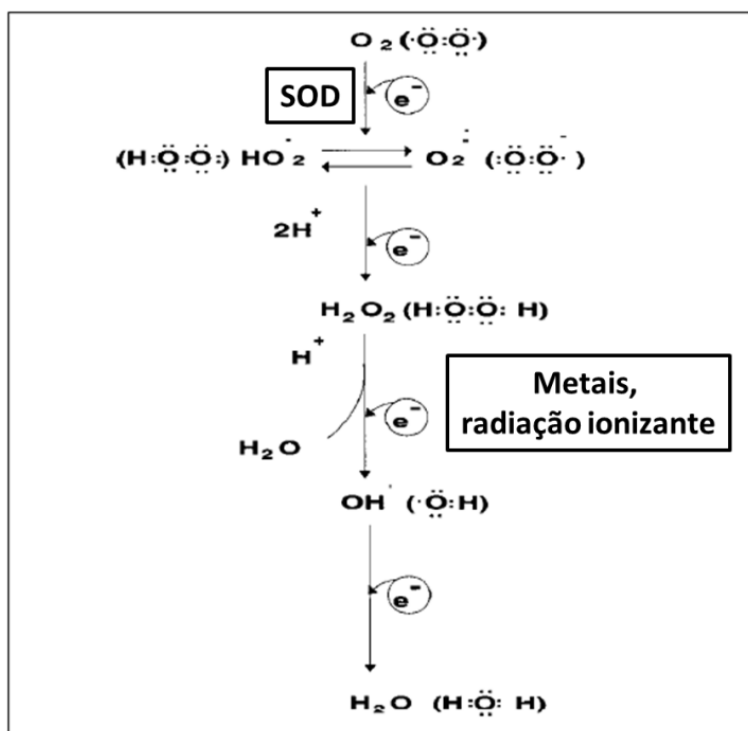
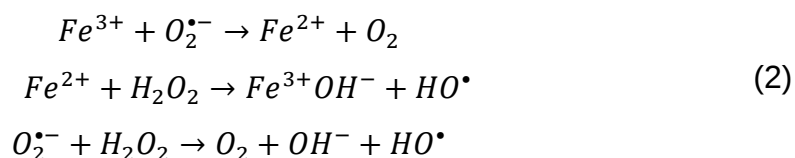
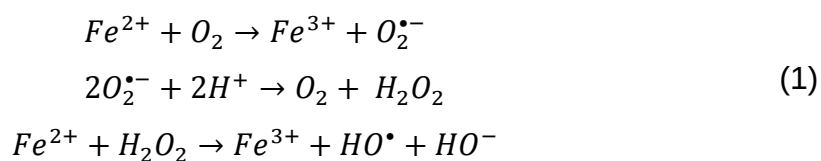


FIGURA 7 – REDUÇÃO DO O_2 NA MITOCÔNDRIA ATÉ A FORMAÇÃO DE H_2O .

FONTE: Adaptado de FERREIRA e MATSUBARA, 1997.

NOTA: Várias EROs são formadas no processo.

A segunda forma de concepção do radical $\text{HO}^\bullet$ é a homólise da água pela exposição à radiação ionizante. Desta forma, a radiação ultravioleta é capaz de induzir a formação de radicais $\text{HO}^\bullet$ nas células da pele, a radiação gama e os raios X fazem com que sejam produzidos radicais $\text{HO}^\bullet$ onde incidem (processo Foto-Fenton). Esses fatores levam a alterações e mutações gênicas gerando doenças (HUSAIN, CILLARD, CILLARD, 1987; HALLIWELL, 1992).

O H_2O_2 é o metabólito do O_2 mais deletério. A partir dele é produzido o $\text{HO}^\bullet$ (FIGURA 7). Este metabólito possui uma meia vida longa, tem a capacidade de permear camadas lipídicas e pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao íon perferil (Fe^{5++}). Devido a estas propriedades é considerado tóxico para as células, sendo esta toxicidade aumentada na presença do ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Dentre os ERNs, o $\text{NO}^\bullet$ é o mais importante, uma vez que está relacionado com a eliminação de patógenos por células fagocíticas (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). É uma molécula gasosa, pequena, instável, potencialmente tóxica e amplamente difusível através das membranas celulares (COULTER *et al.*, 2008). Este radical, além de ser produzido em maior escala nos lisossomos destas células, também pode ser concebido a partir da arginina, do oxigênio e NADPH pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), originando NADP^+ e citrulina (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). Em mamíferos, há três isoformas conhecidas de (NOS): a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS) (FORSTERMANN *et al.*, 2003). As duas primeiras são Ca^{2+} -dependentes e expressas de forma característica nestas células enquanto que a isoforma iNOS não apresenta esta dependência. A iNOS, como já mencionada no item 2.4.1 é expressa nos macrófagos após estímulo adequado, como aquele causado pelo $\text{TNF}\alpha$ e outros agentes como lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (FANG, 2004; MONCADA, 1999).

O nitrato (NO_3^-) pode se transformar em nitrito (NO_2^-), que reage com os ácidos gástricos gerando o ácido nitroso (HNO_2). Este ácido promove a desaminação das bases do DNA que contêm grupo $-\text{NH}_2$. O óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, produzido pelos fagócitos, gerando peroxinitrito ($\text{ONNO}^\bullet$). Esse último, por sua vez, pode sofrer reações secundárias formando agentes

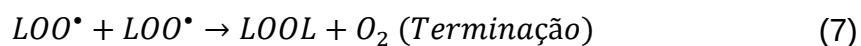
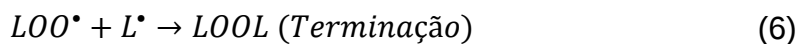
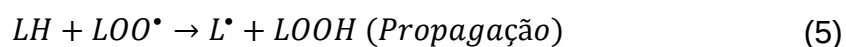
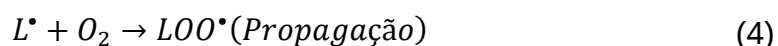
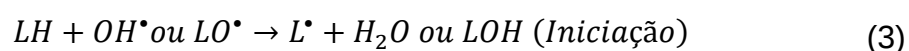
capazes de adicionar um nitrogênio em aminoácidos aromáticos (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

Um dos danos mais prejudiciais que os radicais livres podem gerar é a oxidação dos lipídeos de membrana, processo chamado de lipoperoxidação.

2.5.2 LIPOPEROXIDAÇÃO

Segundo Ferreira e Matsubara (1997), a lipoperoxidação é uma reação em cadeia que atinge as membranas alterando a sua estrutura e consequentemente a sua função. Também está associada aos processos de envelhecimento, do câncer e na potencialização da toxicidade de xenobióticos. No entanto, a lipoperoxidação produz compostos importantes em outras reações, como por exemplo, na reação para a formação das prostaglandinas. É o excesso destes produtos que causam as lesões nas membranas.

A lipoperoxidação é realizada em cadeia e possui três etapas: iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão descritas nas reações (3 a 7) abaixo, onde L é o lipídeo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).



Na reação de inicialização há o sequestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) pelo radical HO[•] ou pelo radical alcóxila (LO[•]) formando o radical lipídico (L[•]). Na equação seguinte, de propagação, o L[•] reage com o O₂ dando origem ao radical peróxila (LOO[•]), que depois sequestra um novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado formando mais um L[•]. O termino se dá

pela propagação dos radicais formados nas equações anteriores até a destruição de si próprios (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação pode ocorrer pela catalização de íons ferro que convertem hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais reativos ($\text{LO}^\bullet$ e $\text{LOO}^\bullet$) que começam uma nova cadeia de reações denominadas de ramificações. A velocidade destas reações depende da valência dos íons ferro, se Fe^{2+} , a reação é mais lenta que se o íon for Fe^{3+} (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Para evitar que os radicais livres atuem de maneira prejudicial às membranas biológicas, os organismos possuem um sistema de defesa antioxidante que envolve desde as defesas internas como, por exemplo, enzimas, até a dieta. Este aspecto está discutido no próximo item.

2.5.3 DEFESA ANTIOXIDANTE

O equilíbrio entre os agentes oxidantes e as defesas antioxidantes é vital para a manutenção do metabolismo celular, uma vez que parte destes agentes são criados endogenamente no metabolismo do O_2 . Além disso, a exposição a xenobióticos e a exposição à radiação ionizante também geram radicais livres prejudiciais a saúde (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Os danos causados pelos radicais livres são incontáveis. Eles têm a capacidade de provocar mutações genéticas, gerando alterações nas funções das enzimas. Podem, ainda, causar a ruptura de membranas plasmáticas levando à morte celular (BARREREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

Um composto antioxidante é aquele que mesmo em baixas concentrações, quando comparado ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação dos mesmos (SIES e STAHL, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Estes antioxidantes podem ser enzimas ou micromoléculas advindas do próprio organismo ou da dieta (BARREREIROS, DAVID e DAVIS, 2006). A TABELA 4 mostra os principais componentes de ambos os tipos de defesa.

TABELA 4 – PRINCIPAIS AGENTES ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E NÃO ENZIMÁTICOS

Não enzimático	Enzimático
α -tocoferol (vitamina E)	Superóxido dismutase (SOD)
β -caroteno	Catalase
Ácido ascórbico (vitamina C)	Glutathione redutase (GSH-Rd)
Flavonóides	Glutathione peroxidase (GSH-Px)
Proteínas do plasma	
Glutathione (GSH)	
Clorofilina	
L-Cisteína	
Curcumina	

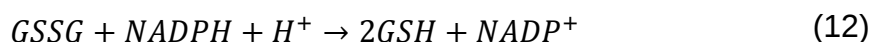
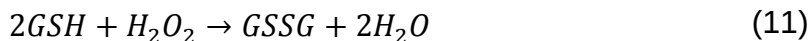
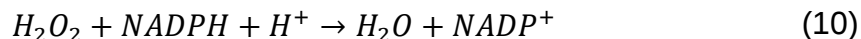
FONTE: Adaptado de BIANCHI E ANTUNES, 1999

As enzimas podem atuar diretamente no agente oxidante ou podem reparar danos causados por eles. Existem três sistemas enzimáticos reconhecidos para a defesa antioxidante. O primeiro envolve as enzimas como a superóxido dismutase (SOD). O radical $O_2^{\bullet-}$ é eliminado naturalmente do organismo, no entanto há a necessidade de colisão de duas moléculas para que isso ocorra. A SOD favorece a dismutação pois promove uma aproximação entre dois $O_2^{\bullet-}$ eliminando esta necessidade de colisão aleatória, eliminando o radical mesmo quando ele se encontra em baixas concentrações. Há dois tipos de SOD, a que possui cobre (Cu^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) como centros redox, está presente no citoplasma e não é afetada pelo estresse oxidativo, e a que possui manganês (Mn^{2+}) como centro redox, está presente na mitocôndria e é afetada pelo estresse oxidativo, uma vez que sua atividade é aumentada em condições de estresse (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

O segundo sistema enzimático de defesa envolve a catalase. O processo no qual ela está envolvida é mais simples, atuando na dismutação do H_2O_2 em O_2 e água (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

O terceiro sistema envolve duas enzimas a glutathione redutase (GSH-Rd) e a glutathione peroxidase (GSH-Px) além da glutathione reduzida (GSH). Este sistema catalisa a dismutação do H_2O_2 em água e O_2 . Após a ação da GSH ao agente oxidante (Equação 10) ocorre a sua oxidação, pela GSH-Px à GSSG formando uma ponte dissulfeto (Equação 11). Em seguida, a GSH é

regenerada pela GSH-Rd, como mostra a equação 12 (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).



Dentre as micromoléculas que atuam como antioxidantes é possível listar as vitaminas, compostos fenólicos, os minerais, a bilirrubina, a ubiquinona e o ácido úrico (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

As vitaminas são um exemplo de compostos adquiridos na dieta que tem potencial ação antioxidante. Elas podem capturar o radical livre, como é o caso da vitamina C, finalizar a propagação das reações dos radicais livres, como a vitamina E, ou ainda podem proteger os lipídeos contra a peroxidação, como a vitamina A (BIANCHI e ANTUNES, 1999; CAMPESTRINI, 2013).

Na indústria, os antioxidantes também são necessários para a preservação de alimentos e cosméticos. Os mais utilizados são o BHT (butil-hidróxi-tolueno), o BHA (butil-hidróxi-anisol) e o propilgalato (FKI, ALLOUCHE, SAYADI, 2004). No entanto tais compostos, quando utilizados em grandes doses e por longos períodos de tempo, tendem a provocar danos à saúde. Por isso, é necessária a busca por novos compostos naturais que não apresentem toxicidade e que tenham a mesma eficácia (CAMPESTRINI, 2013).

Polissacarídeos fúngicos, de algas e vegetais vêm sendo explorados na tentativa de descobrir as possíveis atividades antioxidantes ligadas a essas moléculas. A atividade antioxidante atribuída a estes compostos demonstra que a composição química e o tipo de ligação são determinantes para a atividade (CAMPESTRINI, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E PROCEDÊNCIA

Frutos congelados de *Physalis peruviana* foram adquiridos na Casa do Mirtilo (Porto Alegre, RS, Brasil) em outubro de 2012. O material vegetal foi mantido em pacotes de 1 kg, à temperatura de -20°C até o momento do uso.

3.2 MÉTODOS PARA A OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

O primeiro protocolo de extração foi feito utilizando inativação enzimática prévia (procedimento denominado A) com uma solução de metanol: água (2:1; v/v) sob refluxo por 40 min a 60°C seguido de filtração e secagem em estufa a 60° C por 48h. No segundo protocolo não foi realizada a inativação enzimática [procedimento denominado A (2)], porém, e os frutos foram secos da mesma maneira descrita para o primeiro procedimento.

Posteriormente, os materiais vegetais foram submetidos à deslipidificação com uma solução de tolueno: etanol (2:1; v/v) sob refluxo por 40 min a 60°C. Os frutos foram filtrados e posteriormente secos em capela *overnight*. Seguidamente, foram realizadas três extrações com éter de petróleo (72 h, em ambiente escuro, a 4°C) e três extrações com metanol (72 h, em ambiente escuro, a 4°C). Os extratos foram descartados e o resíduo foi seco em capela *overnight*. Em seguida, foram realizadas duas extrações aquosas por 1 h à temperatura ambiente e uma a 60°C, com posterior filtração e precipitação com três volumes de etanol (95%, v/v). Em seguida, foram feitas extrações cítricas em concentrações crescentes de ácido cítrico de 0,1 – 5% (m/v) e em duas condições de temperatura diferentes (60°C e banho fervente) também seguidas de precipitação e centrifugação. As últimas extrações foram

realizadas com hidróxido de sódio (NaOH) a 2M e 4M por 2 h, ambas na presença de borohidreto de sódio (NaBH₄) (10 mg). Em seguida, as frações foram neutralizadas com ácido acético 50% (v/v), dialisadas em membranas de acetato de celulose (12-14 KDa) por 24 h em sistema fechado e 24 h em sistema aberto o que gerou um precipitado que foi separado por centrifugação a 5000 rpm. As frações solúveis sofreram precipitação com etanol 95% e nova centrifugação a 5000 rpm.

O esquema dos procedimentos para obtenção das frações provenientes das extrações aquosas, cítricas e alcalinas está representado na FIGURA 8.

FRUTOS DESLIPIDIFICADOS

- 3 extrações com éter de petróleo
- 3 extrações com metanol

EXTRAÇÕES AQUOSAS

- 25°C, 1h – 1A e 1A(2)
- 25°C, 1h – 2A e 2A (2)
- 60°C, 1h – 3A e 3A (2)

EXTRAÇÕES CÍTRICAS (Ácido cítrico)

- 0,1%, 60°C, 1h – 4A e 4A(2)
- 0,1%, banho fervente, 1h – 5A e 5A (2)
- 1%, 60°C, 1h – 6A (2)
- 1%, banho fervente, 1h – 7A (2)
- 2,5%, 60°C, 1h – 8A (2)
- 2,5, banho fervente, 1h – 9A (2)
- 5%, 60°C, 1h – 10A (2)
- 5%, banho fervente, 1h – 11A (2)

EXTRAÇÕES ALCALINAS (NaOH)

- 2M, **60°C**, NaBH₄ (10 mg), 2h; neutralização (ácido acético 50%):
 - Precipitado: 12A (2) Hemi A
 - Sobrenadante: 12A (2)Hemi B
- 4M, **60°C**, NaBH₄ (10 mg), 2h; neutralização (ácido acético 50%):
 - Precipitado: 13A (2) Hemi A
 - Sobrenadante: 13A (2) Hemi B

RESÍDUO CONGELADO

FIGURA 8 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.

FONTE: O Autor

NOTA: Extrações aquosas, cítricas e alcalinas. As frações denominadas “A” são as que sofreram inativação enzimática e as denominadas “A (2)” são as que não sofreram inativação enzimática.

3.3 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

3.3.1 Carboidratos Totais

Para a determinação dos carboidratos totais presentes nas frações obtidas foi utilizado o método Fenol - Sulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (1956) e posteriormente adaptado por Fox e Robyt (1991). Neste teste colorimétrico, todos os açúcares, incluindo os metil esterificados e os com grupos redutores livres presentes nas frações são desidratados pelo ácido sulfúrico formando compostos furfurais ou hidroxifurfurais. Estes reagem com o fenol e formando um complexo sensível e estável provido da cor amarela alaranjada, a qual pode ser quantificada por espectrofotometria. A percentagem glicídica total foi estimada a partir de uma curva padrão de D-glucose (4 a 40µg/mL).

As frações foram solubilizadas em água destilada (250µg/mL) e 500µL desta solução foram transferidos para tubos de ensaio em triplicata. Em seguida foram adicionados 500µL de fenol (5% m/v) e agitados lentamente. Finalmente, foram adicionados 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado e agitados da mesma maneira. A absorbância foi lida em leitor de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 490 nm. O branco da amostra constituiu-se de água destilada ao invés de amostra. Tal procedimento foi realizado para todos os ensaios a seguir descritos.

3.3.2 Ácidos Urônicos

Os ácidos urônicos foram determinados pelo método descrito por Filizetti-Cozzi e Carpita (1991). Neste método o uso do metahidroxibifenil

aumenta a capacidade de identificação dos ácidos urônicos por prevenir, não totalmente, o escurecimento da solução que ocorre de maneira natural ao promover o aquecimento de açúcares em solução de ácido sulfúrico concentrado. A porcentagem de ácidos urônicos foi estimada a partir de uma curva padrão feita de ácido D-glucurônico (4 a 40 µg/mL).

As frações foram solubilizadas em água destilada (1mg/mL) e 100µL desta solução foram adicionados em tubos do tipo *eppendorf*. Em seguida, foram adicionados 10µL de sulfamato de potássio (4M; pH 1,6) seguido de agitação em agitador de tubos. Em seguida, foram acrescentados 600µL de tetraborato de sódio (75 mM diluído em ácido sulfúrico concentrado) e novamente agitados em agitador de tubos. Os tubos foram aquecidos em estufa a 100°C por 15 min e posteriormente resfriados em banho de gelo. Para finalizar, 10µL de m-hidroxibifenil (0,15% m/v diluído em hidróxido de sódio 0,5% m/v) foram adicionados e em seguida agitou-se os tubos novamente em agitador de tubos. Após 10 min de repouso, a absorbância foi lida em leitor de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 525 nm. Ao branco do experimento, foram adicionados hidróxido de sódio (0,5% m/v) ao invés de m-hidroxibifenil.

3.3.3 Proteínas Totais

A determinação de proteínas totais das frações foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). O reagente utilizado neste ensaio, o *Comassie Blue* G250 existe em duas colorações diferentes, vermelho e azul. A reação é rápida e estável podendo ser observada pela mudança do vermelho para o azul conforme o reagente se liga a proteínas do meio. A porcentagem proteica foi estimada a partir de uma curva padrão de albumina bovina (4 a 40 µg/mL).

Foram transferidos 100µL das frações (1mg/mL) para tubos do tipo *eppendorf* (em triplicata). A estes tubos foram adicionados 1mL do reagente de proteínas (*Comassie Blue* : etanol 95% : ácido fosfórico 85%). Os reagentes

foram diluídos na proporção 2:1:2 q.s.p. 100mL) e agitados. Este reagente foi diluído com água (1:3) e filtrado antes do uso. A absorbância foi lida em leitor de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 595nm.

3.3.4 Fenóis Totais

Para a dosagem de compostos fenólicos foi utilizado o método descrito por Singleton & Rossi Jr. (1965). Neste método é avaliado o teor de fenóis a partir da reação de oxidação do fenol com o reagente Folin-Ciocalteu, convertendo a cor amarelo-esverdeado em um complexo de cor azulada. A reação é favorecida com o meio alcalino obtido pela adição de carbonato de sódio. O teor de fenóis totais foi calculado a partir de uma curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão (1 a 50µg/mL).

As frações, solubilizadas em água destilada (1mg/mL), foram adicionadas em tubos *eppendorf* (20µL em triplicata). Em seguida, foram acrescentados 100µL de Folin-Ciocalteu (10%, v/v) e agitados. Posteriormente 80µL de carbonato de sódio (7,5%, m/v) foram adicionados aos tubos que foram novamente agitados. Houve o aquecimento em estufa a 50°C por 5 min e a leitura foi feita em leitor de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 760nm.

3.3.5 Dosagem de grupos acetil

Para a determinação de grupos acetil foi utilizado o método descrito por Hestrin (1949). A porcentagem de grupos acetil foi calculada a partir de uma curva padrão de glucose pentacetato (GPA) (100 a 800 µg/mL).

Foi realizado o micro ensaio utilizando-se 125 μ L das frações (10mg/mL diluídos em cloreto de sódio 1%, m/v). Às frações, foram adicionados 250 μ L da mistura hidróxido de sódio: cloreto de hidroxilamina (1:1; NaOH 3,5M; Cloreto de hidroxilamina 2M). As soluções permaneceram em repouso por 1 min. A seguir, foram adicionados 125 μ L de ácido clorídrico: água (1:3) e 125 μ L de cloreto férrico (0,185M). A absorbância foi lida em leitor de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA), a 540nm.

3.4 DOSAGEM DE ARABINOGALACTANA-PROTEÍNAS (AGP)

AGPs foram identificadas e quantificadas pelo método da difusão radial simples (*Single Radial Gel Diffusion*) descrito por Van Holst e Clarke, 1985. Este método é baseado na precipitação específica das AGPs quando em contato com o reagente de Yariv (β -glucosil). O reagente de Yariv (0,02 mg/mL), sintetizado de acordo com a metodologia descrita por Yariv, Rapport e Graf (1962), foi dissolvido em gel de agarose tipo C (1%, m/v) e alocado em placa de vidro. Em seguida foram feitos poços com aproximadamente 3 mm de diâmetro onde foram adicionadas as amostras (5 mg/mL diluídas em cloreto de sódio 1%, m/v) e goma arábica (Sigma Aldrich.CO St. Louis-MO, EUA) em concentrações crescentes, a fim de obter uma curva padrão de AGP com um limite de sensibilidade de 0,25 a 3 μ g de AGP. Os diâmetros dos poços e dos halos formados foram medidos com paquímetro, e elevados ao quadrado e a quantidade de AGP foi calculada em relação à curva padrão comercial de goma arábica.

3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

3.5.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A quantificação da composição monossacarídica neutra das frações foi determinada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS), precedida de hidrólise ácida total (ácido trifluoracético [TFA], 2,5M, 3h, 100°C) e posterior derivatização para obtenção dos acetatos de alditóis, de acordo com a metodologia de microensaio descrita por Pettolino *et al* (2012). As vidrarias utilizada neste procedimento e nos descritos a seguir foram lavadas em solução sulfocrômica antes do uso.

Em tubos de hemólise foram adicionados 100µL das frações (1 mg/mL) e 100µL de TFA 5M. Os tubos foram devidamente tampados e mantidos em estufa (100°C) por 3 h. Em seguida, houve a secagem do conteúdo em nitrogênio para remover totalmente o ácido. As frações hidrolisadas foram submetidas à redução com 50µL de hidróxido de amônio (2M) e 50µL de borohidreto de sódio (1M diluído em hidróxido de amônio 2M) por 2h30min. Ácido acético (20µL) foi adicionado e o conteúdo foi novamente seco em nitrogênio. Realizaram-se duas lavagens do hidrolisado com 250µL de ácido acético (5%, v/v, diluído em metanol) e duas vezes com metanol para a retirada do excesso de boratos. Em seguida procedeu-se a acetilação com a adição de 250µL de anidrido acético a 100°C por 2h30min. Para interromper a reação foi adicionado 1mL de água destilada ao material. Uma alíquota de clorofórmio (1mL) foi adicionada afim de que os acetatos de alditóis fossem solubilizados. O material foi submetido a três lavagens com 1mL de água destilada para que os sais de sódio e resíduos fossem eliminados.

O clorofórmio foi evaporado em nitrogênio e o material foi analisado em GC-MS (cromatógrafo gasoso Varian, modelo 3800 acoplado a espectrômetro de massas Saturn 2000R, Palo Alto, CA, EUA). A injeção da amostra foi a 50°C com aumento de 40°C/min (até no máximo 220°C), com a utilização de coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm – J & M Scientific, Folsom, CA, EUA) e hélio

como gás de arraste. As porcentagens dos monossacarídeos foram calculadas a partir da comparação dos tempos de retenção e espectro de massas dos padrões de monossacarídeos (ramnose, fucose, xilose, arabinose, glucose, galactose e manose).

3.5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para determinar de maneira qualitativa a composição monossacarídica das amostras, foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD). Para esta análise, as amostras (5 mg/mL) sofreram hidrólise com TFA 5M por 8 h a 100°C. Após evaporação do ácido, as amostras foram ressuspensas em água destilada, e em seguida, aplicadas em cromatoplasas Merck 60 F254 recobertas com sílica gel, utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila:n-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v).

Cubas de vidro previamente saturadas com a fase móvel foram utilizadas para a realização da corrida cromatográfica ascendente. Após a corrida cromatográfica, os açúcares foram visualizados com solução de orcinol 0,5% (m/v) em etanol/H₂SO₄ concentrado, a 100°C, até o aparecimento da cor violeta. O perfil monossacarídico foi analisado através da comparação dos tempos de retenção observados para as amostras com os tempos de retenção de padrões de monossacarídeos.

3.5.3 Análise por cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC) acoplada a detectores de índice de refração (IR) e espalhamento de luz (MALLS)

As homogeneidades das frações foram feitas através de cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC – equipamento WATERS,

Milford, MA, EUA) acoplado ao detector de índice de refração diferencial (RI – equipamento WATERS, modelo 2410, Milford, MA, EUA). As frações (2 mg/mL) foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio (0,1M) contendo azida sódica (NaN_3) 0,02% (m/v) e posteriormente filtradas em membranas de 0,22 μm (MILLIPORE, Billerica, MA, EUA). A mesma solução utilizada para solubilizar as frações foi utilizada como eluente e todas as análises foram realizadas a 25° C com um fluxo de 0,6 mL/min. Os cromatogramas foram analisados no programa ASTRA (WYATT TECHNOLOGY).

3.6 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS E ESPECTROMÉTRICAS

3.6.1 Espectrometria de Infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR)

As frações a serem testadas foram liofilizadas para a retirada de toda a umidade antes de ser realizada a análise por FT-IR com espectrômetro da marca BRUKER, modelo Vertex 70 (Bruker; Karlsruhe - Alemanha), equipado com *beam splitter* de KBr-broadband, detector RT-DLaTGS, fonte de IR Mir-Globar. Em seguida as frações (~2mg) foram misturadas e prensadas com brometo de potássio (KBr) até que se formasse uma pastilha translúcida. As pastilhas foram posicionadas no equipamento para a leitura. Os picos de absorção indicam a presença de tipos específicos de ligação, melhorando a caracterização da estrutura química.

3.6.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ^1H e HSQC

Para a realização dos espectros de ressonância nuclear magnética, foi utilizado espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance (Bruker; Karlsruhe - Alemanha), em tubos de 5 mm de diâmetro, a 70°C. As amostras foram dissolvidas em água deuterada (D_2O), em uma concentração de aproximadamente 20mg/mL e foram realizadas três trocas. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ), baseando-se no deslocamento da acetona (2,22 ppm) (padrão externo).

3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.7.1 Ensaios imunomoduladores “*in vitro*” utilizando cultura de macrófagos peritoneais

Os procedimentos descritos abaixo foram aprovados pelo Comitê de Experimentação e Ética Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, segundo protocolo 693 do processo 23075.004371/2013-15 (ANEXO).

3.7.1.1 Preparo dos materiais e soluções

Todos os materiais utilizados nos ensaios imunomoduladores, tais como, tubos com rosca, ponteiros, viais e barcas foram embalados e esterilizados em autoclave, a 1 atm e 120 °C por 30 min (Sercon, modelo HA; São Paulo, SP - Brasil). Após esterilização, os materiais foram secos em estufa a 50 °C. As soluções, tais como tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*—PBS;

40,5 mmol/L de Na_2HPO_4 , 680 mmol/L de NaCl e 7,3 mmol/L de KH_2PO_4 , pH 7,4), água ultra pura e solução de hemólise, também passaram por autoclavagem.

A fração 1A (5mg/mL) foi solubilizada em água destilada contendo sulfato de polimixina B (Inlab, São Paulo, SP) (50 ng/mL) para evitar a contaminação com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). A solução foi esterilizada por ultrafiltração positiva, sob pressão, utilizando-se membranas de acetato-nitrato de celulose, com poros de 0,22 μm (Millipore, Billerica, MA, EUA). Em seguida foram feitas diluições seriadas de 0,32 a 1280 $\mu\text{g/mL}$ em meio Eagle estéril (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). No entanto, somente as concentrações entre 10, 20, 40, 80, 160 e 320 $\mu\text{g/mL}$ foram utilizadas nos testes de viabilidade (MTT) e produção de NO^+ . No teste de retenção de lisossomos, foram utilizadas as concentrações 5, 20 e 80 $\mu\text{g/mL}$. Nos testes com as interleucinas, foram utilizadas as concentrações 5, 20 e 80 $\mu\text{g/mL}$. Para a morfologia foram utilizadas as concentrações 0,32, 1,25, 5, 20, 80, 160, 320 e 640 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram mantidas a 4°C até o momento do uso.

3.7.1.2 Obtenção dos macrófagos peritoneais

Foram utilizados camundongos suíços (SWISS – *Mus musculus*) fêmeas, pesando aproximadamente 45 g e com três meses de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em ambiente claro/escuro 12/12 e temperaturas constantes. A dieta foi composta de ração Nuvilab (Lapa - São Paulo, Brasil) e água à vontade. Os procedimentos pelos quais os camundongos foram submetidos estão representados na FIGURA 10.

Após a eutanásia dos animais (20 animais), houve a limpeza da região abdominal dos animais com álcool etílico aquoso a 70% (v/v) e exposição da membrana peritoneal. Houve a injeção de 10 mL de PBS estéril na cavidade peritoneal com o auxílio de seringas e agulhas estéreis. Após massagem vigorosa, o lavado peritoneal foi recolhido e realocado em tubos de rosca estéreis. Em seguida foi realizada a centrifugação (MPW MedInstruments,

modelo MPW-350R, Warsaw, Polônia) por 15 min a 2500 rpm (4 °C) do lavado para a precipitação das células. A solução foi ressuspensa em solução de hemólise (17mM de TRIS, 0,585 g cloreto de sódio e 0,475 g de cloreto de magnésio; q.s.p.1 L; pH 7,4) para eliminar a presença de possíveis hemácias e novamente centrifugada nas mesmas condições descritas. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio Eagle estéril contendo 5% de soro fetal bovino [(v/v); Laborclin, Curitiba, PR, Brasil]. Houve a contagem de células em câmara de Neubauer com o uso de microscópio invertido para a avaliação da viabilidade das células pelo método azul de Tripán (PHILLIPS, 1973).

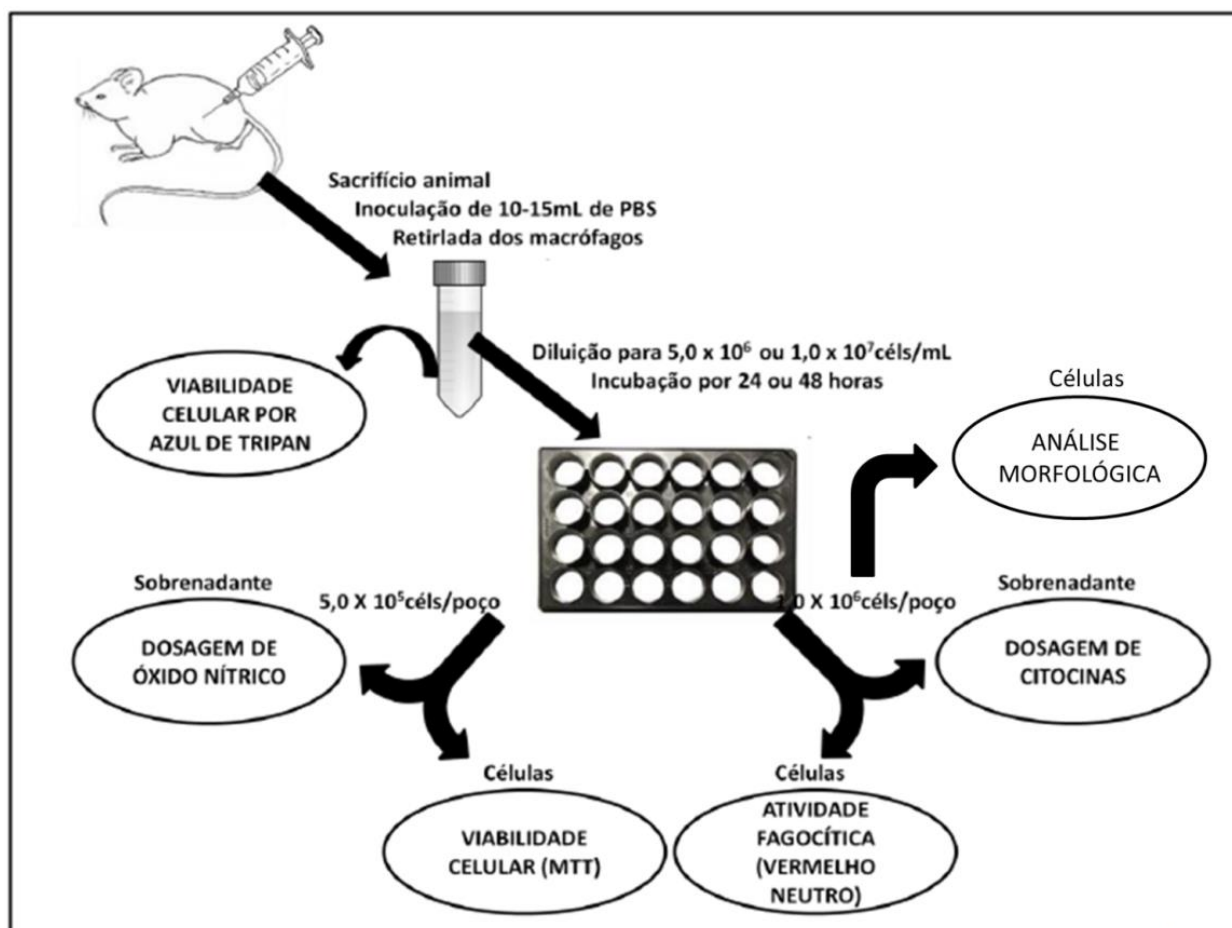


FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DE PROCEDIMENTOS DE OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL

FONTE: Adaptado de YAMASSAKI, 2013.

NOTA: Processamento do lavado peritoneal de camundongos suíços (SWISS)

O lavado peritoneal (na concentração final de 5×10^5 células/mL ou 1×10^6 células/mL) foi adicionado a poços de placas de cultura estéreis (Techno Plasticproducts AG® - TPP- Trasadingen - Suíça) que foram incubadas em estufa (incubadora Thermo Scientific, San Jose, CA – EUA) por 1h, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ para aderência. A monocamada de células formada foi lavada com PBS estéril, pH 7,4, a 37°C duas vezes para a remoção das células que não aderiram. Em seguida foi adicionado o meio de cultura e as frações conforme a metodologia desejada.

3.7.1.3 Determinação da viabilidade pelo método do Azul de Tripán

Para determinar a viabilidade dos macrófagos antes dos ensaios foi utilizado o método do azul de Tripán (PHILLIPS, 1973). Este corante é considerado um corante de exclusão, uma vez que tem a capacidade de penetrar somente em células com a membrana não intacta, portanto inviáveis. A solução de Tripán foi preparada a 0,4% (m/v) em PBS, em seguida, foi feita a diluição de 1:10 (células : azul de Tripán) para a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. A porcentagem de células viáveis foi calculada através da seguinte relação: % células viáveis = $\frac{\text{n}^\circ \text{ de células não coradas}}{\text{n}^\circ \text{ de células totais}} \times 100$. Neste trabalho foram utilizadas somente as suspensões celulares com viabilidade acima de 95%.

3.7.1.4 Determinação da viabilidade pelo método do MTT

Para a determinação da viabilidade dos macrófagos após a ação da amostra foi utilizado o método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio; Sigma-Aldrich, StLouis-MO, EUA) descrito por Reilly *et al.* (1998). Este método tem como princípio a redução do sal tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis e metabolicamente ativas produzindo cristais de formazan no interior destas células.

Em placas de cultivo de 96 poços, as células (5×10^5 células/poço) foram incubadas na presença ou ausência (controle negativo) da amostra nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160 e 320 $\mu\text{g/mL}$ e LPS (50 ng/mL - controle positivo) por 24h e 48h, a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO_2 . Após o tempo de incubação, o meio é utilizado para a dosagem de óxido nítrico produzido e as células são utilizadas para a viabilidade. Aos poços são adicionados 180 μL de meio Eagle e 20 μL de solução de MTT a 5 mg/mL tornando a concentração final de MTT de 500 $\mu\text{g/mL}$ em cada poço. As placas foram incubadas novamente nas mesmas condições descritas por 3h. As placas são lavadas com PBS duas vezes para a remoção do excesso de MTT no meio e os cristais de formazan foram solubilizados com dimetil sulfoxido (DMSO) produzindo a cor violeta. A absorbância foi lida a 550 nm e a porcentagem foi calculada considerando a absorbância do controle negativo (macrófagos crescidos na ausência de soluções-teste) como 100% de viabilidade.

3.7.1.5 Produção de óxido nítrico

A produção de NO^* pelos macrófagos após a ação da amostra foi determinada de maneira indireta pela dosagem de nitrito, um produto estável da reação de produção do NO^* , presente no sobrenadante das culturas.

Em placas de 96 poços foram adicionadas 5×10^5 células/poço na presença e ausência (controle negativo) da amostra nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160 e 320 $\mu\text{g/mL}$ e LPS (50 ng/mL - controle positivo) por 48h, a 37°C e em atmosfera com 5% de CO_2 . Após a incubação, 100 μL do sobrenadante são recolhidos em uma segunda placa de 96 poços e a estes são adicionados 100 μL do Reagente de Griess [solução de sulfanilamida a 1% (m/v) (Sigma-Aldrich, StLouis-MO, EUA) e solução de naftilenodiamida a 0,1% (m/v) (Sigma-Aldrich, StLouis-MO, EUA), na proporção de 1:1, ambas em ácido fosfórico 2,5% (v/v)]. Este reagente, na presença de nitrito, produz um composto de cor lilás. A absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA), em 540 nm . A concentração de nitrito, presente no sobrenadante das

amostras, foi calculada em relação à curva padrão, utilizando como padrão nitrito de sódio diluído em meio de cultura, em concentrações de 10µM a 100µM (GREEN *et al.*, 1982). Os resultados foram expressos como quantidade de nitrito produzido em µM/5x10⁵ células.

3.7.1.6 Retenção de lisossomos

Para a avaliação da retenção de lisossomos foram utilizadas placas de 24 poços contendo 1x10⁶ células/poço, tratados na presença e ausência (controle negativo) das amostras nas concentrações de 5, 20 e 80 µg/mL durante 48 h. Após remoção do meio, 180 µL de meio Eagle e 20 µL de vermelho neutro estéril a 2% (m/v) foram adicionados. A placa foi novamente incubada a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. (PIPE *et al.*, 1995). Após 30 min, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com PBS pH 7,4. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de lise contendo ácido acético glacial 1% e metanol 50%(v/v) e a absorbância lida a 550 nm em espectrofotômetro de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA). Os resultados foram expressos em percentagens, considerando a absorbância do controle negativo como taxa de retenção de lisossomos basal.

3.7.1.7 Dosagem de interleucinas

Para a dosagem de interleucinas produzidas pelas células após os tempos de tratamento, utilizou-se o método ELISA. Primeiramente, 1x10⁶ células/poço foram tratadas durante 24h em placas de 24 poços, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, com as amostras nas concentrações de 5, 20, 80 e 160 µg/mL. Em seguida, os sobrenadantes (1mL) foram centrifugados (2000 rpm, por 5 min), separados em tubos tipo *ependorfs* estéreis identificados e estocados a -80°C até utilização. Cada poço da placa de cultura originou 4 tubos tipo *ependorfs* contendo o mesmo sobrenadante, sendo cada um

destinado à dosagem de uma interleucina em duplicata: IL-1 β , IL-6, IL-10 ou TNF- α .

As dosagens foram determinadas pelo método ELISA, utilizando kits específicos para cada citocina (eBioscience, San Diego, CA, EUA). Os reagentes utilizados foram preparados de acordo com as especificações do fabricante. Para este ensaio, placas de poliestireno (“high binding protein” – catálogo nº 9018, Corning, Lowell, MA, EUA) com 96 poços, de fundo chato, foram sensibilizadas durante 18h a 4°C, com 100 μ L/poço do anticorpo de captura para cada citocina. As placas foram lavadas 5 vezes com 250 μ L/poço de tampão de lavagem em lavadora de placas (marca BioTek, Winooski, EUA), e em seguida, os poços foram bloqueados com 200 μ L/poço da solução de diluição. Após 1h de incubação a temperatura ambiente e 5 ciclos de lavagem das placas, 100 μ L/poço das amostras e padrões específicos para cada citocina foram adicionados, e as placas novamente incubadas por 2h à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas 5 vezes, e o anticorpo de detecção foi adicionado (100 μ L/poço). Passada 1 h de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes, 100 μ L/poço da enzima Avidina-HRP foram adicionados e as placas novamente incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Após 7 lavagens, 100 μ L/poço do substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados, e incubados no escuro, por 15 min à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com 50 μ L de H₂SO₄ a 2 N e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 450 nm.

A curva padrão foi realizada utilizando oito concentrações do padrão específico para cada citocina testada (IL-1 β , IL-6, IL-10 ou TNF- α). Os resultados foram expressos como quantidade de citocinas produzidas em pg/mL/1x10⁶ células.

3.7.1.8 Análises morfológicas

As análises morfológicas foram feitas através da montagem de lâminas. Em placas de 24 poços foram colocadas uma lamínula em cada poço. Em

seguida foram adicionadas 1×10^6 células/poço que após o tempo de adesão receberam os tratamentos com as amostras nas concentrações 0,32, 1, 25, 5, 20, 80, 160, 320 e 640 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram mantidas durante 24h, a 37 °C e atmosfera com 5% de CO_2 . Após o tempo de incubação, as lamínulas foram retiradas das placas e fixadas com solução de Bouin, durante 5 min, à temperatura ambiente. Em seguida, houve a coloração das células com Giemsa (cedido pelo Sr. Herculano S. Reis Filho, do Laboratório de Histotecnologia, Departamento de Biologia Celular, UFPR). Posteriormente, as células foram desidratadas com acetona e diafanizadas com xilol. A montagem das lâminas permanentes foi feita com resina Entelan. A análise morfológica dos macrófagos e as fotomicrografias foram realizadas no Departamento de Botânica da UFPR, utilizando microscópio Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - Japão).

3.7.2 Ensaio Antioxidantes

3.7.2.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

O método descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) tem como objetivo quantificar a oxidação de componentes lipofílicos e hidrofílicos, sendo possível identificar a capacidade antioxidante total da amostra.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 3mL do reativo, composto por fosfato de sódio monobásico (28mM, 28 mL) molibdato de amônio (4mM, 12 mL), ácido sulfúrico (0,6M, 20 mL) e água (40 mL) e 300 μL das amostras (1 mg/mL). Os tubos foram tampados e aquecidos a 95° C por 90 min. Após o resfriamento, a leitura da absorbância foi feita em leitor de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 695 nm. A capacidade antioxidante da amostra foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%) em relação à absorbância da vitamina C (200 $\mu\text{g/mL}$ em metanol), utilizada como padrão antioxidante para este ensaio.

3.7.2.2 Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – *Thiobarbituric Acid Reactive Species*)

Neste ensaio, avalia-se a peroxidação lipídica por meio da dosagem dos seus produtos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) gerando a coloração avermelhada (JIANG *et al.*, 2005).

Em tubos de rosca foram adicionados 100 µL da amostra (1 mg/mL) ou do hidroxibutil-tolueno (BHT – 1 mg/mL, m/v), 400 µL de água destilada, 500 µL de gema de ovo (5%, m/v, em dodecilsulfato de sódio – SDS a 0,55%, v/v), 50 µL de 2,2-azo-bis-ácido (ABAP – 0,07 mol/L), 1,5 mL de ácido acético (20%, v/v) e 1,5 mL de TBA (0,4% m/v, em SDS – 0,55%, m/v). Os tubos foram fechados e aquecidos a 95°C por 60 min. Após o resfriamento foram acrescentados 1,5 mL de butanol, agitados em agitador de tubos e deixados em repouso por 10 min. Para a total separação das fases formadas, houve a centrifugação (8000 rpm por 10 min). A absorbância foi lida na fase butanólica e, leitor de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 532 nm. O índice antioxidante da amostra (IA%) foi determinado de acordo com a equação 13.

$$IA \% = 1 - \left(\frac{abs amostra}{abs branco} \right) \times 100 \quad (13)$$

3.7.2.3 Quelação de ferro

Este ensaio tem como objetivo verificar a capacidade da amostra em captar o íon ferroso da solução (DECKER e WELCH, 1990).

Em tubos de ensaio previamente lavados em ácido clorídrico (0,1M) foram adicionados 500 µL da amostra (1 mg/mL), 1,85 mL de água ultra pura e 50 µL de cloreto ferroso. Os tubos foram agitados em agitador de tubos e deixados em repouso por 10 min. Foram acrescentados 100 µL de FerroZine

(Sigma – Aldrich, Saint Louis, EUA) e os tubos foram incubados a 37 °C por 10 min. Após o resfriamento, a leitura da absorbância foi lida em leitor de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 562 nm. Como padrão, utilizou-se EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético - *ethylenediamine tetraacetic acid*) (50 µg/mL). Quanto maior a absorbância encontrada, menor é a atividade da amostra, uma vez que o FerroZine tem como função se ligar aos íons ferrosos sobressalentes da solução. A porcentagem da atividade foi calculada de acordo com a equação 14.

$$PA\% = \frac{100 \times \text{abs do EDTA}}{\text{abs da amostra}} \quad (14)$$

3.7.3 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos nos ensaios biológicos com macrófagos foram repetidos pelo menos duas vezes em dias alternados e expressos como média de triplicatas ± desvio padrão ($M \pm dp$), submetidos ao teste de Tukey, considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância $p \leq 0,05$ (VIEIRA, 1991).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos inteiros e congelados de *P. peruviana* foram submetidos a dois métodos de extração. O primeiro método, denominado de “A”, consistiu-se no descongelamento dos frutos seguido do tratamento com metanol : água para a inativação das enzimas presentes no fruto. O segundo método, denominado de “A (2)”, a inativação enzimática não foi realizada com o objetivo de verificar a influência da não inativação enzimática no perfil das frações polissacarídicas.

No primeiro método foi utilizado 1 Kg do fruto descongelado para a inativação enzimática. Após a inativação, os frutos foram secos em estufa a 60° C por 48 h, o material apresentou um rendimento de 8,3 % (83,6 g) em relação ao fruto fresco. No método A (2), os frutos descongelados (1 Kg) foram secos nas mesmas condições já descritas para o método A, resultando em um material com rendimento de 10,6% em relação ao fruto fresco.

A deslipidificação dos frutos foi realizada em ambos os métodos. Segundo Meyer (1960), frutas e verduras são fontes de lipídeos, embora grande parte destes alimentos possuam entre 0,1 e 1% de lipídeos totais denominados de gorduras. Em experimentos prévios realizados em nosso laboratório, há a presença de metabólitos secundários no fruto de *P. peruviana* que são eliminados pela deslipidificação e pelas extrações sequenciais com éter de petróleo e metanol.

Em seguida, em ambos os métodos, os frutos foram triturados em processador de alimentos e foram realizadas três extrações sequenciais com éter de petróleo seguidas de três extrações com metanol. Após secagem *overnight* em capela, os frutos foram pesados. O método A teve um rendimento de 79,52% em relação ao material após inativação enzimática e deslipidificação e o método A (2) teve um rendimento de 80 % em relação ao material deslipidificado.

O método sequencial empregado teve como objetivo o fracionamento de polissacarídeos considerando a solubilidade em solventes diferentes e em temperaturas diferentes. Segundo Voragen e colaboradores (1995), a água, utilizada nas primeiras extrações é utilizada para solubilizar pectinas altamente esterificadas. Em seguida, foram realizadas extrações quentes com ácido cítrico diluído para a extração de pectinas ancoradas firmemente à parede celular (VORANGEN *et al.*, 1995). As extrações alcalinas foram feitas com o objetivo de extrair hemiceluloses presentes no material vegetal (VRIESMAN, 2008).

4.1 EXTRAÇÕES E RENDIMENTOS

Ao final das metodologias de extração, foram obtidas 20 frações das quais 5 correspondem ao método com inativação enzimática (A) e 15 àquelas obtidas pelo método sem inativação enzimática [A (2)]. Os rendimentos obtidos das frações estudadas estão expressos na TABELA 5.

Dentre as extrações aquosas feitas pelo método A encontram-se as frações 1A, 2A e 3A com rendimentos de 1%, 0,2% e 0,6% respectivamente. Como as três extrações foram sequenciais, o rendimento total relativo foi de 1,8%. Este valor é o mesmo encontrado para o rendimento total relativo das frações aquosas feitas pelo método A (2), o que demonstra que o método de extração não interfere no rendimento total das frações aquosas. No entanto, no método A (2) os rendimentos encontram-se mais distribuídos quando comparados com o método A, com rendimentos de 0,7% [1A (2)], 0,3% [2A (2)] e 0,8% [3A (2)].

Em relação às extrações cítricas, no método A, foram realizadas somente extrações com ácido cítrico a 0,1% gerando as frações 4A e 5A, com rendimento de 0,3% e 0,7% respectivamente. No método A (2), as extrações cítricas a 0,1% tiveram um rendimento de 0,5% para a fração 4A (2) e 0,1% para a fração 5A (2). Isto demonstra que neste tipo extração, a inativação enzimática faz com que o rendimento seja maior, uma vez que no método A houve um rendimento total relativo de 1% e no método A (2) o rendimento total relativo foi de 0,6%.

TABELA 5 – FRAÇÕES, MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E RENDIMENTOS

TABELA 3 - FRAÇÕES, MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E RENDIMENTOS				
Fração	Método de extração	Condições de extração		Rendimentos*
1A	Com inativação enzimática	Aquosa a frio (25 °C)		1
2A				0,2
3A		Aquosa a quente (60° C)		0,6
4A		Cítrica 0,1 %	60° C	0,3
5A			Banho fervente	0,7
Rendimento Total				2,8
1A (2)	Sem inativação enzimática	Aquosa a frio		0,7
2A (2)				0,3
3A (2)		Aquosa a quente (60 °C)		0,8
4A (2)		Cítrica 0,1 %	60 °C	0,5
5A (2)			Banho fervente	0,1
6A (2)		Cítrica 1 %	60 °C	0,3
7A (2)			Banho fervente	0,3
8A (2)		Cítrica 2,5 %	60 °C	0,2
9A (2)			Banho fervente	0,2
10A (2)		Cítrica 5 %	60 °C	1
11A (2)			Banho fervente	0,2
12A (2) Hemi A		Alcalina 2 M	Precipitado do centrifugado	1
12A (2) Hemi B			Sobrenadante precipitado com etanol	1
13A (2) Hemi A		Alcalina 4 M	Precipitado do centrifugado	0,6
13A (2) Hemi B			Sobrenadante precipitado com etanol	0,7
Rendimento Total				6,73

FONTE: O autor

NOTA: *g% após deslipidificação e extrações com éter de petróleo e metanol

Nas duas extrações cítricas seguintes a 1%, os rendimentos para as duas frações [6A (2) e 7A (2)] foram as mesmas, sendo o rendimento total relativo de 0,6%. Para as extrações cítricas a 2,5% [8A (2) e 9A (2)], o mesmo pode ser observado, no entanto o rendimento total relativo foi de 0,4%. Na terceira extração cítrica houve uma diferença significativa de rendimento entre as duas frações sendo a fração 10A (2) a de maior rendimento com 1% e a 11A (2) com 0,2%.

Em relação às extrações hemicelulósicas, os rendimentos foram semelhantes tanto para a extração a 2M, com rendimento de 1% para as duas frações [12A (2) Hemi A e 12A (2) Hemi B], como para a extração a 4M, com rendimento de 0,6% para a fração 13A (2) Hemi A e 0,7% para a fração 13A (2)

Hemi B. No entanto, quando se compara os rendimentos totais relativos, a extração a 2M proporciona um maior rendimento (2%) que a extração a 4M (1,2%).

4.2HOMOGENEIDADE

A homogeneidade das frações foi determinada por cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência acoplada ao detector de índice de refração diferencial e de espalhamento de luz (*light scattering* – MALLS) (*High Pressure Steric Exclusion Chromatography - Refractive Index - HPSEC – RI-MALLS*). Os perfis cromatográficos das 20 frações estão mostrados nas FIGURAS 10, 11 e 12. Segundo Salvalaggio e colaboradores (2010), o índice de refração (*Index Refractive – RI*), é o detector responsável por determinar a concentração dos compostos de várias massas molares em uma solução enquanto que o espalhamento de luz (*Light scattering – LS*) indica a massa molar dos compostos. Os compostos que são eluídos primeiro são aqueles que possuem massa molar maior, seguidos da eluição de compostos com massa molar menor (PETKOWICZ *et al.*, 1999).

Na FIGURA 10 estão representados os perfis de homogeneidade das frações aquosas a 25 °C e a 60 °C dos dois métodos de extração. Observando os perfis de LS das frações de ambos os métodos, há a presença de moléculas eluídas em 40 min, indicando a presença de compostos de alta massa molar em todas as frações. No entanto, o RI das frações do método A indica, a presença de 4picos, correspondendo a famílias de moléculas com massa molecular diferentes, demonstrando a heterogeneidade das frações (PETKOWICZ, *et al.*, 1999). É importante destacar que picos com perfil de eluição maior que 60 min não serão considerados na análise de homogeneidade das frações em estudo. Uma vez que compostos que são eluídos após 60 min de análise nas condições realizadas no presente estudo, são característicos de compostos de massa molar muito baixa (≤ 400 g/mol), como dissacarídeos, monossacarídeos ou sais (VRIESMANN *et al.*, 2009).

Na FIGURA 11 estão representados os perfis de homogeneidade das frações cítricas dos dois métodos de extração. De acordo com o perfil obtido por LS das frações 4A, 5A, 5A (2), 6A (2), 7A (2), 8A (2) e 9A (2) há a presença de apenas um pico predominante de uma família de compostos de alta massa molar eluídos em aproximadamente 40 min. Diferentemente, para as duas últimas frações cítricas, 10A (2) e 11A (2), o espalhamento de luz demonstra a presença de duas famílias de moléculas de tamanhos diferentes. Para estas frações, há a presença de compostos com alta massa molar que são eluídos em 40 min. e uma família de compostos de massa um pouco menor que a anterior, eluída em aproximadamente 50 min.

Levando em consideração o perfil obtido pelo RI das frações é possível observar que, diferente das frações aquosas do método A, todas as frações cítricas, com exceção das frações, 9A (2), 10A (2) e 11A (2), apresentaram uma única família de compostos de alta massa molar. As frações 9A (2) 10A (2) e 11A (2), apresentaram duas famílias de compostos, sendo uma eluída em aproximadamente 50 min e outra eluída em 60 min. Deste modo, é possível perceber que, quanto maior a concentração de ácido cítrico há uma maior extração de compostos de tamanhos diferentes, uma vez que as três últimas frações cítricas (com 2,5 % e 5 % de ácido cítrico) apresentam duas famílias de compostos enquanto as frações cítricas anteriores apresentam somente uma família de compostos.

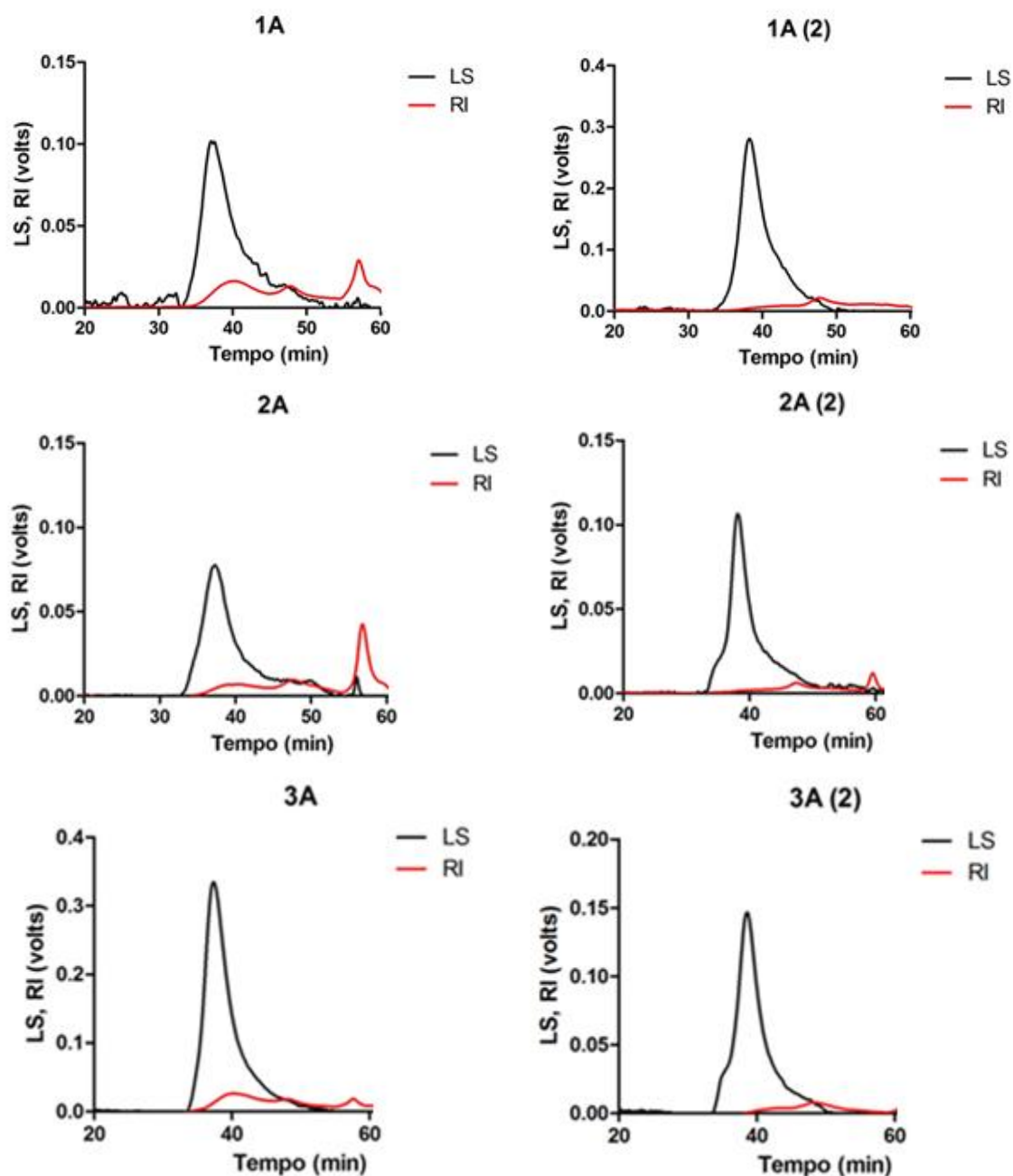


FIGURA10 – PERFIS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEACÃO COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO E ESPALHAMENTO DE LUZ (HPSEC-RI-MALLS) DAS FRAÇÕES AQUOSAS DE *Physalis peruviana* OBTIDAS PELOS DOIS MÉTODOS

NOTA: Nos eixos y estão representados o espalhamento de luz (*light scattering* – LS) representados pela linha preta e o índice de refração (*index refractive* - RI) representados pela linha vermelha. No eixo x estão representados os tempos de retenção em minutos.

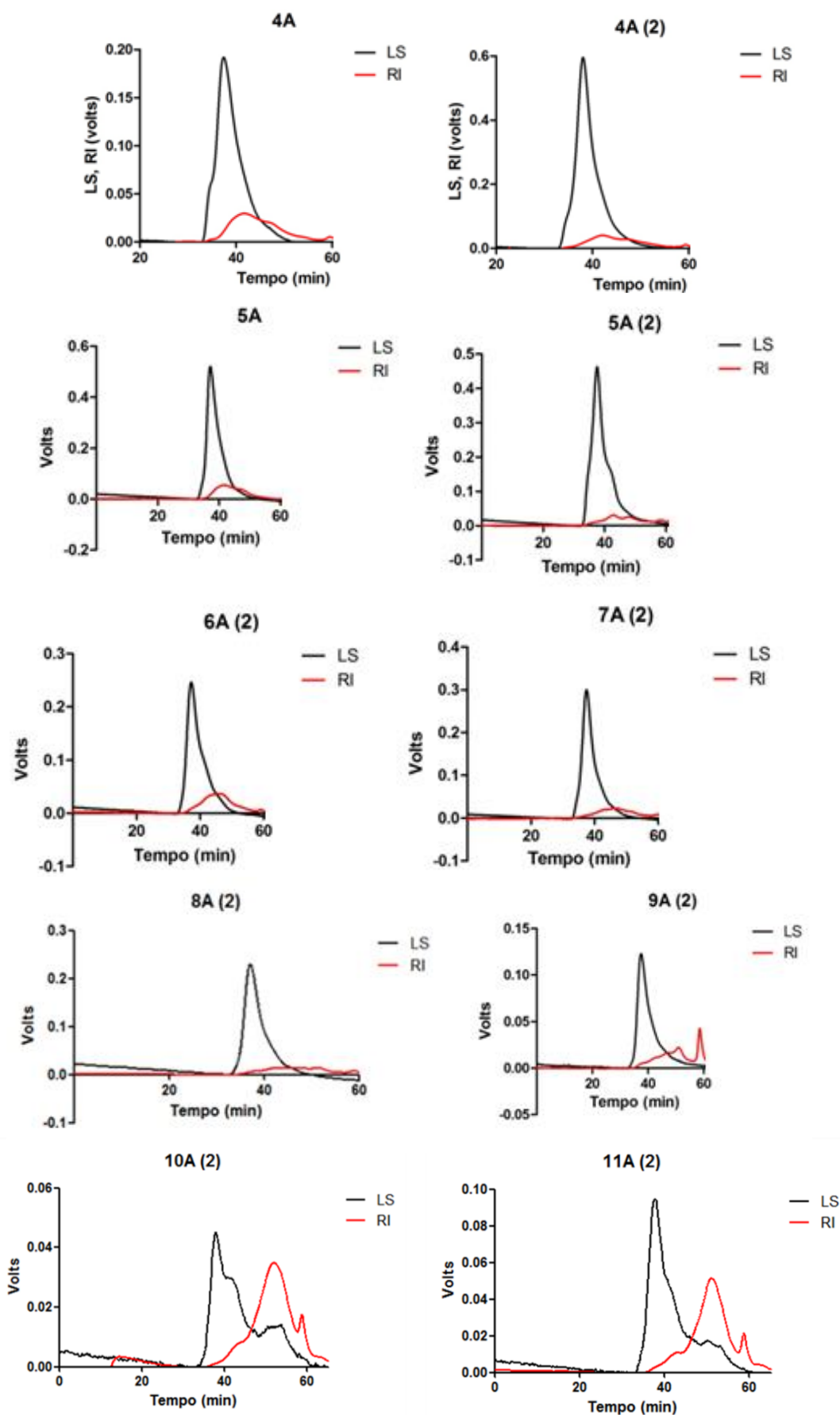


FIGURA 11 – PERFIS CROMATOGRÁFICOS E ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES CÍTRICAS DE *Physalis peruviana* OBTIDAS PELOS DOIS MÉTODOS.

NOTA: Nos eixos y estão representados o espalhamento de luz (*light scattering* – LS representados pela linha preta e o índice de refração (*index refractive* - RI) representados pela linha vermelha. No eixo x estão representados os tempos de retenção em minutos.

A análise da homogeneidade das frações hemicelulósicas está representada na FIGURA 12. Da mesma forma que as frações anteriores, as frações hemicelulósicas também apresentam em seus perfis de LS a presença de um composto de alta massa molar eluído em 40 min. No caso da fração 12A (2) A, observa-se mais evidentemente que há a presença de uma segunda família eluída em aproximadamente 50 min. Em relação ao RI, as frações, com exceção da 12A (2)A apresentam uma única família de compostos de alta massa molar eluídas em aproximadamente 50 min.

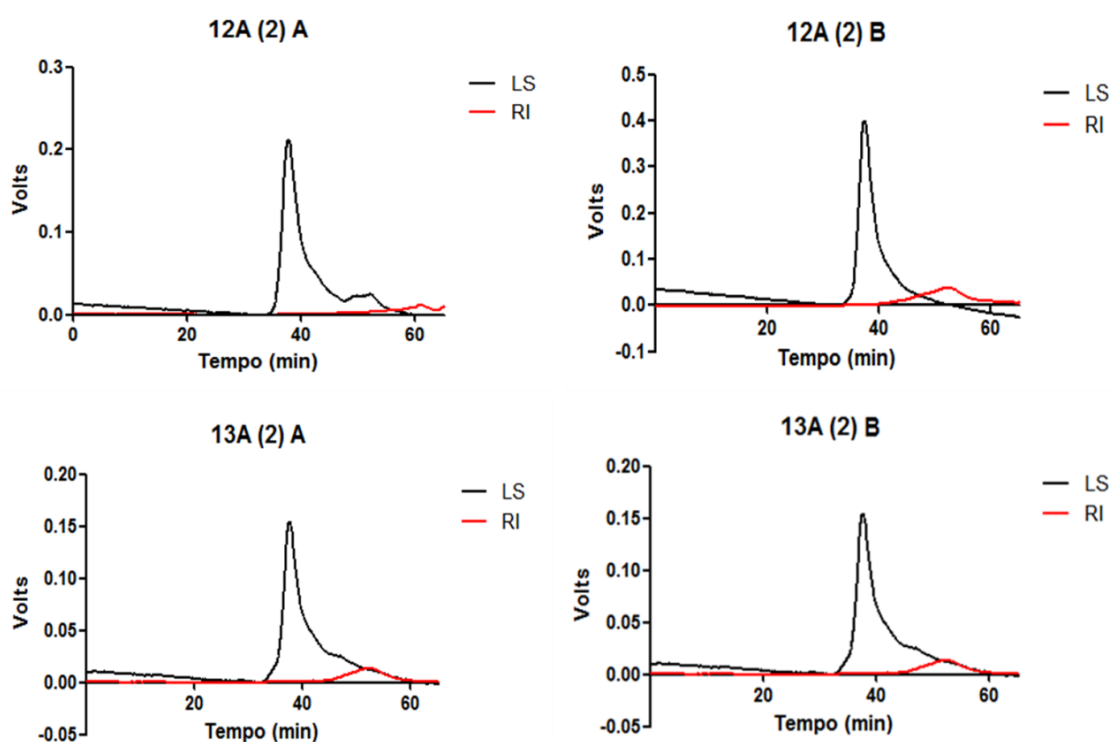


FIGURA 12 – PERFIS CROMATOGRÁFICOS E ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES HEMICELULÓSICAS DE *Physalis peruviana* OBTIDAS PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO A (2).

NOTA: Nos eixos y estão representados as voltagens e volts do espalhamento de luz (*light scattering* – LS) representados pela linha preta e o índice de refração (*index refractive* - RI) representados pela linha vermelha. No eixo x estão representados os tempos de retenção em minutos.

4.3 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

As frações obtidas foram submetidas aos ensaios para determinação do conteúdo de carboidratos totais, proteínas totais, compostos fenólicos totais e grupamentos acetil totais utilizando métodos colorimétricos (TABELA 6).

TABELA 6 – ANÁLISES DAS DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DOS FRUTOS DE *Physalis peruviana*

Frações	Carboidratos Totais	Proteínas Totais	Compostos Fenólicos Totais	Grupamentos Acetil Totais
1A	30	0,5	0,4	2,1
2A	8	0,9	0,5	1,6
3A	30	1,5	1	1,9
4A	57	2,4	0,5	1,3
5A	40	1	0,9	1,9
1A (2)	34	2,1	1,4	3,6
2A (2)	37	5,5	1,9	2
3A (2)	40	5,6	1,3	1,4
4A (2)	34	3,2	0,6	2,4
5A (2)	47	5,5	1,7	4,9
6A (2)	64	3,9	2,1	2,8
7A (2)	65	3,7	1,6	2,7
8A (2)	55	5	1,8	2,6
9A (2)	47	3,7	2	2,6
10A (2)	33	4,9	1,5	5,1
11A (2)	60	6,2	2	3,1
12A (2) Hemi A	54	12,2	3,4	2,5
12A (2) Hemi B	48	10,2	1,8	0,5
13A (2) Hemi A	40	17,2	4	0,7
13A (2) Hemi B	54	6,8	3,1	0,7
Observações	% em relação à curva padrão de glucose (10 – 40 µg/mL)	% em relação à curva padrão de albumina (10 – 1000 µg/mL)	% em relação à curva padrão de ácido gálico (1 – 50 µg/mL)	% em relação à curva padrão de galactose-5-acetato (100-800 µg/mL)

FONTE: O Autor

Em relação a carboidratos totais, as frações aquosas extraídas pelo método A apresentaram porcentagens menores que aquelas extraídas pelo método A (2). Dentre estas, as que mais se diferem são as frações 2A (8%) e

2A (2) (37%). As outras frações aquosas apresentam uma diferença de 4%, entre as frações 1A e 1A (2), e 10% entre as frações 3A e 3A (2).

Na primeira extração cítrica, observou-se uma diferença de 23% entre as frações 4A e 4A (2) sendo a fração 4A a de maior valor (57%). No entanto, na extração seguinte esta diferença diminuiu para 7% entre as frações 5A e 5A (2), sendo a fração 5A (2) de maior valor (47%). De uma maneira geral, as outras extrações cítricas apresentaram em média 54% de carboidratos e as extrações hemicelulósicas, 49%.

Para proteínas totais, as extrações pelo método A apresentaram porcentagens menores (até 2,5%) que as frações extraídas pelo método A (2). As frações do método A (2) apresentaram em média 4,2% de proteínas totais e dentre elas, as que apresentaram maiores porcentagens estão à fração aquosa 3A (2), com 5,6%, a fração cítrica 11A (2), com 6,2% e a fração alcalina 13A (2) Hemi A, com 17,2%.

O mesmo ocorre para fenóis totais, onde as frações obtidas pelo método de extração A apresentam porcentagens menores (até 1%) que as frações obtidas pelo método de extração A (2). As frações extraídas pelo método A(2) apresentaram uma média de 2,1% de compostos fenólicos. Dentre elas, as que possuem porcentagens maiores foram a fração aquosa 2A (2), com 1,9%, a fração cítrica 6A (2), com 2,1% e a fração alcalina 13A (2) Hemi A, com 4%. A média de grupamentos acetil encontrada para as frações extraídas pelo método A também foi menor (1,76%) que a encontrada para as frações extraídas pelo método A (2) (3,14%).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE FRUTOS DE *P. PERUVIANA*

4.4.1 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA NEUTRA E ÁCIDA

A composição monossacarídica dos polissacarídeos de frutos de *P. peruviana* foi analisada tanto por cromatografia em camada delgada (CCD)

como por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O primeiro método utilizado foi analisado por cromatografia gasosa, pelo qual os monossacarídeos neutros foram determinados como derivados de acetato de alditóis. O segundo método de análise foi através da cromatografia em camada delgada (CCD) utilizada para analisar qualitativamente a composição do conteúdo de monossacarídeos ácidos. Além disto, foram feitas as dosagens de ácidos urônicos de acordo com o método de Filizetti-Cozzi e Carpita (1991).

Como demonstra a TABELA 7, os monossacarídeos neutros majoritários encontrados nas frações de ambos os métodos de extração são a Ara e a Gal nas extrações aquosas e cítricas e a Xyl e a Man nas extrações hemicelulósicas. Também é possível observar que não há grandes diferenças entre os dois métodos de extração. Ge e colaboradores (2009) encontraram em polissacarídeos do cálice de *Physalis alkekengi* somente a Ara como monossacarídeo majoritário. Já nos frutos e nas raízes desta espécie, os polissacarídeos apresentaram a Gal como monossacarídeo predominante (TONG, LIANG e WANG, 2008). Polissacarídeos de outro fruto da mesma família da *P. peruviana*, o *Lycium ruthenicum* apresentaram a Ara como monossacarídeo predominante (PENG, *et al.*, 2014).

Nas FIGURAS 13 e 14 observa-se que o perfil obtido em CCD das 20 frações foi semelhante. Este resultado confirmou as análises por GC, demonstrando a presença de Gal e a Ara para as frações obtidas por extrações aquosas e cítricas e Xyl e Man para àquelas das extrações hemicelulósicas. Em relação aos ácidos urônicos é possível verificar a presença destes, resultado este de acordo com a dosagem colorimétrica, porém são necessárias análises complementares para a confirmação dos tipos de ácidos urônicos presentes nas frações.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DE FRUTOS DE *Physalis peruviana*

Frações	Composição monossacarídica neutra ^a (%)							% Ácido Urônico ^b
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
1A	4	1	18	6	6	20	6	67
2A	2	*	25	8	3	25	8	40
3A	3	*	20	9	2	26	8	47
4A	3	1	17	16	1	23	7	44
5A	2	1	29	14	0	16	2	56
1A (2)	6	3	20	13	6	13	10	64
2A (2)	4	*	24	11	3	23	8	35
3A (2)	*	*	24	11	2	20	6	59
4A (2)	*	*	25	17	1	18	4	53
5A (2)	*	*	27	21	2	27	4	24
6A (2)	*	*	28	33	2	14	4	24
7A (2)	*	*	29	30	3	18	5	19
8A (2)	29	*	23	23	1	6	3	22
9A (2)	*	*	28	34		10	2	28
10A (2)	*	*	12	29	6	19	2	45
11A (2)	1	*	21	24	8	20	2	31
12A (2) A	*	*	10	74	10	6	*	*
12A (2) B	*	*	15	43	20	13	10	*
13A (2) A	*	*	14	32	45	9	*	*
13A (2) B	*	*	10	15	63	12	*	*

FONTE: O autor

NOTA: ^a Monossacarídeos neutros analisados por GC-MS, na forma de acetatos de alditóis (PETOLLINO *et al.*, 2012); ^b Dosagem realizada de acordo com o método descrito por Filizetti-Cozzi e Carpita (1991) e porcentagem expressa em relação ao conteúdo de carboidrato total da fração; (*) traços (≤1%).

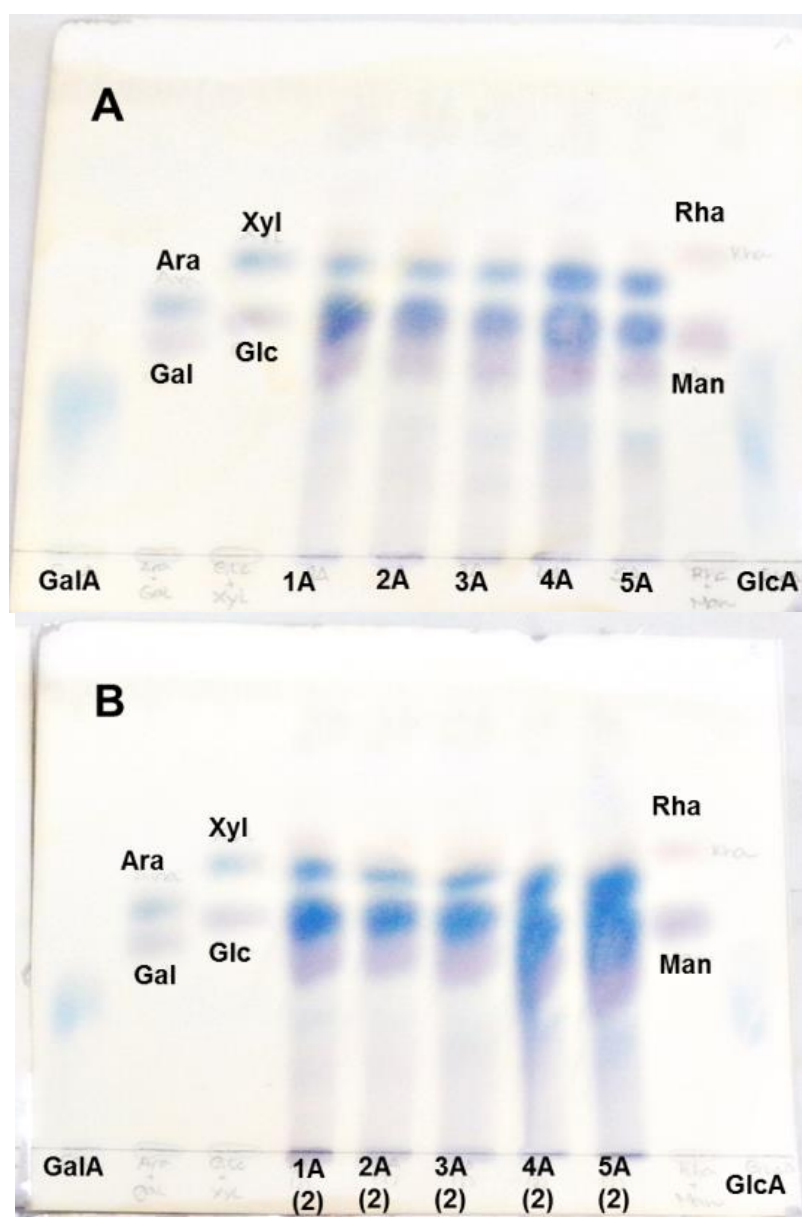


FIGURA 13 –PERFIL MONOSSACARÍDICO POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE FRUTOS DE *Physalis peruviana*.

NOTA: As amostras testadas foram previamente hidrolisadas com TFA 2,5 M por 8 h a 100°C. A corrida cromatográfica ascendente foi realizada utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila : n-propanol : ácido acético : água (4 : 2 : 2 : 1 v/v). A visualização dos açúcares foi possível após borrifamento com solução de orcinol 0,5 % (m/v) em etanol/H₂SO₄ e aquecimento a 100 °C. **A:** corridas cromatográficas das frações 1A, 2A, 3A, 4A e 5A; **B:** corridas cromatográficas das frações 1A (2), 2A (2), 3A (2), 4A (2) e 5A (2).

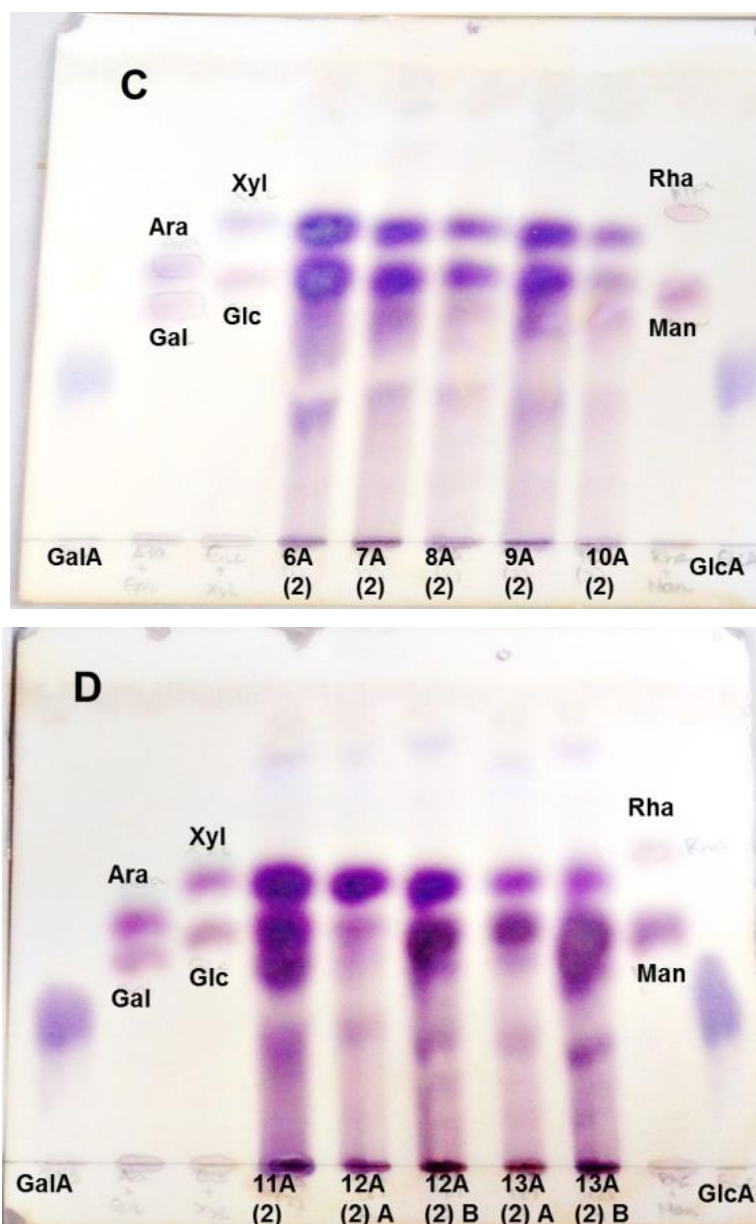


FIGURA14 – PERFIL MONOSSACARÍDICO POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE FRUTOS DE *Physalis peruviana*.

NOTA: As amostras testadas foram previamente hidrolisadas com TFA 2,5 M por 8 h a 100°C. A corrida cromatográfica ascendente foi realizada utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila : n-propanol : ácido acético : água (4 : 2 : 2 : 1 v/v). A visualização dos açúcares foi possível após borrifamento com solução de orcinol 0,5 % (m/v) em etanol/H₂SO₄ e aquecimento a 100 °C. **C:** corridas cromatográficas das frações 6A (2), 7A (2), 8A (2), 9A (2) e 10A (2); **D:** corridas cromatográficas das frações 11A (2), 12A (2) Hemi A, 12A (2) Hemi B, 13A (2) Hemi A e 13A (2) Hemi B.

4.4.2 DOSAGENS DE ARABINOGLACTANAS-PROTEÍNAS (AGP)

As frações obtidas foram submetidas ao ensaio de difusão radial em gel de agarose na presença do reagente de Yariv (β -Glc) com o intuito de verificar a presença de arabinogalactana-proteínas (AGPs) nestas frações. A FIGURA 15 demonstra as porcentagens de arabinogalactanas-proteínas presente nas 20 frações. A principal diferença entre os dois métodos de extração é a maior porcentagem de AGPs nas frações do método A (2), o que pode indicar que a inativação enzimática não favorece a extração de AGPs do fruto. As frações cítricas e hemicelulósicas a partir da fração 6A (2) apresentaram porcentagens de AGP menores que 4% (em relação ao conteúdo de carboidrato total).

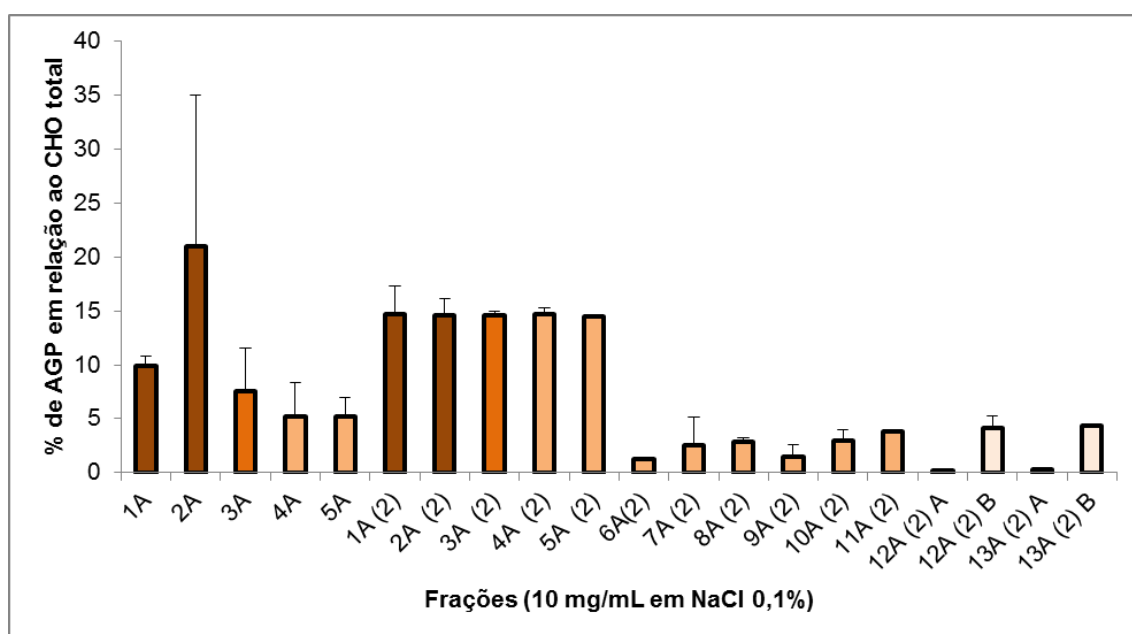


FIGURA 15 - DOSAGEM DE ARABINOGLACTANA-PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DE FRUTOS DE *Physalis peruviana*

FONTE : O autor

NOTA: Foram realizados três experimentos e calculados as médias e desvios padrão com base nestes experimentos.

Segundo Fincher, Stone e Clarke (1983) uma das principais características das AGPs é a ocorrência de Ara e Gal como seus monossacarídeos majoritários. A quantidade de Gal nas AGPs na maioria das vezes é maior que a de Ara, no entanto o contrário também ocorre (FINCHER,

STONE e CLARKE, 1983). A presença de baixa quantidade de AGP nas frações cítricas e hemicelulósicas estão compatíveis com a análise da composição monossacarídica, a qual mostra a Xyl como monossacarídeo majoritário.

Em relação à porcentagem de proteínas, o método A (2) apresentou em média 4% de proteínas enquanto que o método A apresentou em média somente 1%. Segundo Kreuger e Holst (1996) as AGPs apresentam até 10% de proteínas na sua constituição. Três pré-requisitos gerais são considerados para caracterizar a presença de AGPs, de acordo com Showalter (2001): presença de Ara e Gal como monossacarídeos majoritários, até 10% de proteínas e a complexação com o reagente de Yariv (β -Glucosil). Assim, as frações 1A – 5A e 1 A(2) – 5 A(2) apresentam estes requisitos, sugerindo a presença de AGPs nestas frações.

Na família Solanaceae a ocorrência de AGP vem sendo relatada desde os anos 80 (AIKIAMA e KATO, 1981). A *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) apresentou polissacarídeos com complexação positiva com o reagente de Yariv (β -Glucosil) (AIKIAMA e KATO, 1981). Bacic, Gell e Clarke (1988) isolaram uma possível AGP de *Nicotiana glauca* (Solanaceae) através da ligação específica entre a proteína J539 de mieloma com a ligação β (1 $\rightarrow$ 6) de galacto-oligosacarídeos. Segundo o autor a ligação entre estes dois compostos indica a possível purificação de AGPs. Ainda na família Solanaceae, foram isoladas AGPs de tomate (*Solanum lycopersicum*) (FRAGKOSTEFANAKIS, DANDACHI e KALAITZIS, 2012).

4.4.3 ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO ACOPLADA AO TRANSFORMADOR FOURIER (FT-IR)

A espectrometria de infravermelho se baseia na variação dos estados de energia vibracional das moléculas específicos para cada grupo funcional (CAMPBELL e WHITE, 1989; KACURÁCOVÁ *et al.*, 2002; WOLKERS *et al.*, 2004). Por ser uma ferramenta confiável e de alta sensibilidade, esta técnica

vem sendo utilizada para a elucidação de estruturas, propriedades físicas e interações de carboidratos (KACURAKÓVÁ e WILSON, 2001). Tais elucidações são possíveis devido à formação de bandas características para cada grupo funcional. Desta forma, através da análise dos espectros e pesquisa na literatura é possível identificar as estruturas presentes nas moléculas testadas (ŠANDULA *et al.*, 1999).

Todos os polissacarídeos são caracterizados pelas bandas de OH e CH, 3500 e 2950 cm^{-1} respectivamente. A região entre 2000 e 400 cm^{-1} representa, no caso de polissacarídeos, as diferenças entre um polissacarídeo e outro, sendo considerada como a região de “*fingerprint*” dos carboidratos (FILIPPOV, 1992).

A FIGURA 16 representa o espectro das frações aquosas 1A, 1A (2), 3A e 3A (2). As frações aquosas seguintes, 2A e 2A (2) apresentam espectros semelhantes a este e, portanto não serão mostrados. Os espectros da FIGURA 16A se mostram semelhantes apesar da intensidade do sinal ser diferente. Neste espectro pode ser observada a presença das bandas de OH e CH (3500 e 2950 cm^{-1}) características para polissacarídeo (MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001). A banda identificada em 1740 cm^{-1} (evidenciada pelo retângulo roxo) representa o grupamento carboxílico esterificado. Para esta banda, nota-se que a intensidade do sinal é diferente entre os dois tipos de extração. O método de extração A (2) apresenta uma intensidade de sinal menor que a do método A. Outra banda intensa no espectro é a em 1600 cm^{-1} (evidenciada pelo retângulo azul) que representa grupos carboxílicos livres (SINGTHONG *et al.*, 2004). Há uma relação íntima entre estes dois grupamentos que determina o grau de esterificação dos compostos analisados. Esta relação diz que com o aumento do grau de esterificação a intensidade da banda dos grupos carboxílicos esterificados aumenta enquanto que a intensidade dos grupamentos carboxílicos livres tende a diminuir. De maneira semelhante, a intensidade da banda dos grupos carboxílicos livres aumenta com o decréscimo do grau de esterificação (SINGTHONG *et al.*, 2004). No caso destas frações é possível observar que, devido a maior intensidade de sinal para os grupos carboxílicos esterificados da fração aquosa 1A pode-se inferir que esta fração tem uma maior grau de esterificação que a fração 1A (2).

Ainda na FIGURA 16A, é possível observar a presença da banda em 1070 cm^{-1} , que representa os grupamentos COC (MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001).

As mesmas características apresentadas para as frações frias podem ser observadas para as frações quentes e cítricas. O que diferencia uma fração da outra é a intensidade dos sinais, principalmente na banda dos grupos carboxílicos esterificados e livrese na região entre 1550 e 1000 cm^{-1} .

Os espectros das frações quentes 3A e 3A (2) podem ser observados na FIGURA 16B. Nota-se que a diferença de intensidade dos sinais na região de 1740 cm^{-1} é maior que aquela encontrada para as frações frias, o que indica uma maior esterificação na fração 3A. Enquanto que na banda 1600 cm^{-1} a diferença entre as intensidades dos sinais é quase inexistente.

Para as frações cítricas 4A e 4A (2), com os espectros evidenciados na FIGURA 17A, as bandas em 1740 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} e a região entre as bandas 1550 e 1000 cm^{-1} apresentam diferenças nas intensidades assim como observado para as frações aquosas frias e quentes. No entanto, esta diferença demonstra ser menor. O mesmo ocorre para as frações cítricas seguintes, 5A e 5A (2).

As frações cítricas 6A (2) e 7A (2) fazem parte do mesmo método de extração [método A (2)] e, no entanto, apresentam as mesmas características de esterificação que as frações evidenciadas na FIGURA 17B.

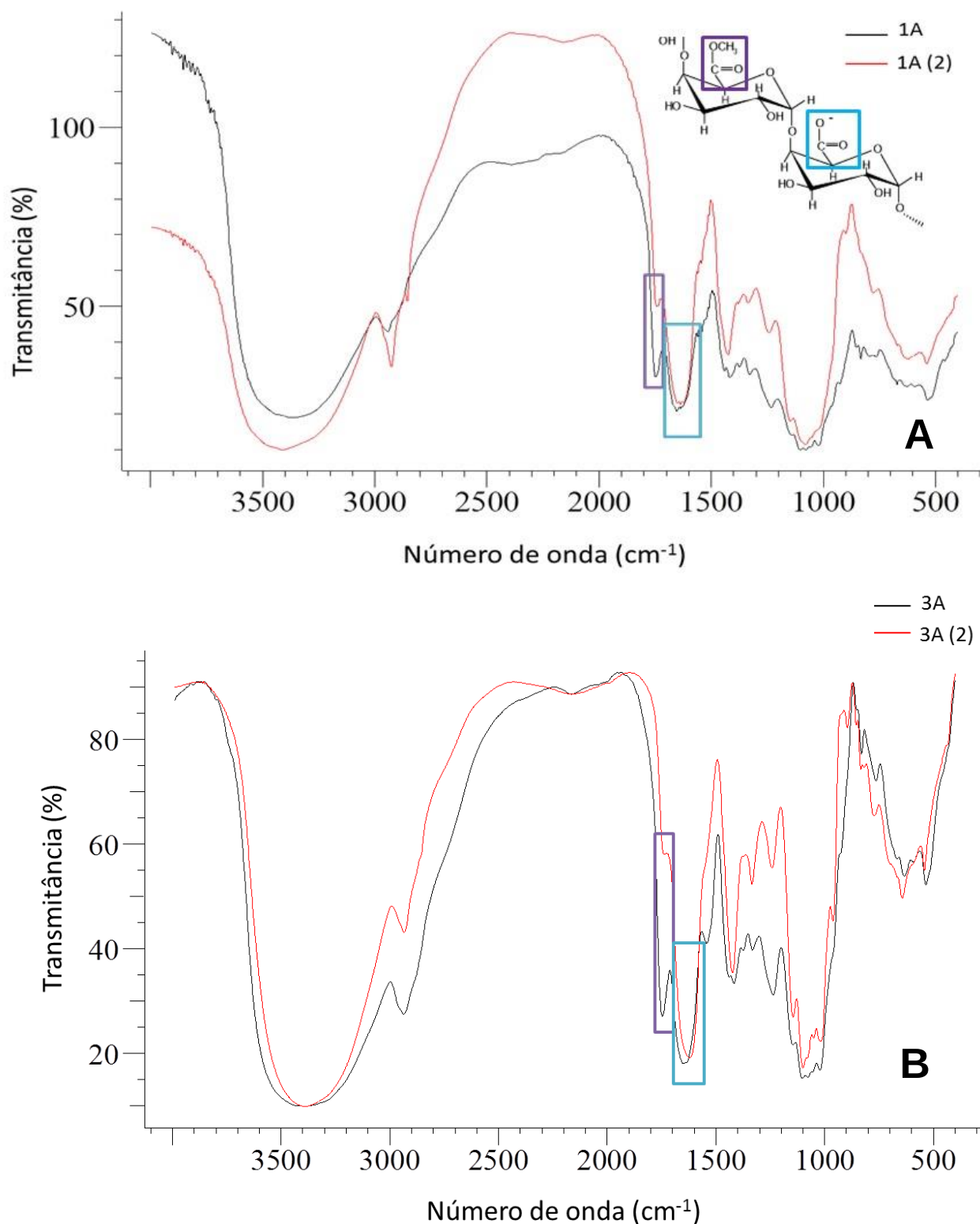


FIGURA 16 –ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES AQUOSAS A FRIO E A QUENTE DE *Physalis peruviana* OBTIDAS PELOS DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

FONTE: O autor

NOTA:A: 1A E 1A (2); B: 3A E 3A (2); Amostras anidras analisadas em pastilhas de KBr; o retângulo roxo evidencia a diferença de intensidade na banda 1740 cm^{-1} e o retângulo azul evidencia a diferença de intensidade na banda 1600 cm^{-1} .

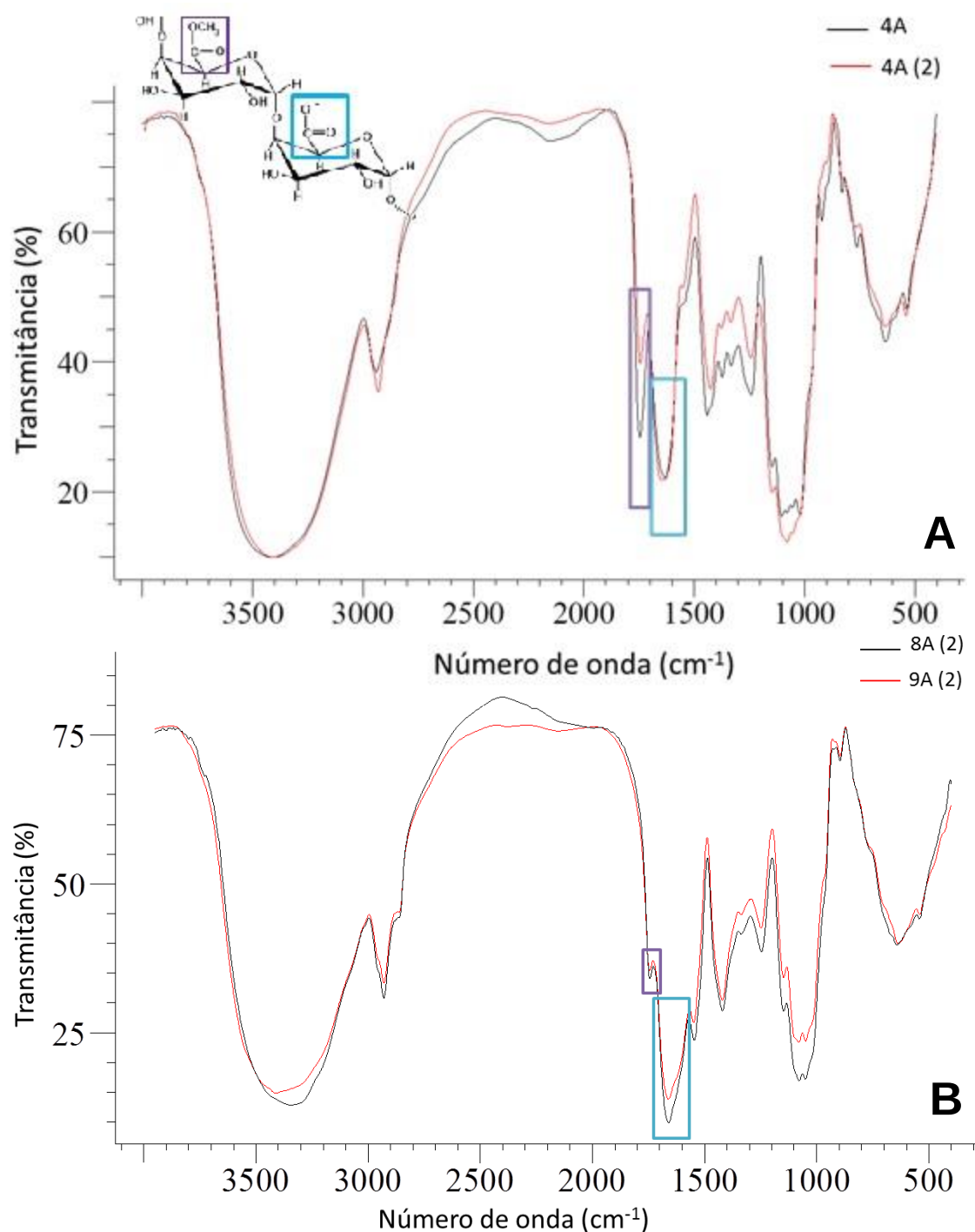


FIGURA 17 – ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES CÍTRICAS 4A E 4A (2) DE *Physalis peruviana* OBTIDAS PELOS DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

FONTE: O autor

NOTA: Amostras anidras analisadas em pastilhas de KBr; o retângulo roxo evidencia a diferença de intensidade na banda 1740 cm^{-1} e o retângulo azul evidencia a diferença de intensidade na banda 1600 cm^{-1} .

Nas frações cítricas seguintes, que sofreram extração com ácido cítrico mais concentrado (2,5% e 5%), FIGURA 17B, as bandas em 1740 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} aparecem com as mesmas intensidades, independente da temperatura de extração. No entanto, é importante notar que, com o aumento da concentração de ácido cítrico utilizado para a extração destas pectinas, o grau de esterificação diminui, uma vez que a banda em 1740 cm^{-1} é muito menor nos espectros destas frações cítricas do que das frações aquosas.

A presença de grupamentos carboxílicos esterificados nas frações aquosas de ambas os métodos de extração é devido a água como veículo de extração. Como já dito anteriormente, a água é capaz de solubilizar pectinas altamente esterificadas e por isto é utilizada para a extração deste tipo de composto (VORAGEN *et al.*, 1995).

Para as extrações hemicelulósicas 12A (2) Hemi A e 12A (2) Hemi B, representadas na FIGURA 18, as bandas características de polissacarídeos também podem ser observadas. A banda em 1740 cm^{-1} está completamente ausente e a banda de 1600 cm^{-1} não apresenta uma grande diferença na intensidade entre as duas frações hemicelulósicas. O mesmo fenômeno se repete para as frações hemicelulósicas seguintes, 13A (2) Hemi A e 13A (2) Hemi B.

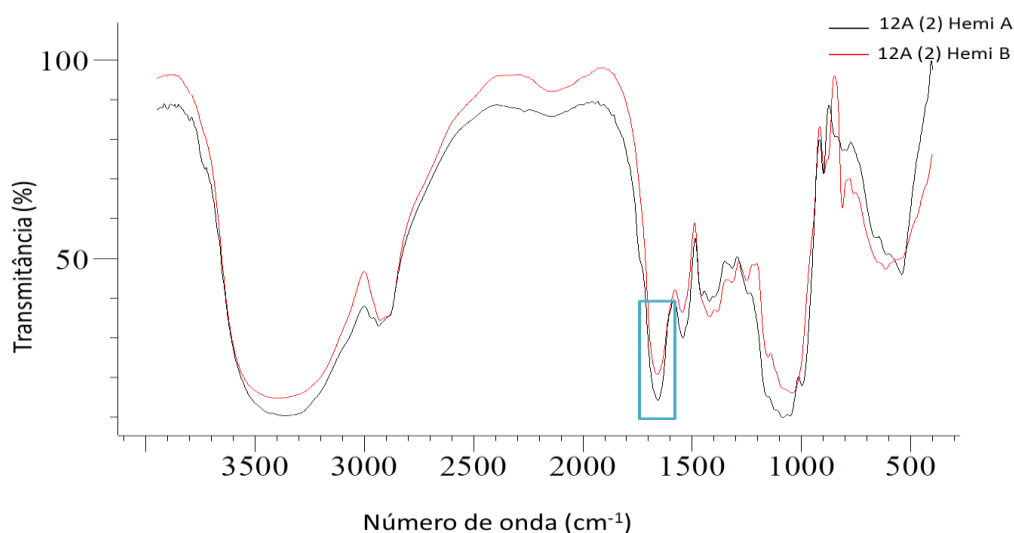


FIGURA 18 –ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES HEMICELULÓSICAS 12A (2) HEMI A E 12A (2) HEMI B DE *Physalis peruviana*

FONTE: O autor

NOTA: Amostras anidras analisadas em pastilhas de KBr; o retângulo azul evidencia a diferença de intensidade na banda 1600 cm^{-1} .

Com o intuito de proporcionar uma visão ampla sobre as características químicas das frações obtidas no presente trabalho, na Tabela 8 está mostrada de maneira resumida os seguintes parâmetros: composição monossacarídica neutra, teor de ácidos urônicos e AGPs e conteúdo de carboxilas esterificadas.

Assim, considerando a composição monossacarídica neutra, pode-se dizer que de maneira ampla, primeiramente, foram extraídos polissacarídeos contendo Gal, como monossacarídeo majoritário, e na sequência polissacarídeos contendo Ara, Xyl e Man,

Outras características podem ser observadas em relação aos ácidos urônicos. Nota-se que as extrações aquosas promovem uma maior extração de ácidos urônicos do que os outros solventes utilizados. Em relação às AGPs, como mencionado no item 6.4.2, a inativação enzimática tem um papel importante na extração destes compostos. As frações que não foram submetidas à inativação enzimática possuem maiores quantidades de AGPs quando comparadas com aquelas que passaram por este processo. O método A (com inativação enzimática) proporcionou menor extração de AGPs (ver FIGURA 15). A fração 2A apresenta uma maior quantidade de AGP devido à baixa quantidade de carboidratos totais, uma vez que a porcentagem de AGPs é calculada a partir do conteúdo de carboidratos. Por outro lado, o método A (2) favoreceu a extração de AGPs, não só pelas porcentagens maiores do que as encontradas no método A, mas também por manter constante a quantidade de AGPs nas primeiras extrações.

Em relação às carboxilas esterificadas, observa-se que as frações que apresentaram uma banda maior em 1740 cm^{-1} nos espectros de FT-IR foram obtidas pelo método A de extração com ácido cítrico (4A e 5A). Frações com maior grau de esterificação são comumente extraídas em meio ácido (VORANGEN *et al.*, , 1995). Pode-se também destacar que a inativação enzimática preserva estes tipos de polímeros uma vez que as frações 4A (2) e 5A (2) apresentaram menor grau de esterificação.

Na TABELA 8 também estão indicados os possíveis tipos de polissacarídeos presentes nas frações. A presença de polissacarídeos com diferentes estruturas poderia ser esperada, uma vez que as extrações foram realizadas com o fruto inteiro, incluindo casca e sementes. Além disso as frações não foram submetidas a outros processos analíticos de separação para

obtenção de frações mais purificadas. Porém, destaca-se que os tipos de polissacarídeos encontrados nas diferentes frações são estruturas que estão incluídas na classe das pectinas e das hemiceluloses.

TABELA 8—RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DOS FRUTOS DE *Physalis peruviana*

Frações	Monossacarídeos neutros majoritários (proporção) ^a	Conteúdo de ácidos urônicos ^b	Conteúdo de AGP ^c	Conteúdo de carboxilas esterificadas ^d	Sugestão da presença de polímeros ^e
1A	Ara : Gal (0,9 : 1)	• • • •	• • • •	• • • • •	HG – AG
2A	Ara : Gal (1 : 1)	• •	• • • •	•	HG – AG
3A	Ara : Gal (0,7 : 1)	• •	• •	• • • • •	HG – AG
4A	Ara : Xyl : Gal (0,7 : 0,6 : 1)	• •	• •	• • • • •	XGA – AG
5A	Ara : Xyl : Gal (1 : 0,7 : 0,5)	• • • •	• •	• • • • •	XGA – AG
1A (2)	Ara : Xyl : Gal (1 : 0,6 : 0,6)	• • • •	• • • •	• •	XGA – AG
2A (2)	Ara : Gal (1 : 0,9)	• •	• • • •	•	HG – AG
3A (2)	Ara : Gal (1 : 0,8)	• • • •	• • • •	•	HG – AG
4A (2)	Ara : Xyl : Gal (1 : 0,6 : 0,7)	• • • •	• • • •	• • • •	HG – AG
5A (2)	Ara : Xyl : Gal (1 : 0,7 : 1)	•	• • • •	• • • • •	XGA – AG
6A (2)	Ara : Xyl : Gal (0,8 : 1 : 0,4)	•	•	• • • •	XGA – AG
7A (2)	Ara : Xyl : Gal (0,9 : 1 : 0,6)	•	•	• • • •	XGA – AG
8A (2)	Ara : Xyl (1 : 1)	•	•	•	AX – AG
9A (2)	Ara : Xyl (0,8 : 1)	•	•	•	AX - AG
10A (2)	Xyl : Gal (0,6 : 1)	• •	•	•	XGA - AG
11A (2)	Ara : Xyl : Gal (0,8 : 1 : 0,8)	• •	•	nd	XGA - AG
12A (2) A	Xyl	nd	nd	nd	XL
12A (2) B	Xyl : Man (0,4 : 1)	nd	•	nd	XL MN – AG
13A (2) A	Xyl : Man (0,7 : 1)	nd	nd	nd	MN
13A (2) B	Man	nd	•	nd	MN - AG

NOTA: ^a: monossacarídeos majoritários presentes nas frações, a proporção foi calculada de acordo com as porcentagens obtidas para cada monossacarídeo; ^b: ácidos urônicos totais (••• - ≥ 50%; •• - de 30 a 50%; • - 15 a 30 %); ^c: AGP (••• - ≥ 10%; •• - 5 a 10%; • - abaixo de 5%); ^d: conteúdo de carboxilas esterificadas analisadas por FT-IR, onde as frações que

possuem •••• são que apresentam as bandas maiores em 1740 cm^{-1} e • as que apresentam bandas menores; ^e: em relação aos monossacarídeos majoritários presentes nas frações; nd: não identificado; HG: Homogalacturonana; AG: Arabinogalactana; XGA: (Xilo)Homogalacturonana; AX: arabinoxilana; MN: Manana; XLMN: xilomanana.

FONTE: O autor

4.4.4 RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA MONO- E BIDIMENSIONAL DA FRAÇÃO 1A

A fração 1A, utilizada nos ensaios biológicos com macrófagos, foi submetida às análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C , ^1H) com o objetivo de obterem-se mais informações sobre características das estruturas químicas desta fração, como por exemplo, a configuração do carbono anomérico. Os assinalamentos obtidos dos espectros da fração 1A foram atribuídos considerando os dados de literatura juntamente com outras informações das análises químicas realizadas e discutidas anteriormente. Nenhuma informação sobre análises de RMN de polissacarídeos de frutos de *Physalis peruviana* foi encontrada na literatura.

O espectro de ^1H -RMN da fração 1A (FIGURA 19) apresentou os seguintes assinalamentos na região de hidrogênios anoméricos, em δ 5,22, 5,05, 4,99, 4,92, 4,68 e 4,43 ppm. Unidades de H-1 de α -L-Araf podem ser atribuídas ao assinalamento em 5,22 ppm (MATULOVÁ, *et al.*, 2011). Deslocamentos químicos em 5,05 ppm podem ser atribuídos aos COOH de unidades de GalA e em 4,99 às unidades de GalA esterificados (NASCIMENTO, 2013). Assinalamentos em 4,43 ppm podem ser atribuídos a H4 de GalA e H1 de β Gal sobrepostos, como mostra o espectro de HSQC na FIGURA 20 (NASCIMENTO, 2013). Outro assinalamento pode ser atribuído em 3,78 ppm, indicando a presença de hidrogênios do grupamento metil éster (COOCH_3) (NASCIMENTO, 2013). Além dos sinais referentes aos H-6 de α -D-Rhap que foram observados na região de 1,29 - 1,22 ppm (WINNING *et al.*, 2007).

).

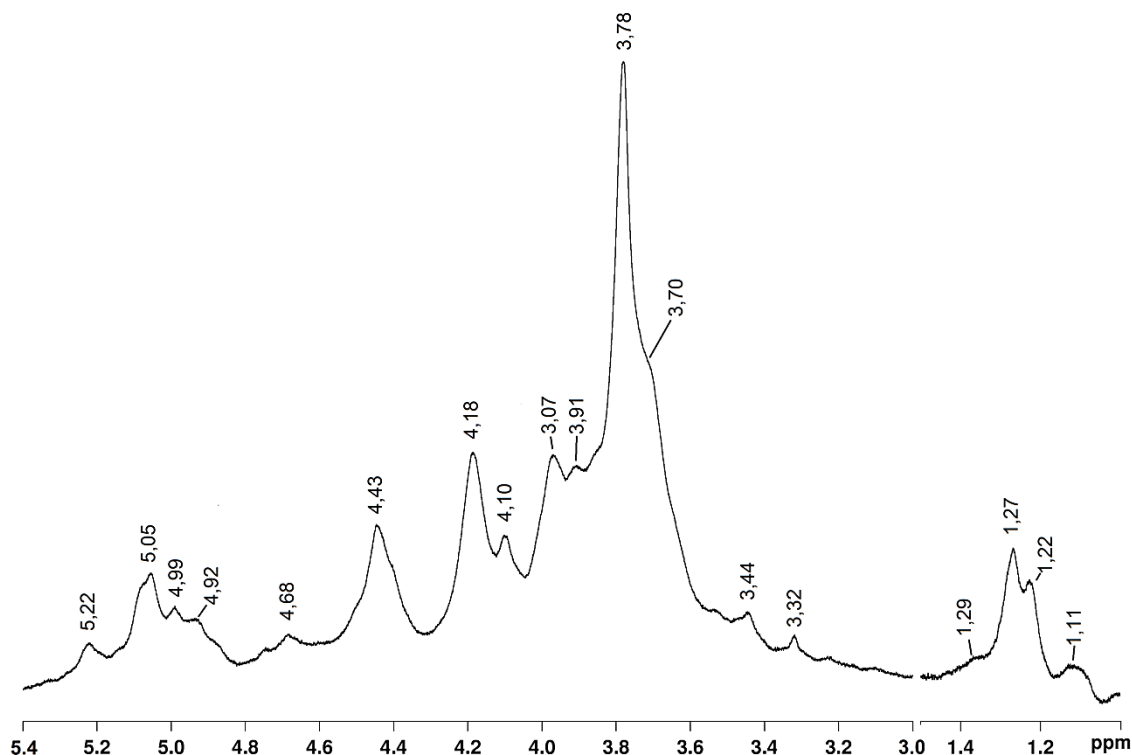


FIGURA19 - ESPECTRO PARCIAL DE RMN¹H (REGIÃO 5,4 A 1 PPM) DA FRAÇÃO 1A EM D₂O, A 50°C

FONTE: O autor

NOTA: Valores numéricos em δ (PPM).

No espectro de HSQC (espectroscopia de *Heteronuclear Single Quantum Correlation*) da fração 1A (FIGURA 20) pode-se observar as correlações para a região anomérica em 107,6/5,04 ppm são atribuídas a unidades α -L-Araf (1 $\rightarrow$ 5) ligadas (CHIDOUH et al., 2014). Nesta mesma região, as correlações em 109,3/5,22 podem ser atribuídas a α -L-Araf terminais e as correlações em 109,3/5,21 ppm podem ser atribuídas também as unidades de α -L-Araf. As correlações em 103,1/4,50, 103,2/4,47, 103,3/4,43 podem ser atribuídas a unidades de β -Gal. Em 100,1/4,69 e 100,2/4,68 ppm pode ser atribuído as unidades de Rha. As correlações de C-1/H-1 em 100,0/4,99; 100,2/4,95; 100,2/4,91 e 99,8/4,97 podem ser atribuídas as unidades de GalA esterificadas e as outras correlações em 99,3/5,03, 99,3/5,05, 99,3/5,07, 99,3/5,08 às unidades de GalA não esterificadas (DELGOBO et al., 1999; CORDEIRO, 2012; TISCHER; GORIN e IACOMINI, 2002; CIPRIANI, et al. 2009).

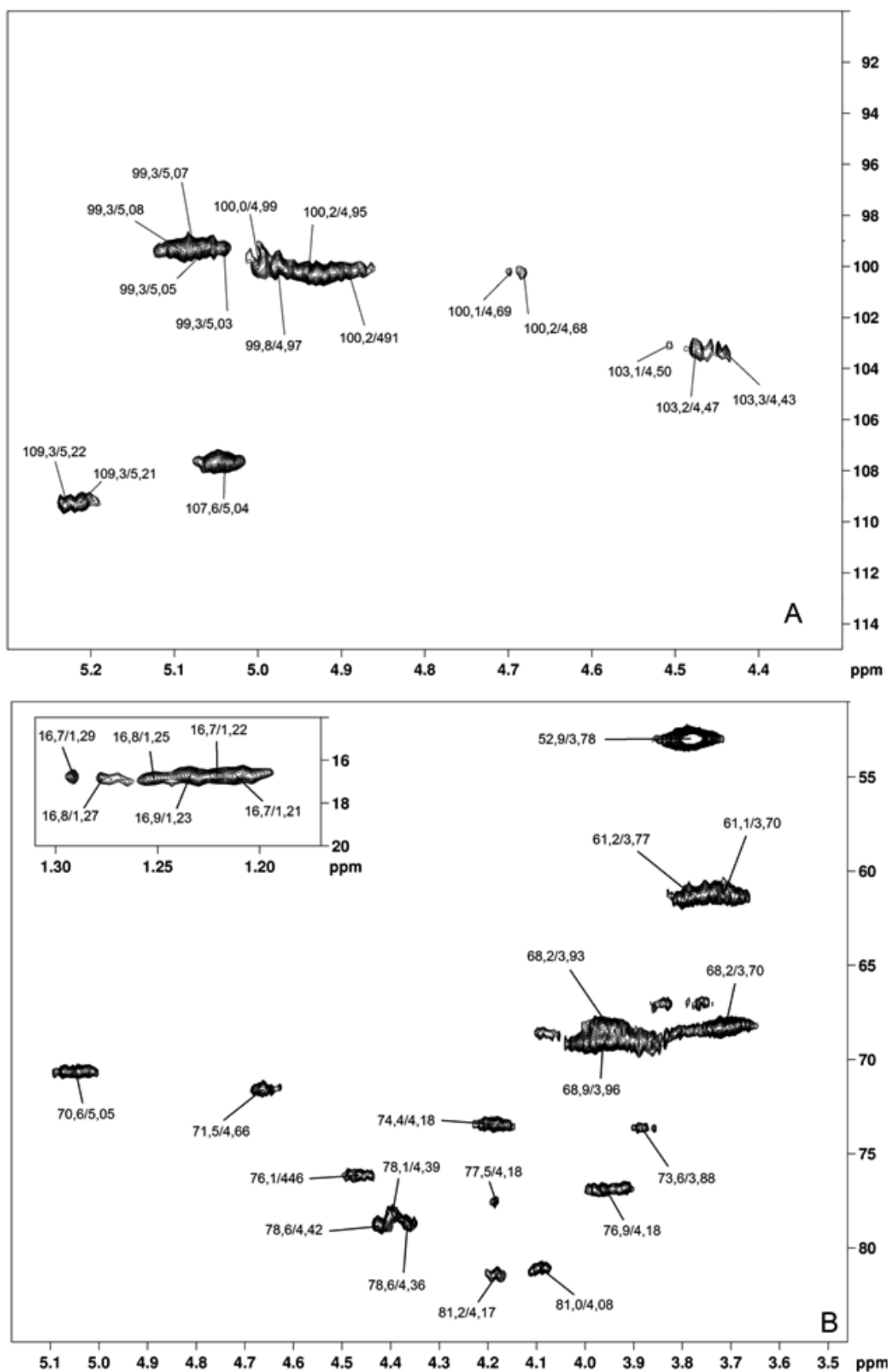


FIGURA20 - ESPECTROS DE CORRELAÇÃO (^{13}C , ^1H) DA FRAÇÃO 1A EM D_2O , A 50°C

FONTE: O autor

NOTA: Valores numéricos em δ (PPM)

Outras correlações em 81,2/4,17 e 81,0/4,08 podem ser atribuídas às unidades de β -Gal O-3 substituídas, como também à H2 de α -L-Araf. As correlações referentes à C-4/H-4 de GalAsão identificadas em 78,1/4,39; 78,6/4,42 ppm. As correlações em 61,2/3,77 e 61,1/3,70 podem indicar a presença de C-6 livre de Gal. Além disso, o espectro mostra a presença da correlação das unidades metil-esterificadas (-OCH₃) em 52,9/3,78 ppm, como relatado para frutos de *Curcubita pepo* e em pectinas de *Citrus*. As correlações em 16,7/1,29, 16,8/1,27, 16,8/1,25, 16,9/1,23, 16,7/1,22, 16,7/1,21 podem ser atribuídas aos grupamentos metílicos (C-6) das unidades de Rha(ROSENBOHM et al., 2003; KOŠT'ÁLOVÁ; HROMÁDKOVÁ; EBRINGEROVÁ, 2013).

4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA FRAÇÃO 1A OBTIDA DE FRUTOS DE *Physalis peruviana*

Polissacarídeos, provenientes de plantas medicinais são capazes de promover efeitos benéficos à saúde humana. Estes compostos são capazes de modular a resposta imunológica por ter a capacidade de se ligar especificamente aos receptores de superfície celular de macrófagos, ativando-os (SHEPETKIN e QUINN, 2006).

Como citado na revisão bibliográfica desta dissertação, as pectinas são um grupo de polissacarídeos ácidos que apresentam propriedades medicinais (SRIAMORNSAK, 2003; MOHENEN, 2008). Nos últimos anos, os polissacarídeos pécticos têm ganhado destaque devido às suas atividades farmacológicas principalmente na sua capacidade para modular as respostas imunes (NERGARD et al., 2005)

Com o objetivo de avaliar a atividade moduladora da fração polissacarídica do fruto de *P. peruviana*, a fração 1A foi submetida a vários ensaios contendo células do lavado peritoneal de camundongos suíços

(SWISS), incluindo a avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT, a indução de produção de NO• e citocinas, a modificação morfológica e a retenção de lisossomos.

4.5.1.1 Análises morfológicas

As principais características de macrófagos ativados são o aumento de projeções citoplasmáticas e maior número de vacúolos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008). Para avaliar o efeito da fração 1A na morfologia das células do lavado peritoneal foi realizado um ensaio em placas de 24 poços com lamínulas onde as células foram incubadas na ausência (controle negativo) e na presença da fração 1A em diferentes concentrações. As células aderidas à lamínulas foram fixadas com solução de Bouin, desidratadas com acetona, coradas com Giemsa e analisadas em microscópio óptico. As fotomicrografias podem ser observadas na FIGURA 21.

Comparando as imagens dos controles e das células tratadas com LPS, observa-se a diferença entre as morfologias entre células não ativadas, controle negativo para ativação celular (controle), e células ativadas, controle positivo para ativação celular (LPS). O controle negativo demonstra células com o citoplasma condensado e membranas pouco espreiadas enquanto que as células do controle positivo apresentam o citoplasma menos denso, com a presença de vacúolos, núcleo descondensado e membranas com projeções citoplasmáticas evidentes. Ao observar a ação das frações nestas células pode-se inferir que a fração 1A promove as modificações na morfologia características de células ativadas. Não é possível perceber se a ativação é dose dependente, no entanto, já na concentração mais baixa, 0,32 µg/mL, é possível observar uma maior semelhança com o controle positivo. Esta semelhança se mantém com o aumento da concentração utilizada da fração 1A.

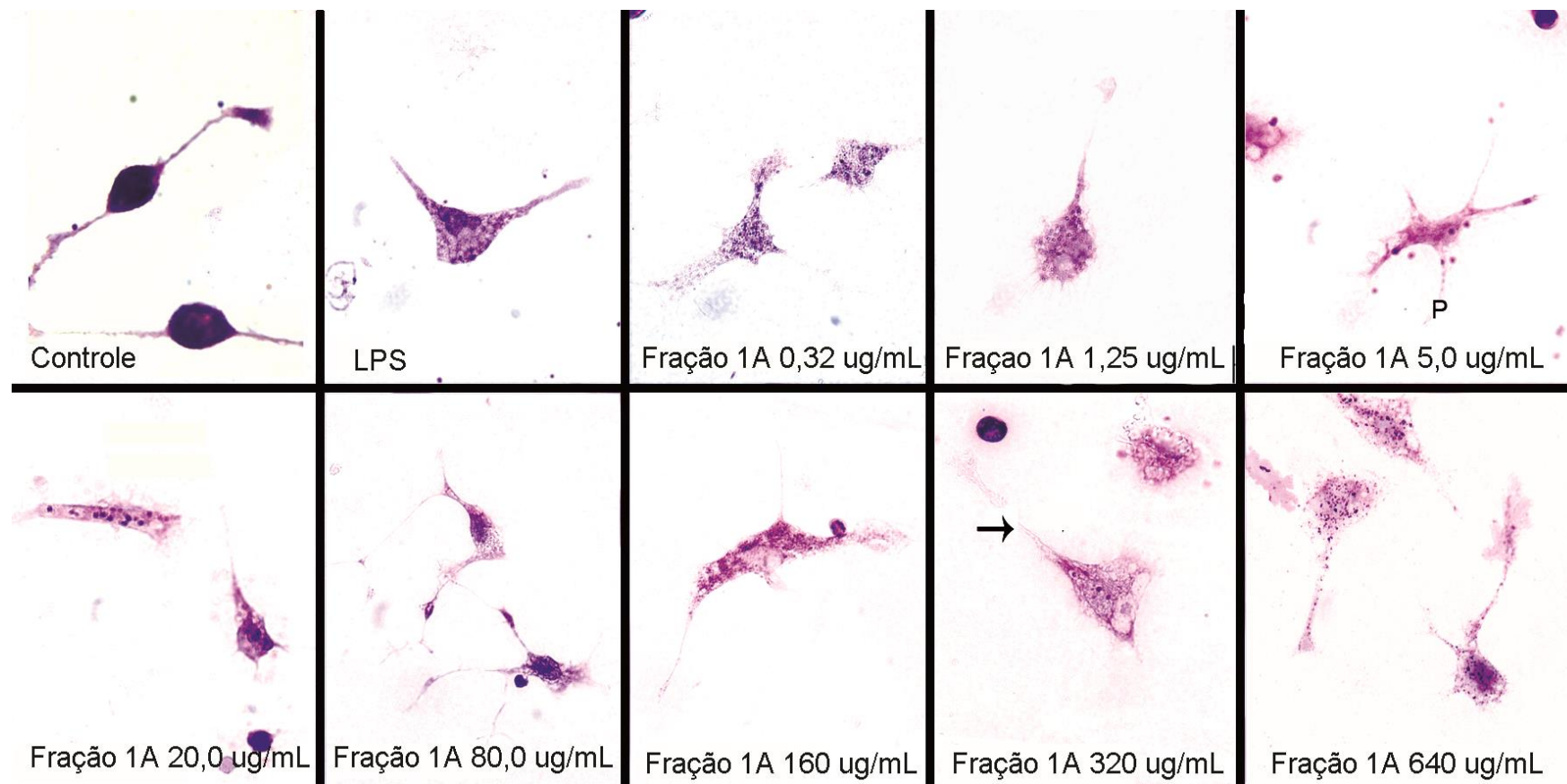


FIGURA 21 -EFEITO DO TRATAMENTO DE 24h COM A FRAÇÃO 1A DE *Physalis peruviana* SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24h na ausência (meio) e presença da fração 1A, nas concentrações indicadas. O LPS (50ng/mL) foi utilizado como controle positivo. A seta preta e a letra P apontam as projeções citoplasmáticas. As lamínulas foram fixadas com solução de Bouin e as células aderidas às lamínulas foram coradas com Giemsa; as fotomicrografias foram obtidas através de microscópio Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - Japão).

O decocto de *Uncaria tomentosa* apresentou mudanças na morfologia de macrófagos a partir da concentração 20 µg/mL e a fração obtida por extração aquosa a 25 °C da mesma planta apresentou as mesmas alterações morfológicas a partir da concentração 1,25 µg/mL (LENZI *et al.*, 2013). As frações polissacarídicas obtidas de *Aloe barbadensis* também demonstraram modificações na morfologia de macrófagos a partir da concentração de 10 µg/mL (CAMPESTRINI, 2013).

4.5.1.2 Determinação da viabilidade pelo Método do MTT em culturas de células do lavado peritoneal na presença da fração 1A de frutos de *Physalis peruviana*

Este ensaio visa verificar a interferência da fração 1A na viabilidade das células. Segundo Reilly e colaboradores (1998), somente as células metabolicamente viáveis são capazes de catalisar a redução do MTT. A redução deste sal é feita por desidrogenases mitocondriais associadas ao NADH e ao NADPH produzindo o cristal de formazan, um composto insolúvel que pode ser solubilizado em solventes orgânicos como o DMSO (dimetilsulfóxido) dando à solução a cor roxa que pode ser quantificada espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983; GERLIER e THOMASSET, 1986).

Os resultados referentes à interferência da fração 1A na viabilidade das células do lavado peritoneal estão apresentados na FIGURA 22. A fração 1A em nenhuma concentração testada provocou alteração da viabilidade celular nas condições testadas (24h e 48h). O aumento do percentual em relação ao grupo controle pode ser reflexo da ativação dos macrófagos, fazendo com que haja uma maior respiração celular e consequente maior atividade das desidrogenases mitocondriais (REILLY, 1998). Embora nenhuma das concentrações utilizadas tenha demonstrado significância em relação ao controle negativo, todas as concentrações da fração 1A não demonstraram toxicidade às células durante 24 e 48h de incubação, uma vez que todas as concentrações obtiveram porcentagens maiores que o controle negativo.

Segundo Pozzolini e colaboradores (2003), as células utilizadas neste trabalho não são capazes de se multiplicar *in vitro*. Neste estado de ativação, as células do lavado peritoneal apresentam uma capacidade maior em produzir cristais de formazan a partir de sais de MTT, e em expressar em maior quantidade a enzima iNOS, a qual também está envolvida na redução do MTT quando comparadas a células quiescentes.

Este resultado também foi encontrado para *L. ruthenicum* (Solanaceae). Os polissacarídeos pécticos extraídos do fruto desta planta também não apresentaram toxicidade em macrófagos peritoneais em concentrações abaixo de 200 µg/mL (PENG *et al.*, 2014).

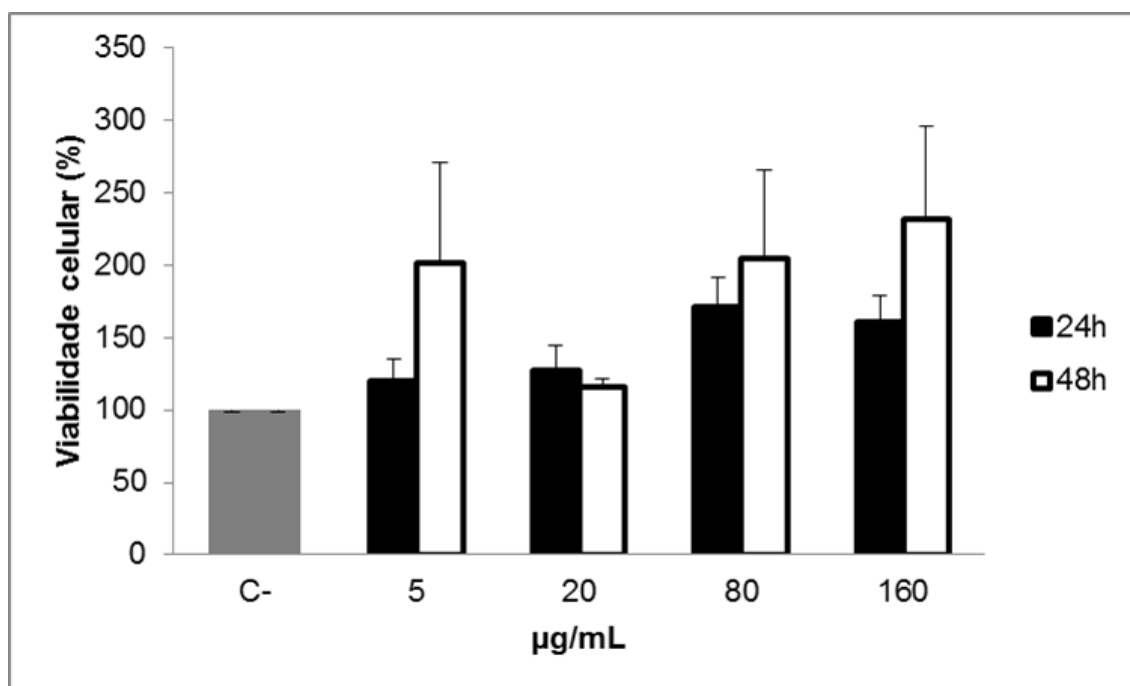


FIGURA 22 - EFEITO DA FRAÇÃO 1A DE *Physalis peruviana* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS DE LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS APÓS 24h E 48h DE INCUBAÇÃO.

FONTE: O autor

NOTA: Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24 h e 48 h na ausência (meio) e presença da fração, nas concentrações indicadas. Após a incubação, o MTT foi removido e adicionou-se DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para as células incubadas somente com meio MEM (grupo controle negativo ou C-). Os resultados estão expressos como médias de triplicatas e desvio padrão. Este experimento foi repetido duas vezes em dias alternados; * Diferença significativa do meio MEM (controle negativo) em relação ao teste Tukey (p 0,05).

4.5.1.3 Produção do Óxido Nítrico pelas culturas de células do lavado peritoneal na presença e ausência da fração 1A de frutos *Physalis peruviana*

Na FIGURA 23 está representado o resultado obtido na avaliação da produção de NO^* . Embora a fração não tenha apresentado diferença significativa em relação ao controle negativo, observa-se uma tendência de a produção de NO^* diminuir com o aumento da concentração.

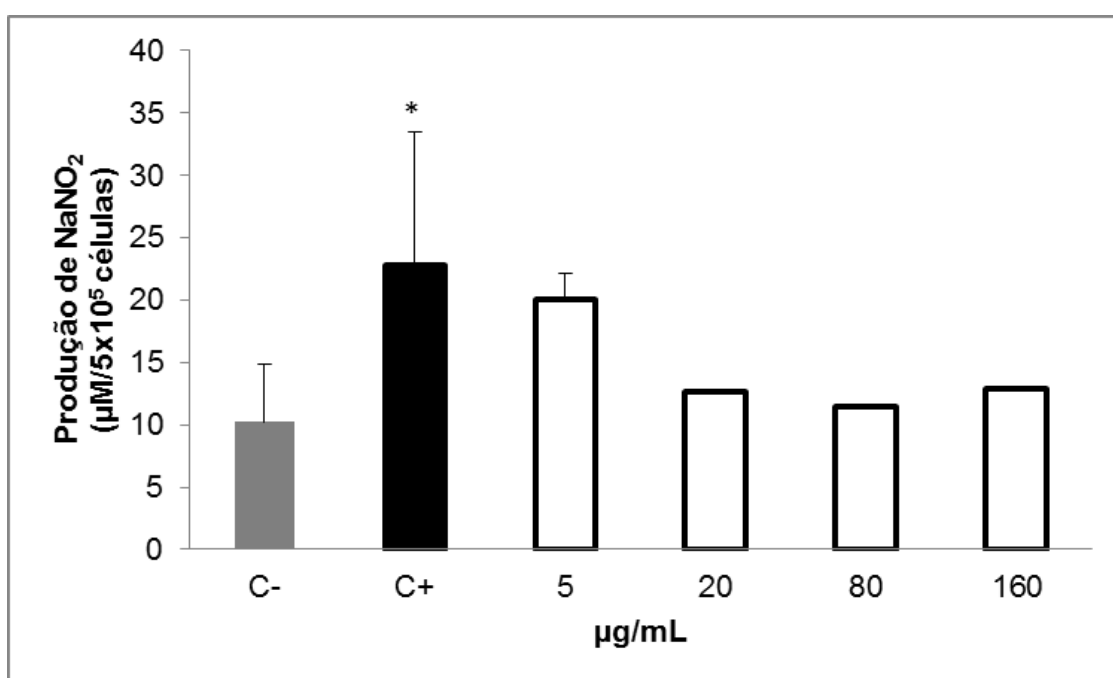


FIGURA 23 –EFEITO DAS FRAÇÕES 1A DE *Physalis peruviana* SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

FONTE: O autor

NOTA: Meio MEM suplementado com 5 % de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 48 h na ausência (meio) e presença da fração, nas concentrações indicadas. O Meio MEM foi utilizado como controle negativo e o LPS (50 ng/mL) como controle positivo. O NO^* produzido foi quantificado no sobrenadante como nitrito (NaNO_2) pelo método de Griess. A absorbância foi medida em 546 nm. Os resultados estão expressos como médias de triplicatas e desvio padrão. Este experimento foi repetido duas vezes em dias alternados. Os resultados não apresentaram diferenças significantes em relação ao controle negativo pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

O NO^* é um radical livre produzido pela enzima NO-sintase (NOS) que promove a conversão da arginina em citrulina. Em macrófagos, esta enzima é encontrada na sua isoforma induzível (iNOS) (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO,

2003). Este radical está intimamente relacionado com a resposta imunológica de macrófagos, pois é considerado o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003). Além disso, o NO^* está relacionado com as propriedades tumorocidas e microbicidas apresentadas pelos macrófagos e também com os eventos de apoptose (BRUNE, 2003).

A citotoxicidade do NO^* pode ser devido a uma ação direta como, por exemplo, a reação com metais que podem estar presente nas enzimas do seu alvo tornando-as inativas. Outra maneira de exibir a sua citotoxicidade é interagindo com compostos liberados durante o processo inflamatório como, por exemplo, os radicais livres potencializando os seus efeitos (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003).

A enzima iNOS é expressa em macrófagos sob condições excepcionais tais como a presença de citocinas e/ou endotoxinas. A sua expressão demora em torno de 48h e libera quantidades maiores de NO^* que as outras isoformas existentes da mesma enzima (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003). A expressão desta enzima pode ser benéfica, quando presente na resposta inflamatória localizada como, por exemplo, em infecções; ou pode ser prejudicial, quando presente em inflamações anormais como, por exemplo, em doenças autoimunes (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

Segundo Franco e colaboradores (2007) as folhas e caules de *P. peruviana* são utilizadas como anti-inflamatórios, no entanto, o artigo comprova a ação anti-inflamatória somente de metabólitos encontrados em folhas e caules, em relação aos frutos, ainda não há relatos na literatura.

O polissacarídeo extraído de frutos de *Lucium ruthenicum* (Solanaceae) estimulou a produção de NO^* em baixas concentrações, embora tenha estimulado a produção em 24 h de tratamento (PENG, *et al.*, 2014).

Segundo Classen e colaboradores (2006), a atividade imunoestimulante pode ser atribuída às AGPs devido a sua capacidade de induzir a produção de NO^* . Tal atividade foi comprovada em AGPs extraídas de *Baptisia tintoria* e *Echinacea pallida* (CLASSEN *et al.*, 2006) e arabinogalactanas tipo II de extratos de *Juniperus scopulorum* (SHEPETKIN *et al.*, 2005) que estimularam a produção de NO^* *in vitro* em macrófagos de camundongo.

4.5.1.4 Retenção de lisossomos

Para avaliar a capacidade fagocítica das células peritoneais de camundongos foi realizado o ensaio com o vermelho neutro. Este teste tem como princípio a captação do corante catiônico vermelho neutro por células previamente tratadas com moléculas, visando identificar as células viáveis (SVENDSEN *et al.*, 2004).

Para células fagocíticas, como é o caso das células utilizadas neste trabalho, a captação do corante é diretamente relacionada com a capacidade fagocítica destas células (CHATURVEDI *et al.*, 1979; CHATURVEDI; GULATI; MATHUR, 1982; STOIKA *et al.*, 2002). Chaturvedi e colaboradores (1979) afirmam que o corante internalizado é digerido por hidrolases, um importante grupo de enzimas que são responsáveis pela digestão de partículas fagocitadas.

Como é possível observar na FIGURA 24, a taxa de fagocitose das células incubadas na presença da fração 1A foi reduzida em todas as concentrações testadas. Nota-se que todas as concentrações testadas apresentaram uma discreta tendência de diminuição na fagocitose, sendo que na maior concentração utilizada, 80 µg/mL esta fagocitose sofreu uma redução significativa em relação ao controle negativo.

Estudos feitos em nosso laboratório por Lenzi (2011) indicaram uma atividade contrária para as extrações aquosas de *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). As frações promoveram o aumento da taxa de fagocitose após 24 h de tratamento seguido de uma queda desta taxa após 48 h de tratamento. Segundo a autora, essa diferença de taxas é devida ao tempo de exposição das células às moléculas, que, no caso, 24 h foram suficientes para ativar a fagocitose. Chaturvedi e colaboradores (1982) encontraram atividades de aumento da fagocitose com somente 1 h de tratamento. Deste modo, são necessários novos experimentos em tempos menores e maiores que 24 h de incubação com a fração 1A para analisar o efeito desta fração sobre a atividade fagocítica.

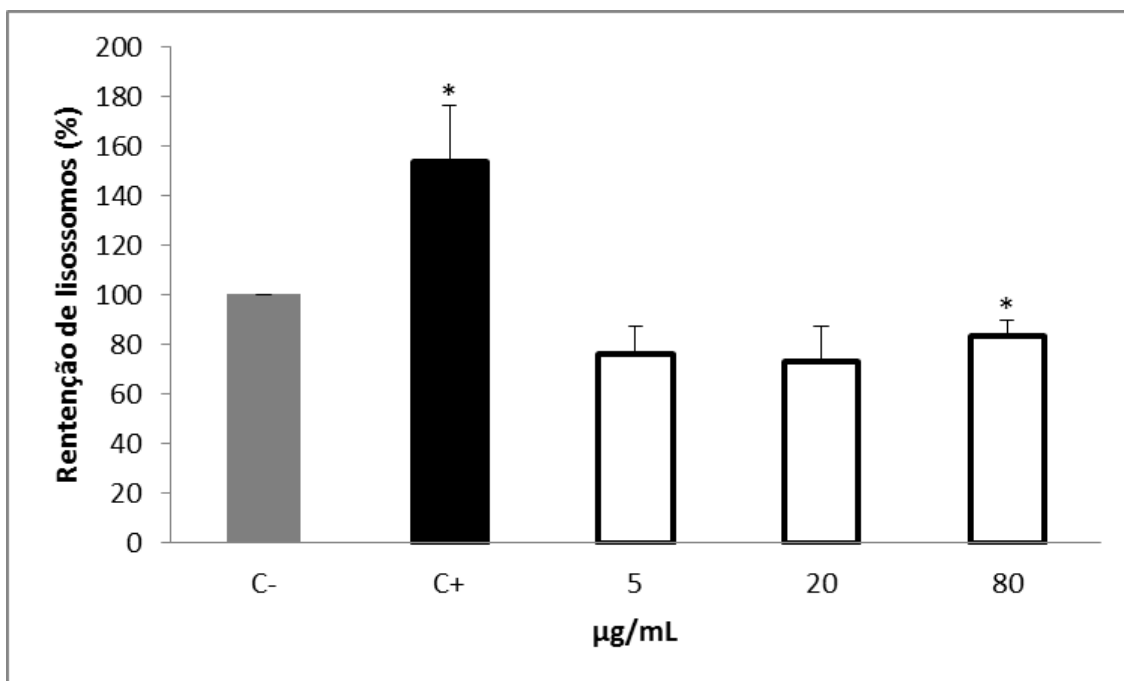


FIGURA 24 –EFEITO DA FRAÇÃO 1A DE *Physalis peruviana* APÓS 24 h DE TRATAMENTO SOBRE A CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE LISOSSOMOS DE CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

FONTE: O autor

NOTA: Retenção de lisossomos avaliada através do teste do vermelho neutro descrito por PIPE *et al.* (1995). Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. As células do lavado peritoneal aderentes foram incubadas por 24 h, na ausência (meio) e presença da fração 1A nas concentrações indicadas. Após incubação, o vermelho neutro foi removido e adicionou-se solução de lise (ácido acético glacial:etanol 50%:água destilada v:v:v). A absorbância foi medida em 550 nm. O valor obtido para o meio foi considerado como retenção de lisossomos basal. Os resultados estão expressos como médias de quadriplicatas. Estes experimentos foram repetidos duas vezes em dias alternados. * Diferença significativa do meio MEM (controle negativo) em relação ao Tukey (p 0,05).

4.5.1.5 Dosagens de citocinas

As citocininas incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e as interleucinas 6 (IL6), 10 (IL10), 1 β (IL1 β) produzidas por células do lavado peritoneal de camundongos após a exposição à fração 1A foram dosadas utilizando-se Kits de ELISA. Os resultados podem ser observados na FIGURA 25.

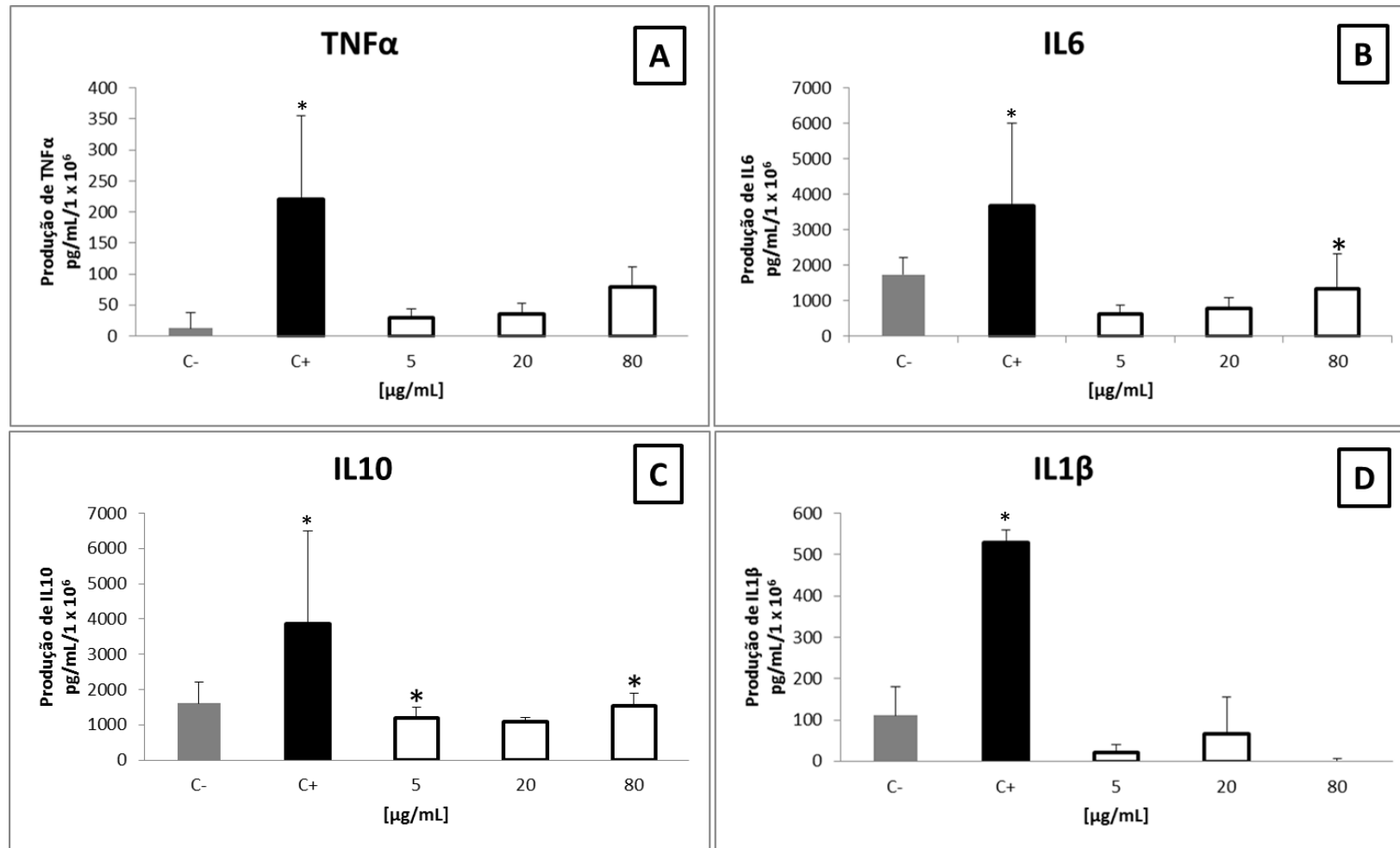


FIGURA 25 -EFEITOS DAS AMOSTRAS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS TNFα (A), IL6 (B), IL10 (C) e IL1β (D) POR CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL INCUBADAS POR 24 h, NA AUSÊNCIA (CONTROLE) E PRESENÇA DA FRAÇÃO DE *Physalis peruviana*.

FONTE: O autor.

NOTA: Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24 h na ausência (meio) e presença da fração 1A nas concentrações indicadas. O meio MEM foi utilizado como controle negativo e o LPS (50 ng/mL) como controle positivo. O sobrenadante foi coletado e utilizado para mensurar, através de kit de ELISA, as quantidades de IL10, IL1β, IL6 e TNFα produzidas. Os resultados estão expressos como médias de quadruplicatas e desvio padrão. Este experimento foi repetido duas vezes em dias alternados. * Diferença significativa do meio MEM (controle negativo) em relação ao Tukey ($p > 0,05$).

O TNF α é o mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas mais importante. No entanto esta citocina também é responsável pelas complicações sistêmicas das infecções graves (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008). O estímulo mais importante para a secreção desta citocina é o LPS que interage com os receptores *Toll-like* (TLR) de macrófagos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008), no entanto, outros componentes de patógenos podem interagir com este receptor levando a produção de TNF α (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT e JANEWAY, 1997).

Em relação à dosagem realizada, a fração 1A promoveu a produção de TNF α com uma aparente dose-dependência, apesar de não haver significância pelo teste Tukey (FIGURA 25A). A concentração mais baixa utilizada (5 μ g/mL) já foi capaz de induzir a produção de TNF α em 230% quando comparado ao controle negativo. A concentração mais alta (80 μ g/mL) induziu 621%. Zhang e colaboradores (2011) observaram que a produção de TNF α após o tratamento de células do baço de ratos Balb/C com o polissacarídeo extraído do fruto de *Lycium barbarum* (Solanaceae) também foi capaz de aumentar de maneira dose-dependente a produção de TNF α . Outros polissacarídeos de frutas como a amora (*Morus alba* – Moraceae) e o morango (*Fragaria ananassa*–Rosaceae) também foram capazes de induzir acima de 600% em comparação ao controle negativo a produção de TNF α (LIU e LIN, 2012).

Na inflamação, macrófagos ativados liberam primeiramente citocinas como o TNF α ou a IL1 β e em seguida induzem a secreção de IL-6 por uma variedade de tipos celulares (KÜNDIG *et al.*, 1993).

A IL6 é umas das citocinas liberadas pelos macrófagos. Sua função efetora é a ativação de linfócitos, induzindo-os a produzir anticorpos e, portanto, é considerada, juntamente com o TNF α , como citocina pró-inflamatória. (MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010). Enquanto o TNF α tem sua ação localizada, a IL6 é secretada com o objetivo de entrar na circulação sanguínea e promover efeitos sistêmicos (HOPKINS, 2003).

A dosagem de IL6 após o tratamento com a fração 1A demonstrou um comportamento semelhante ao observado para o TNF α (FIGURA 25B). Apesar de não haver significância entre as frações, observa-se um aumento da concentração de IL6 com o aumento da concentração da fração utilizada no teste. Os mesmos polissacarídeos de amora e morango testados para a

dosagem de $\text{TNF}\alpha$, também foram testados para a produção de IL6. Como a análise dos resultados, os autores perceberam que assim como o $\text{TNF}\alpha$, a IL6 obteve uma expressão de mais de 1000% em relação ao controle negativo, o que comprova a ação ativadora de macrófago exercida por estes polissacarídeos (LIU e LIN, 2012).

A IL10 é uma citocina inibidora de macrófagos ativados, portanto uma citocina anti-inflamatória (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008). Esta citocina é produzida principalmente por macrófagos ativados e por ser produzida por eles e ao mesmo tempo ter uma ação inibidora nestas células, esta interleucina tem a função de regular o *feedback* negativo dos processos inflamatórios. A ação da IL10 é de promover o término das respostas dos macrófagos e de fazer com que o sistema retorne ao seu estado de repouso (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Na FIGURA 25C, observa-se a produção de IL10 pelas células peritoneais de camundongos após o tratamento com a fração 1A. Analisando o gráfico, verifica-se que já na concentração mais baixa (5 $\mu\text{g/mL}$) há uma diferença significativa em relação ao controle negativo. Os mesmos polissacarídeos de amora e morango citados para $\text{TNF}\alpha$ e IL6, apresentaram um aumento da expressão de IL10 quando comparado ao controle. Os autores sugerem que, mesmo na presença dos polissacarídeos, o balanço entre as citocinas é mantido, pois as moléculas podem agir tanto como indutoras da inflamação como anti-inflamatórias (LIU e LIN, 2012).

A última citocina analisada foi a IL1 β , os resultados podem ser visualizados na FIGURA 25D. Esta citocina é pró-inflamatória com a capacidade de ativar vias similares às aquelas ativadas pelo LPS. Além disso, esta citocina e o $\text{TNF}\alpha$ podem ativar vias inflamatórias que promovem a produção de NO^* e eicosanóides (HOPKINS, 1990).

O tratamento das células do lavado peritoneal de camundongos com a fração 1A não afetou significativamente na produção da IL1 β . A concentração mais alta, 80 $\mu\text{g/mL}$, não induziu a produção de IL1 β . Zhang e colaboradores (2011) observaram que a produção de IL1 β após o tratamento de células do baço de ratos Balb/C com o polissacarídeo extraído do fruto de *Lycium barbarum* (Solanaceae) foi capaz de aumentar de maneira dose-dependente a produção de IL1 β e de $\text{TNF}\alpha$. Este resultado demonstra que a fração 1A induz a

produção de IL10 para a parada das reações de inflamação enquanto que o polissacarídeo de *Lycium barbarum* induz a produção de IL1 β .

4.5.2 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES *IN VITRO*

Para a realização dos testes antioxidantes foram escolhidas as frações 1A, 3A, 5A, 1A (2), 3A (2), 5A (2), 7A (2), 9A (2), 11A (2) e 12A (2) Hemi A. Optou-se por estas frações, pois as composições monossacarídicas em conjunto com os espectros de infravermelho demonstram que há uma semelhança entre as frações obtidas com as condições de extração semelhante.

O teste da formação do complexo fosfomolibdênico inicialmente era feito para determinar o fosfato inorgânico da solução (FISKE e SUBBARROW, 1925). Entretanto, após modificações no método feitas por Chen e colaboradores (1956) Pietro e colaboradores (1999) observaram que qualquer agente redutor que é capaz de produzir molibdênio V [Mo(V)] a partir de molibdênio VI [Mo(VI)] pode ser quantificado por este método, identificando assim, a capacidade antioxidante total das frações.

A FIGURA 26 demonstra a capacidade das frações em formar o complexo fosfomolibdênico. A atividade média das frações foi de 10% e as frações aquosas quentes de ambos os métodos, 3A e 3A (2), são as que apresentam maiores atividades, 29 e 16% respectivamente. Em relação às outras frações, não há diferença entre os dois métodos, visto que as diferenças encontradas foram de 3,7% entre as frações 1A e 1A (2) e 4,3% entre as frações 5A e 5A (2).

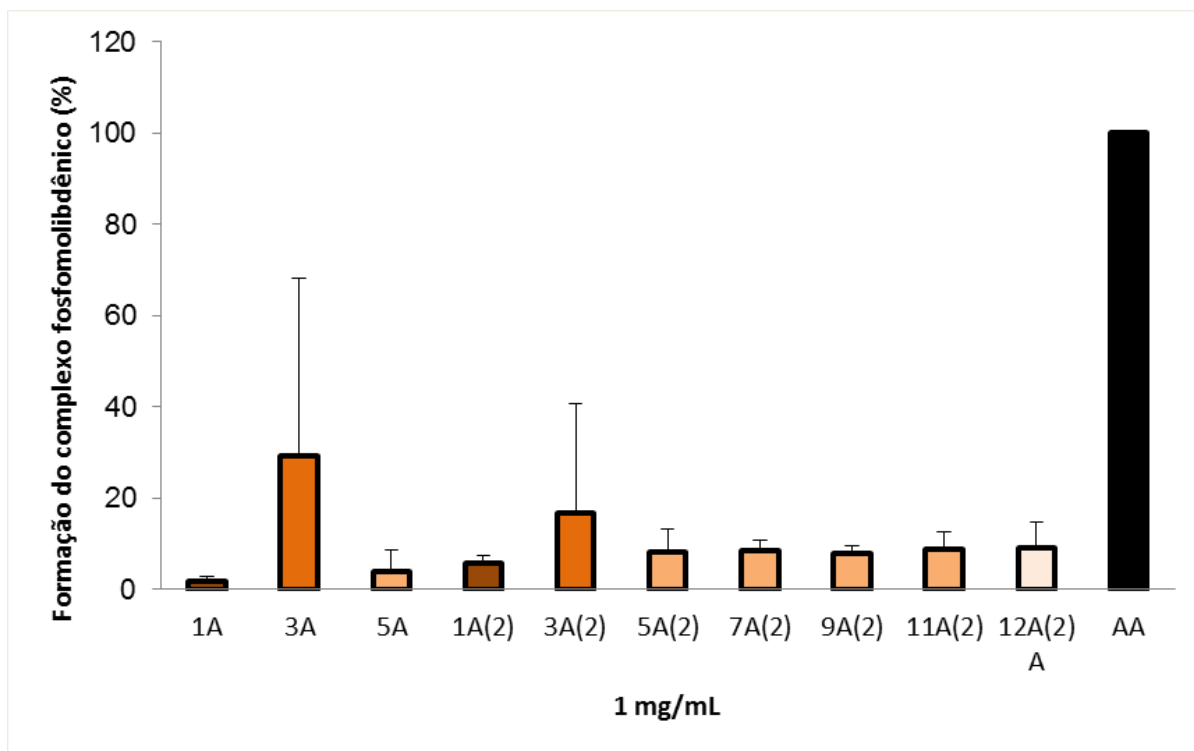


FIGURA 26 –PORCENTAGEM DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO PELAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DE FRUTOS DE *Physalis peruviana*.

NOTAL: Cada barra representa média percentual $\pm$ EPM do poder redutor de 3 experimentos realizados em triplicata, na concentração de 1 mg/mL; AA – ácido ascórbico (1mg/mL)

FONTE: O autor

O teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico tem como objetivo verificar a capacidade das frações em inibir a peroxidação lipídica. A oxidação dos lipídeos de membrana leva a formação de produtos, como por exemplo, o radical alquila ($L^{\bullet}$), o radical alcóxila ($LO^{\bullet}$) e o radical peróxila ($LOO^{\bullet}$) e a consequente perda da função das membranas lipídicas (LIMA e ABDALLA, 2001). Estes produtos da peroxidação têm a capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e formar o malondialdeído (MDA), um composto de coloração avermelhada que pode ser dosado espectrofotometricamente (JIANG *et al.*, 2005).

A FIGURA 27 demonstra o índice de atividade antioxidante em lipídeos de gema de ovo (TBARS) das frações de *P. peruviana*.

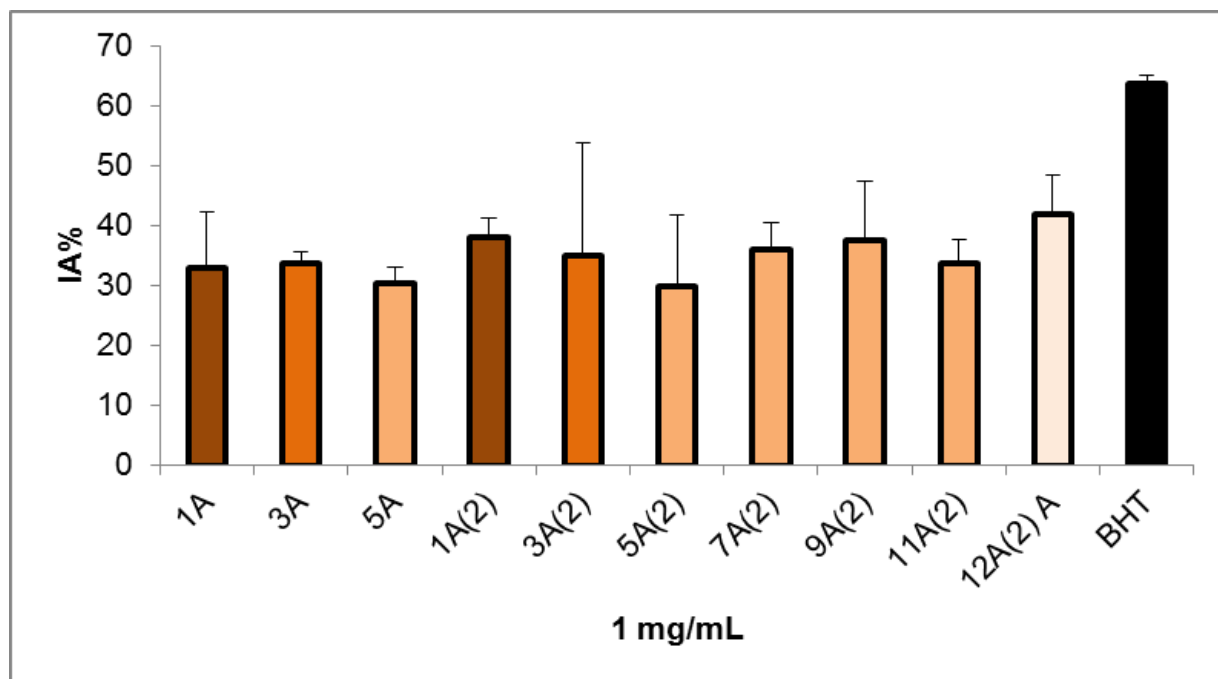


FIGURA 27 -ÍNDICE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE LIPÍDEOS DE GEMA DE OVO DAS FRAÇÕES DE FRUTOS DE *Physalis peruviana*

NOTAL: Cada barra representa média percentual $\pm$ EPM do poder redutor de 3 experimentos realizados em triplicata, na concentração de 1 mg/mL

FONTE: O autor

A atividade média das frações foi de 35% sendo a de maior atividade a fração 12A (2) Hemi A enquanto que o padrão BHT atingiu 64%. Não há grande diferença entre os dois métodos de extração, já que as diferenças encontradas foram de 5% entre as frações 1A e 1A (2), 1,4% entre as frações 3A e 3A (2) e 0,3% entre as frações 5A e 5A (2).

O ensaio da quelação de ferro visa identificar a capacidade das frações em doar um íon e transformar o íon ferroso (Fe^{+2}) em íon férrico (Fe^{+3}). Neste ensaio, o cloreto ferroso (FeCl_2) é utilizado como doador dos íons Fe^{+2} que serão oxidados pelas frações gerando o Fe^{+3} . Após esta reação, o FerroZine é adicionado. Este composto tem a capacidade de se ligar ao Fe^{+2} que não foi oxidado pelas frações, gerando um complexo de cor roxa que pode ser dosado espectrofotometricamente (DECKER e WELCH, 1990).

A FIGURA 28 demonstra o percentual de quelação de ferro atingido pelas frações de *P. peruviana*.

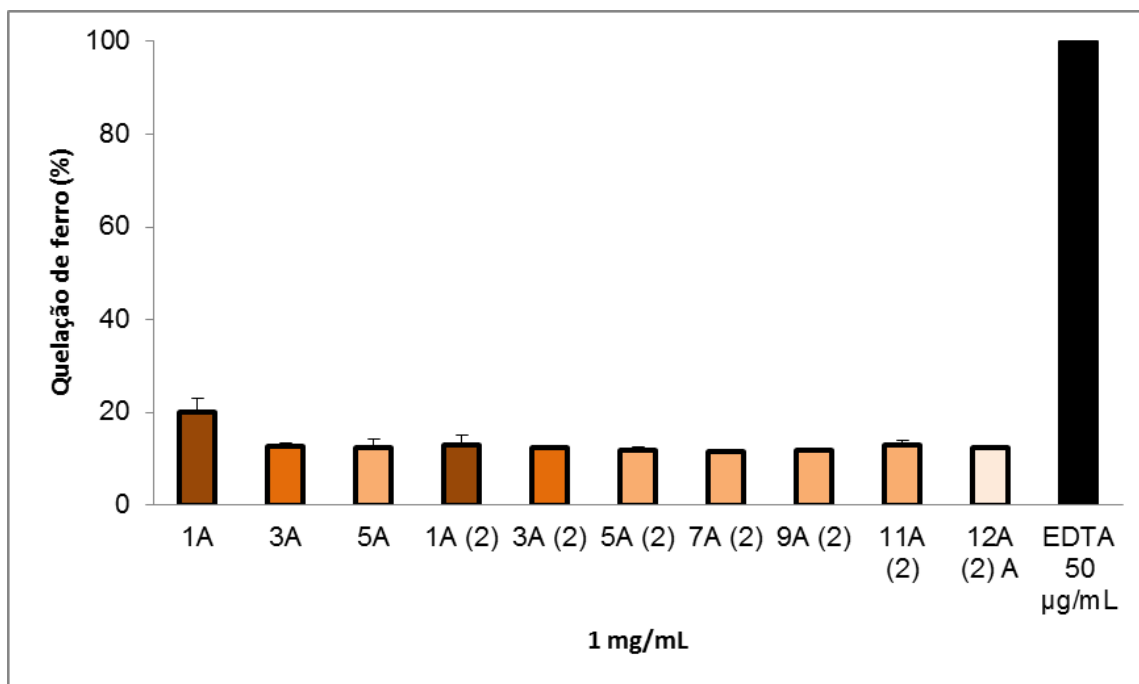


FIGURA 28 –PORCENTUAL DE QUELAÇÃO DE FERRO OBTIDA PELAS FRAÇÕES DE FRUTOS DE *Physalis peruviana*.

NOTAL: Cada barra representa média percentual $\pm$ EPM do poder redutor de 3 experimentos realizados em triplicata, na concentração de 1 mg/mL

FONTE: O autor

A atividade média das frações foi de 13%, sendo que a fração 1A foi a que atingiu maior atividade (20%) em relação ao padrão EDTA. Assim como no teste do TBARS, as frações não apresentaram diferenças entre os dois métodos de extração, uma vez que as diferenças encontradas foram de 7% entre as frações 1A e 1A (2), 0,3% entre as frações 3A e 3A (2) e 1% entre as frações 5A e 5A (2).

Segundo Sati e colaboradores (2010), plantas medicinais são uma fonte natural de compostos antioxidantes. Os metabólitos secundários presentes nestas plantas tais como os flavonoides, compostos fenólicos e polifenólicos demonstram uma atividade antioxidante eficaz (SATI *et al.*, 2010). Kardošová e Machovára (2006) afirmam que a literatura relacionada à atividade antioxidante de metabólitos secundários é extensa e que pouco se sabe sobre esta atividade em polissacarídeos. No entanto, embora de forma menos eficaz, polissacarídeos podem apresentar esta atividade (KARDOŠOVÁ e MACHOVÁRA, 2006).

Atividades antioxidantes em polissacarídeo foram identificadas nos frutos de *Litchi chinensis* (Sapindaceae). Na captação do radical DPPH, este

polissacarídeo mostrou atividade dose-dependente chegando a atingir 54% de atividade. O mesmo polissacarídeo teve atividade 50% na captação do radical hidroxila e 62% na captação do ânion superóxido (YANG *et al.*, 2006)

He e colaboradores (2012) encontraram 80% de inibição da peroxidação lipídica para o polissacarídeo do fruto de *Lycium barbatum* (Solanaceae). Polissacarídeos extraídos de *Althaea officinalis* (Malvaceae) testados para a inibição da peroxidação lipídica atingiram até 30% de inibição (KARDOŠOVÁ e MACHOVÁ, 2006).

Dentro da família Solanaceae existem diversos gêneros de plantas que apresentam atividade antioxidante de captação do radical DPPH pelos seus metabólitos secundários, como por exemplo, a *Lycianthes acutifolia* (37,7%), *Lycianthes radiata* (41,5%), *Solanum* sp. (35,2%) (MOSQUERA, CORRERA e NIÑO, 2009). Ainda dentro desta família, os frutos de *Solanum torvum* apresentaram metabólitos secundários capazes de captar o radical DPPH em aproximadamente 90% e de captar o peróxido de hidrogênio em 86% (WAGHULDE *et al.*, 2011).

No gênero *Physalis*, polissacarídeos extraídos do cálice dos frutos de *P. alkekengi* apresentaram 50% de capacidade de captar o radical DPPH, 80% na captação do radical hidroxila e 66% na captação do ânion superóxido (GE, *et al.*, 2009).

Puente e colaboradores (2011) afirmam que a maior parte da atividade antioxidante encontrada no suco do fruto de *P. peruviana* está relacionada com a presença de polifenóis. Alguns autores encontraram atividade antioxidante do suco do fruto na captação do radical DPPH de 190 a 210% e na redução do ferro uma atividade de até 56% (PUENTE *et al.*, 2011).

Para os métodos testados, as frações obtidas neste trabalho não apresentaram atividade antioxidante expressiva. No entanto Soldera-Silva, (2011) verificou que, a fração 1A em diferentes métodos antioxidantes apresentou atividades maiores. Na determinação do poder redutor, teste com a mesma finalidade do método da formação do complexo fosfomolibdênico, a fração 1A apresentou uma atividade antioxidante de 164,7% na concentração de 800 µg/mL em 40 min de reação.

5. CONCLUSÕES

Como conclusões deste trabalho tem-se que as frações estudadas apresentam características de polissacarídeos pécticos – com variações químicas em relação à composição de carboidratos totais, ácidos urônicos totais, proteínas totais, grupos acetil e fenóis totais, e AGPs.

Houve influência da inativação enzimática na extração das frações, principalmente no conteúdo de AGPs e de carboxilas esterificadas.

A fração 1 A, composta de 30% de carboidratos totais, 10% de AGPs, Ara (18%) e Gal (20%) como monossacarídeos majoritários e 67% de ácidos urônicos, provocou ativação de macrófagos, verificado principalmente pela avaliação morfológica e produção de IL6 e IL10.

A atividade antioxidante foi baixa, quando comparada com padrões comerciais, para os métodos testados independente do tipo de polissacarídeo presente nas frações. No entanto, para outros testes como o do poder redutor, a fração apresentou atividade significativa. No presente trabalho, o melhor resultado foi obtido no teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), onde a média de atividade foi de 35%.

Nas condições testadas em relação as propriedades imunomoduladoras e antioxidante as frações polissacarídicas dos frutos parecem não ter uma influência significativa nas propriedades terapêuticas desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. PILLAI S. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 2. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2008.

AHMAD, S; MALIK, A; AFZA, N; YASMIN, R. A New Withanolide Glycoside from *Physalis peruviana*. **J. Nat. Prod.** V.62, n.3, p. 493-494, 1999.

AKYAMA Y; KATO, K. Na extracelular arabinogalactan-protein from *Nicotiana tabacum*.**Phytochemistry**. V. 20, n. 11, p. 2507-2510, 1981.

ALBAN, S.; CLASSEN, B.; BRUNNER, G.; BLASCHEK, W. Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin.**Planta Medica**, V.12, p.1118-1124, 2002.

ALDRED, E. M. **Pharmacology: A Handbook for Complementary Healthcare Professionals**. p.147, 2009.

ALI, B.H; ZIADA, A; BLUNDEN, G. Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**. V. 47, p. 1–8, 2009.

ANDERSON, A. Antioxidant defeses against reactive oxygen species causing genetic and orher damage.**Mutation Research**. V. 350, p.103-108, 1996.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease.**Journal of the American Oil Chemists' Society**.V. 75, p. 199-212, 1998.

BACIC, A; GELL, A.C; CLARKE, A.E. Arabinogalactan proteins from stigmas of *Nicotiana alata*.**Phytochemistry**. V. 27, n. 3, p. 679-684, 1988.

BARREIROS, A.L.B; DAVID, J.M; DAVID, J.P; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. V. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**. V. 40, p. 845-859, 2014.

BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G; Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. V. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

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

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: na review ofstructure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, V. 148, p. 3-14, 1995.

BRANDÃO, M.G.L; PAULA-SOUZA, J; GRAEL, C.F.F; SCALON, V; SANTOS, A.C.P; SALIMENHA, M.F; MONTE-MOR, R..L.M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais. In: Seminário sobre a Economia Mineira, 2010, Minas Gerais. **Anais do XIV Seminário sobre a Economia Mineira**, 2010.

BRUNE B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? **Cell Death & Differentiation**.V.10, p.864-869, 2003.

BUCKERIDGE, M. **Parede Celular**. Disponível em :<<http://felix.ib.usp.br/pessoal/marcos/fisio2008/PDF/PDF%20TEORICA/Parede%20celular.pdf>>. Acesso em 7 fev. 2014

CAMPBELL, D.; WHITE, J. R. **Polymer Characterization: Physical Techniques**. London: Chapman&Hall, p.50, 1989.

CAMPESTRINI, L.H. Estrutura química, propriedades reológicas e atividades biológicas de carboidratos obtidos de *Aloe barbadensis* Miller. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica, Departamento de Biologia Molecular e Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

CCI. Corporación Colombia Internacional, Sistema de Inteligencia de Mercados. **Perfil producto**. N, 13, 2001.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B.; CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**. V.17, n.6, p.417-423, 2002.

CHATURVEDI, U.C.; MATHUR, A.; TANDON, P.; NATU, S.M.; RAJ-VANSHI, S.; TANDON, H. Variable effect on peripheral blood leucocytes during JE virus infection of man. **Clinical & Experimental Immunology**.V.38, p.492-498, 1979.

CHATURVEDI, U.C.; GULATI, L.; MATHUR, A. Inhibition of E-rosette formation and phagocytosis by human blood leucocytes after treatment with the dengue virus-induced cytotoxic factor.**Immunology**. V.45, n.4, p.679-685, 1982.

CHAVES, A.C; SCHUCH, M.W; ERIG, A.C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciências Agrotécnicas**. V. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

CHEN, P. S., TORIBARA, T. Y., AND WARNER, H. **Anal.Chem.** V. 28, p. 1756–1763, 1956. In PIETRO, P; PINEDA, M; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**.V. 269, p. 337–341, 1999.

CHIDOUH, A; AOUADI, S; HEYRAUD, A. Extraction, fractionation and characterization of water-soluble polysaccharide fractions from myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit. **Food Hydrocolloids**. V. 35, p. 733-739, 2014.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, M. L. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 687-690, 2009.

CLARKE, A. E.; ANDERSON, R. L.; STONE, B. A. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins.**Phytochemistry**, v.18, p.521-540, 1979.

CLASSEN, B.; WITTHOHN, K.; BLASCHEK, W. Characterization of an arabinogalactan-protein isolated from pressed juice of *Echinacea purpurea* by precipitation with the [beta]-glucosyl Yariv reagent.**Carbohydrate Research**. V.327, p.497-504, 2000.

CLASSEN, B.; THUDE, S.; BLASCHEK, W.; WACK, M. BODINET, C. Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from Baptisia and Echinacea.**Phytomedicine**.V.13, p.688-694, 2006.

CORDEIRO, L. M. C.; REINHARDT, V. D.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. D.; BURCI, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: structure and gastroprotective activity. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 937-944, 2012.

CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL. Sistema de Inteligencia de Mercados, **Perfil producto**. N.13, p. 1-14, 2001.

COUTER, J.A; MCCARTHY, H.O; XIANG, J; ROEDL, W; WAGNER, E; ROBSON, T; HIRST, D.G. Nitric oxide - A novel therapeutic for cancer. **Nitric Oxide**. P. 192-198, 2008.

COUPER, K. N.; BOUNT, D. G.; RULEY, E. M. IL10: the máster regulator of immunity to infection. **The Journal Immunology**. V. 180, p. 5771-5777, 2008.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA-JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. V. 50, n. 5, p. 434-461, 2010.

DAAS, D.J.H; MEYER-HANSEN, K; SCHOLS, H.A; RUITER, G.A; VORAGEM, A.G.J. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. **Carbohydrate Research**. V. 318, p. 135-145, 1999.

DECKER, E.A; WELCH, B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. V. 38, p. 674-677, 1990.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 320, n. 3, p. 167-175, 1999.

DEVASAGAYAM. T.P.A.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K; SANE, K. S.; GHASAKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. **Journal of Association of Physicians of India**. V. 52, p. 794-804, 2004.

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

DUSSE, L.M.S; VIEIRA, L.M; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. V. 39, n.4, p. 343-350, 2003.

FACHINETTO, J.M; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira Planta Médica**. V. 11, n. 4, p. 360-367, 2009.

FANG, F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature**. V. 2, p. 820-832, 2004.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**. V. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILIPPOV, M.P. Practical infrared spectroscopy of pectic substances. **Food Hydrocolloids**. V.6, n.1, p.115-142, 1992.

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

FINCHER, G.B; BRUCE, A.S. Arabinogalact an-proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. **Ann. Rev. Plant Physiol**. V.34, p. 47-70, 1983.

FISKE, C.H; SUBBAROW, I.P. **J. Biol. Chem**. V. 66, p.375–379, 1925. In In PIETRO, P; PINEDA, M; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**. V. 269, p. 337–341, 1999.

FKI, I; ALLOUCHE, N. SAYADI, S. The use of polyphenolic extract purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive Mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to syntetic antioxidants. **Food Chemistry**. V. 93, p. 1-8, 2004.

FOGLIO, M.A; QUEIROGA, C.L; SOUSA, I.M.O; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**. V. 7, 2006.

FORSTERMANN, U.; LI, H.; SCHWARTZ, P. M.; KLEINERT, H. NO synthesis and NOS regulation. In: FORMAN, H. J.; FUKUTO, J.; TORRES, M. Signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. **Dordrecht: Kluwer Academic**, P. 119-154, 2003.

FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**. V. 195, p. 93-96, 1991.

FRAGKOSTEFANAKIS, S; DANDACHI, F; KALAITZIS. P. Expression of arabinogalactan proteins during tomato fruit ripening and in response to mechanical wounding, hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**. V. 52, p. 112-118, 2012.

FRANCO, L.A; MATIZ, G.E; CALLE, J; PIZÓN, R; OSPINA, L.F. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. **Biomédica**. V. 27, p. 110-115, 2007.

GAO, Q.P.; KIYOHARA, H.; CYONG, J.C.; YAMADA, H. Characterisation of anti-complementary acidic heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng*. **Carbohydrate Research**. V.181, p.175, 1988.

GAO, Q.P.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Further structural studies of anti-complementary acidic heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng*. **Carbohydrate Research**. V.196, p.111, 1990.

GE, Y; DUAN, Y; FANG, G; ZHANG, Y; WANG, S. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: Isolation, purification, structural features and antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**. V. 77, p. 188-193, 2009.

GERLIER, D; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of immunological Methods**. V.94 n. 1-2, p. 57 – 63, 1986.

GONZÁLES, M.C; OSPINA, L.F; CALLE, J; RICÓN, J. Evaluación de extractos y fracciones de plantas colombianas en modelos de inflamación aguda, subcrónica y crónica. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm**. V. 36, n. 2, p. 166-174, 2007.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**. V. 111, p. 927-930, 2002.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J; SKIPPER, P.L; WISHNOK, J.S; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n.1, p.131-138, 1982.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**. V. 59, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3.ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HE, N; YANG, X; JIAO, Y; TIAN, L; ZHAO, Y. Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits. **Food Chemistry**. V. 133, p. 978-989, 2012.

HESTRIN, S. Analytical application hydroxylamine, and its derivatives with and other carboxylic acid the reaction of acetylcholine. **Journal os Biological Chemistry**. V. 180, p. 249-261, 1949.

HOPKINS, S.J. Cytokines and eicosanoids in rheumatic diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**. V.49, p.207-211, 1990.

HOPKINS, S.J. The pathophysiological role of cytokines. **Legal Medicine**. V.5, p. S45–S57, 2003.

HUSAIN, S.R; CILLARD, J; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids.**Phytochemistry**. V. 26. n. 9. p. 2489-2491, 1987.

JIANG, Y-H; JIANG, X-L; WANG, P; HU, X-K.*In vitro* antioxidant activities of water-soluble polysaccharides extracted from isaria farinosa B05. **Journal of Food Biochemistry**.V. 29, p. 323–335, 2005.

JONES, D.P; Radical-free biology of oxidative stress.**Am J Physiol Cell Physiol**. V. 295, p. C849–C868, 2008.

JOSEPH, G.H. Pectin: Bibliography of pharmaceutical literature, 1956. In SRIAMORNSAK, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review.**Silpakorn University International Journal**. V. 3, p. 206–228, 2003.

JUNIOR, V.F.V; PINTO, A.C; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. V. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KACURÁKOVÁ, M.; WILSON, R. H. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates.**Carbohydrate Polymers**. V.44, p.291–303, 2001.

KACURÁKOVÁ, M.; SMITH, A.C.; GIDLEY, M.J.; WILSON, R.H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**.V.337, p.1147-1153, 2002.

KARDOŠOVÁ, A; MACHOVÁ, E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides.**Fitoterapia**. V. 77, p. 367–373, 2006.

KARNOVSKY, M. L.; LAZDINS, J. K. Biochemical criteria for activated macrophages.**Journal of Immunology**.V. 121, p. 809-813, 1978.

KEHRER, J.P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity.**Toxicology**. V. 149, p. 43–50, 2000.

KHAN, M. M. Role of cytokines. In: **Immunopharmacology**. Editora Springer Science, p. 33-59, 2008.

KIYOHARA, H.; CYONG, J.C.; YAMADA, H. Structure and anti-complementary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa.**Carbohydrate Research**.V.182, n.2, p.259-275, 1988.

KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Structure of an anti-complementary arabinogalactan from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa.**Carbohydrate Research**, v.31, n.193, p.173-192, 1989.

KOHN, R. Binding of toxic cations to pectin, its oligomeric fragmente and plant tissues.**Carbohydrate Polymers**,V. 2, p. 273-275,. 1982

KOŠTÁLOVÁ, Z; HROMÁDKOVÁ, Z; EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity of pectins isolated from the Styrian oil-pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) fruit.**Carbohydrate Polymers**.V. 93, p. 163-171, 2013.

KREUGER, M; HOLST, G-J.Arabinogalactan proteins and plant differentiation.**Plant Molecular Biology**. V. 30, p. 1077-1086, 1996.

KÜNDIG, T. M.; SCHORLE, H.; BACHMANN, M. F.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M.; HORAK, I. Immune responses in interleujin-2-deficient mice. **Science**. V. 262, p. 1059-1061, 1993.

KUNZ, V.T. *Glechon spathulata* Benth: estudo fitoquímico e biológico. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em

Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

LAN, Y H; CHANG, F. R.; PAN, M.J; WU, C.C; WU, S.J; CHEN, S.L; WANG, S.S; WU, M.J; WU, Y.C. New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*. **Food Chemistry**. V. 116, n. 2, p. 462–469, 2009.

LENZI, R.M. Análise química e avaliação da atividade imunomoduladora de frações aquosas obtidas a partir de preparações comerciais de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

LENZI, R.M; CAMPESTRINI, L.H; OKUMURA, L.M; BERTOL, G; KAISER, S; ORTEGA, G.G; GOMES, E.M; BOVO, F; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F; STEVAN-HANCKE, F.R; MAURER, J.B.B. Effects of aqueous fractions of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. on macrophage modulatory activities. **Food Research International**. V. 53, p. 767-779, 2013.

LEUNG, M. Y. K.; LUI, C.; SHI, W.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**. V. 105, p. 101-114, 2006.

LI, X.L; ZHOU, A.G; LI, X.M. Inhibition of *Lycium barbarum* polysaccharides and *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative injury induced by c-irradiation in rat liver mitochondria. **Carbohydrate Polymers**. V. 69, p. 172–178, 2007.

LIMA, E.S; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, C.S.M; SEVERO, J; MANICA-BERTO, R; SILVA, A.J; RUFATO, L; RUFATO, A.R. Características físico-químicas de *Physalis* em diferentes colorações do cálice e sistemas de condução. **Rev. Bras. Frutic**. V. 31, n. 4, p. 1060-1068, 2009.

LIU, C-J; LIN, J-Y. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of strawberry and mulberry fruit polysaccharides on lipopolysaccharide-stimulated macrophages through modulating pro-/anti-inflammatory cytokines secretion and Bcl-2/Bak protein ratio. **Food and Chemical Toxicology**. V. 50, p. 3032-3039, 2012.

MAJEWSKA-SAWKA, A; NOTHNAGEL, E.A. The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development. **Plant Physiology**. V. 122, p. 3–9, 2000.

MAJUMDER, K; MAZUMDAR B.C. Changes of pectic substances in developing fruits of cape-gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in relation to the enzyme activity and evolution of ethylene. **Scientia Horticulturae**. V.96, p. 91–101, 2002.

MARCHESE, J.A; MING, L.C; FRANCESCHI, L; CAMOCHENA, R.C; GOMES, G.D.R; PALADINI, M.V; CAPELIN, D; MARCHESE, C.F. Medicinal plants used by “Passo da Ilha” rural community in the city of Pato Branco, southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. V.81, n.4, p. 691-700, 2009.

MATULOVÁ, M.; CAPEK, P.; KANEKO, S.; NAVARINI, L.; LIVERANI, L. S. Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of *Coffea arabica* instant coffee powder. **Carbohydrate Research**. V. 346, p. 1029-1036, 2011.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. J. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**. V.388, p.394-397, 1997.

MENESTRINA, J. M.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; STUELP, P. M.; MACHADO, M. J.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. Partial characterization and anti-tumoral activity of the polysaccharide from cashew gum. In: SBBq, 25., 1996, Caxambu. **Anais da XXIXª Reunião Anual da SBBq**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1996. p. 116.

MEYER, L. H. **Food Chemistry**. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1960. p. 105-107, 219.

MICHAELSEN, T. E.; GILJE, A.; SAMUELSEN, A. B.; HOGASEN, K.; PAUSEL, B. S. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. Scandavian **Journal of Immunology**. V.52, p.483-490, 2000.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**. V. 11, p. 266–277, 2008.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **Journal of the royal society of medicine**. V. 92, p. 164-169, 1999.

MONSOOR, M.A; KALAPATHY, U; PROCTOR, A. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. V. 74, p. 233-238, 2001.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. V.65, p. 55 - 63, 1983.

MOSQUERA, O.M., CORRERA, Y.M; NIÑO, J. Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 19, n. 2^a, p. 382-387, 2009.

MUNIZ, J., KRETZSCHMAR, A.A., RUFATO, L., PELIZZA, T.L., MARCHI, T., DUARTE, A.E., LIMA, A.P.F., GARANHANI, F. Sistemas de condução para o cultivo de *Physalis* no planalto catarinense. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal – SP**. V. 33, n. 3, p. 830-838, 2011.

MUÑOZ, C.E; VERGEL, N.E; ARAGÓN, D.M; OSPINA, L.F. Efecto antinociceptivo de *Critoniella acuminata*, *Physalis peruviana* y *Salvia rubescens*. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm**. V. 38, n. 1, p. 31-41, 2009.

MURPHY, K; TRAVERS, P; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NERGARD, C. S., DIALLO, D., INNGJERDINGEN, K., MICHAELSEN, T. E., MATSUMOTO, T., KIYOHARA, K., YAMADA, H., PAULSEN, B.S. 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**. V. 96, p. 255–269, 2005.

NASCIMENTO, G.E. Caracterização da estrutura química e avaliação da atividade antinociceptiva de polissacarídeos extraídos da polpa de *Solanum betaceum*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica, Departamento de Biologia Molecular e Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NUNES-PINHEIRO, D.C.S; LEITE, A.K.R.M; FARIAS, V.M; BRAGA, L.T; LOPES, C.A.P. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciência Animal**. V. 13, n. 1, p. 23-32, 2003.

OKUMURA L. Arabinogalactanas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OVODOV, Y. S. Current Views on Pectin Substances. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**. V. 35, n. 3, p. 269–284, 2009.

PARDO, J.M; FONTANILHA, M.R; OSPINA, L.F; ESPINOSA, L. Determining the Pharmacological Activity of *Physalis peruviana* Fruit Juice on Rabbit Eyes and Fibroblast

Primary Cultures. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. V. 49, n. 7, p. 3074-3079, 2008.

PAULSEN, B.S. Plant Polysaccharides with Immunostimulatory Activities. **Current Organic Chemistry**. V.5, n.9, p.939-950, 2001.

PAULSEN, B.S; BARSETT, H. Bioactive Pectic Polysaccharides. **Adv Polym Sci**. V. 186, p. 69–101, 2005.

PENG, Q; XU, Q; YIN, H; HUANG, L; DU, Y. Characterization of an immunologically active pectin from the fruits of *Lycium ruthenicum*. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 64, p. 69– 75, 2014.

PETKOWICZ, C.L.O; MILASA, M; MAZEAU, K; BRESOLINA, T; REICHERB, F; GANTERB J.L.M.S; RINAUDOA, M. Conformation of galactomannan: experimental and modelling approaches. **Food Hydrocolloids**. V.13, p. 263–266, 1999.

PETOLINO, F.A; WALSH, C; FINCHER, G.B; BACIC, A. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. **Nature America**. V. 7, n.9, p. 1590-1607, 2012.

PHILLIPS, H. J. **Dye exclusion tests for cell viability**. Tissue Culture: Methods and Applications. Academic Press, New York, v. 406, 1973.

PIPE, R. K; COLES, J.A; FARLEY, S.R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Tech Fish Immunol**. V. 4, p. 93-100, 1995.

POZZOLINI, M.; SCARFI, S.; BENATTI, H.; GIOVINE, M. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. **Analytical Biochemistry**, v.313, p.338-341, 2003.

PIETRO, P; PINEDA, M; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**. V. 269, p. 337–341, 1999.

PRYOR, W.A. OXY-RADICALS AND RELATED SPECIES: Their Formation, Lifetimes, and Reactions. **Ann. Rev. Physiol**. V. 48, p. 657—67, 1986.

PUENTE, L.A; PINTO-MUÑOZ, C.A; CASTRO, E.S; CORTÉS, M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**. V. 44, p. 1733–1740, 2011.

QUISPE-MAURÍCIO, A; CALLACONDO, D; ROJAS, J; ZAVALA, D; POSSO, M; VAISBERG, A. Actividad Citotóxica de *Physalis Peruviana* (Aguaymanto) en cultivos celulares de Adenocarcinoma Colorectal, Próstata y Leucemia mieloide crónica. **Rev. Gastroenterol**. V. 29, n. 3, p. 239-246, 2009.

RAI, S.K. Medicinal Plants used by Meche People of Jhapa District, Eastern Nepal. **Our Nature**. V. 2, p. 27-32, 2004.

RAMADAN, M.F; MOERSEL, J.T. Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice. **J Sci Food Agric**. V. 87, p. 452–460, 2007.

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. **Biochemical Pharmacology**. V. 55, p. 803–810, 1998.

ROCKENBACH. I.I; RODRIGUES, E; CATANEO, C; GONZAGA, L.V; LIMA, A; MANCINI-FILHO, J; FETT, R. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alim. Nutr**. V.19, n.3, p. 271-276, 2008.

ROITT, I. M.; MALE, D. K.; BROSTOFF, J. **Imunologia**. 6.ed. São Paulo: Manole, p. 481, 2003.

ROSENBOHM, C; LUNDT, I; CHRISTENSEN, T.M.I.E; YOUNG, N.W.G. Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by ^1H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. **Carbohydrate Research**. V. 338, p. 637-649, 2003.

RUMYANTSEVA, N. Y. Arabinogalactan Proteins: Involvement in Plant Growth and Morphogenesis. **Biochemistry**. V.70, n.10, p.1073-1085, 2005.

SABAT, R.; GRÜTZ, G.; WARSZAWSKA, K.; KIRSCH, S.; WITTE, K.; GEGINAT, J. Biology of interleukin-10. **Cytokine and Growth Factor Reviews**. V. 21, n. 5, p. 331-344, 2010.

SAMUELSEN, A. B.; DJAHROMI, J. M.; PAULSEN, B.S.; WOLD, J. K. KNUTSEN, S. H. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. **Carbohydrate Polymers**. V.38, p.133-143, 1999.

SAMUELSEN, A. B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. – a review. **Journal of Ethnopharmacology**. V.71, p.1-21, 2000.

ŠANDULA, J.; KOGAN, G.; KACURÁKOVÁ, M.; MACHOVA, E. Microbial (1→3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, V.38, p.247-253, 1999.

SANTA, H. S. D.Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo em estado sólido. Tese de mestrado apresentada ao Programa de Processos Biotecnológicos, Departamento de Saúde Humana e Animal, Universidade Federal do Paraná, 2006.

SATI, S.C; SATI, N; RAWAT, U; SATI, O.P. Medicinal plants as a source of antioxidants. **Research Journal of Phytochemistry**. V 4, n. 4, p. 213-224, 2010.

SCHEPETKIN, I. A.; FAULKNER, C. L.; NELSON-OVERTON, L. K.; WILEY, J. A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **International Immunopharmacology**. V.5, n.13-14, p.1783-1799, 2005.

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

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F; SILVA, F. O.; FILHO, J. L. L.; LEÃO, A. M. A. C.; PORTO, A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**. V.36, n.1, p.149-154.
SEIFERT, G.J; ROBERTS, K.The Biology of Arabinogalactan Proteins. **Annu. Rev. Plant Biol.** V. 58, p. 137–61, 2007.

SEVERO, J. Principais propriedades nutraceuticas e compostos fitoquímicos de *Physalis*. Disponível em <http://fruticultura.cav.udesc.br/wp-content/uploads/2012/04/joseana_severo.pdf>. Acesso em 12 mai, 2012.

SHEU, S. C.; LAI, M. H. Composition analysis and immune-modulatory effect of okra (*Albemoschus esculentus*) extract. **Food Chemistry**. V. 134, n. 4, p. 1906-1911, 2012.

SHOWATER, A.M. Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. **The Plant Cell**. V. 5, p. 9-23, 1993.

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

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** V. 215, p. 213-219 1993.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Ver. Bras.Farmacognosia**. V. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SINGLETON V.L; ROSSI, A.J.A. Colorimetry of total phenolics withphosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.**Amer. J. Enol. Viticult**.V. 16, p. 144-58, 1965.

SINGTHONG, J. et al. Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krue Ma Noy (Cissampelos pareira) pectin.**Carbohydrate Polymers**. V. 58, p. 391-400, 2004.

SOLDERA-SILVA, A; Atividade antioxidante da fração aquosa do fruto de *Physalis peruviana* L. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Setor de Ciências Biológicas da Universidade Positivo, Curitiba, 2011.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review.**Silpakorn University International Journal**. V. 3, p. 206–228, 2003.

STEVAN, F. R., MENESTRINA, J. M., VEIGA, S., IACOMINI, M., OLIVEIRA, M. B. M., Biological activities of polysaccharides from gum A. occidentale exsudate against Hela cells.In: SBBq, 29., 2000, Caxambu. **Anais da XXIXª Reunião Anual da SBBq**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000. P. 111.

STEVAN, F.R., MENESTRINA, J.M., ABUD, A.P. R., VEIGA, S., IACOMINI, M., OLIVEIRA, M.B.M., Biological activities of polysaccharides from cashew gum and palm gum against HeLa cells. In: SBBq, 30., 2001, Caxambu. **Anais da XXIXª Reunião Anual da SBBq**, 2001.

STOIKA, R. S.; LUTSIK, M. D.; BARSKA, M. L.; TSYRULNYK, A. A.; KASHCHAK, N. I. In vitro studies of activation of phagocytic cells by bioactive peptides.**Journal of Physiology and Pharmacology**. V. 53, n. 4, p. 675-688, 2002.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J.; HANKARD, P. L.; WEEKS, J. M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and environmental safety**. V. 57, n. 1, p. 20-29, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4 ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2006.

THUDE, S.; CLASSEN, B.; BLASCHEK, W.; BARZ, D.; THUDE, H. Binding studies an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* to leucocytes.**Phytomedicine**. V. 13, p. 425-427, 2006.

TISCHER, C. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. Structure of the arabinogalactan from gum tragacanth (*Astragalus gummifer*). **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 18, p. 1647-55, 2002.

TOMASSINI, T.C.B; BARBI, N.S; RIBEIRO, I.M; XAVIER, D.C.D. Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**. V. 23, n. 1, p. 47-57, 2000.

TONG, H; LIANG, Z; WANG, G. Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. **Carbohydrate Polymers**.V. 71, p. 316–323, 2008.

VAN-HOLST, G-J; CLARKER, A.E. Quantification of Arabinogalactan-Protein in Plant Extracts by Single Radial Gel Diffusion.**Analytical Biochemistry**, V. 148, p. 446-450, 1985.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. Rio de Janeiro: Ed. Campus. p.141-156, 1981.

VORAGEN, A.G.J; PILNIK, W; THIBAUT, J.F; AXELOS, M.A.V; RENARD, C.M.G.C. **Pectins**. **Food Science and Technology**. P. 287-287, 1995.

VRIESMAN, L.C. Extração, caracterização e aspectos reológicos de polissacarídeos da polpa dos frutos de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VRIESMANN, L.C; SILVEIRA J.L.M; PETKOWICZ C.L.O. Chemical and rheological properties of a starch-rich fraction from the pulp of the fruit cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Materials Sci. Eng.** V. 29, p. 651 – 656, 2009.

WAGHULDE, H; PATANKAR, K.P; JAISWAL, B; PATTANAYAK, S; BHAGAT, C; MOHAN, M. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of seeds of *Punica Granatum* (Punicaceae) and *Solanum torvum* (Solanaceae). **Pharmacologyonline**. V.1, p. 193-202, 2011.

WAGNER, H.; STUPPNER, H.; SCHAFER, W.; ZANK, M. A. Immunologically active polysaccharides of Echinacea purpurea cell cultures. **Phytochemistry**. V. 27, p.119-126, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/>. Acesso em 20 fev, 2014.

WINNING, H; VIERECK, N; NØRGAARD, L; LARSEN, J; ENGELSEN, S.B. Quantification of the degree of blockiness in pectins using ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Hydrocolloids**. V. 21, p. 256-266, 2007.

WOLKERS, W. F.; OLIVER, A. E; TABLIN, F.; CROWE, J. H.A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. **Carbohydrate Research**. V.339, p.1077-1085, 2004.

WU, S-J; NG, L-T; HUANG, Y-M; LIN, D-L; WANG, S-S; HUANG, S-N; LIN, C-C. Antioxidant Activities of *Physalis peruviana*. **Biol. Pharm. Bull.** V. 28, n. 6, p. 963-966, 2005.

WU S.J; TSAI J.Y; CHANG, S.P; LIN, D.L; WANG S.S; HUANG S.N; NG, L.T. Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 108, p. 407–413, 2006.

WU, S-J; NG, L-T; LIN, D-L; HUANG, S-N; WANG, S-S; LIN, C-C. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. **Cancer Letters**. V. 215, p. 199–208, 2004.

YAMASSAKI, F.T. Caracterização química, atividade imunomoduladora e antioxidante de extratos aquosos e hidroalcoólicos da goma de exsudato vegetal de *Anacardium occidentale* L. e de folhas de *Persea americana* Mill. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

YANG, B; WANG, J; ZHAO, M; LIU, Y; WANG, W; JIAN, Y. Identification of polysaccharides from pericarp tissues of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in relation to their antioxidant activities. **Carbohydrate Research**. V. 341, p. 634–638, 2006.

YARIV, J; RAPPORT, M.M; GRAF, L. The Interaction of Glycosides and Saccharides with Antibody to the Corresponding Phenylazo Glycosides. **Biochem. J.** V. 85, n. 383, p. 1961-1962, 1962.

TONG, H; WANG, R; LIU, X; WANG, G; DU, F; ZENG, X. Structural characterization and in vitro inhibitory activities in P-selectin-mediated leukocyte adhesion of polysaccharide fractions isolated from the roots of *Physalis alkekengi*. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 49, p. 210–217, 2011.

ZAVALA, D; QUISPE, A; POSSO, M; ROJAS, J; VAISBERG, A. Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. **An Fac Med Lima**. V. 67, n. 4, p. 283-289, 2006.

ZHANG, X.R; ZHOU, W.X; ZHANG, Y.X; QIA, C.H; ZHONG, H.Y; WANG, F; WANG, B. Macrophages, rather than T and B cells are principal immunostimulatory target cells of *Lycium barbarum* L. polysaccharide LBPF4-OL. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 136, p. 465– 472, 2011.

ANEXOS