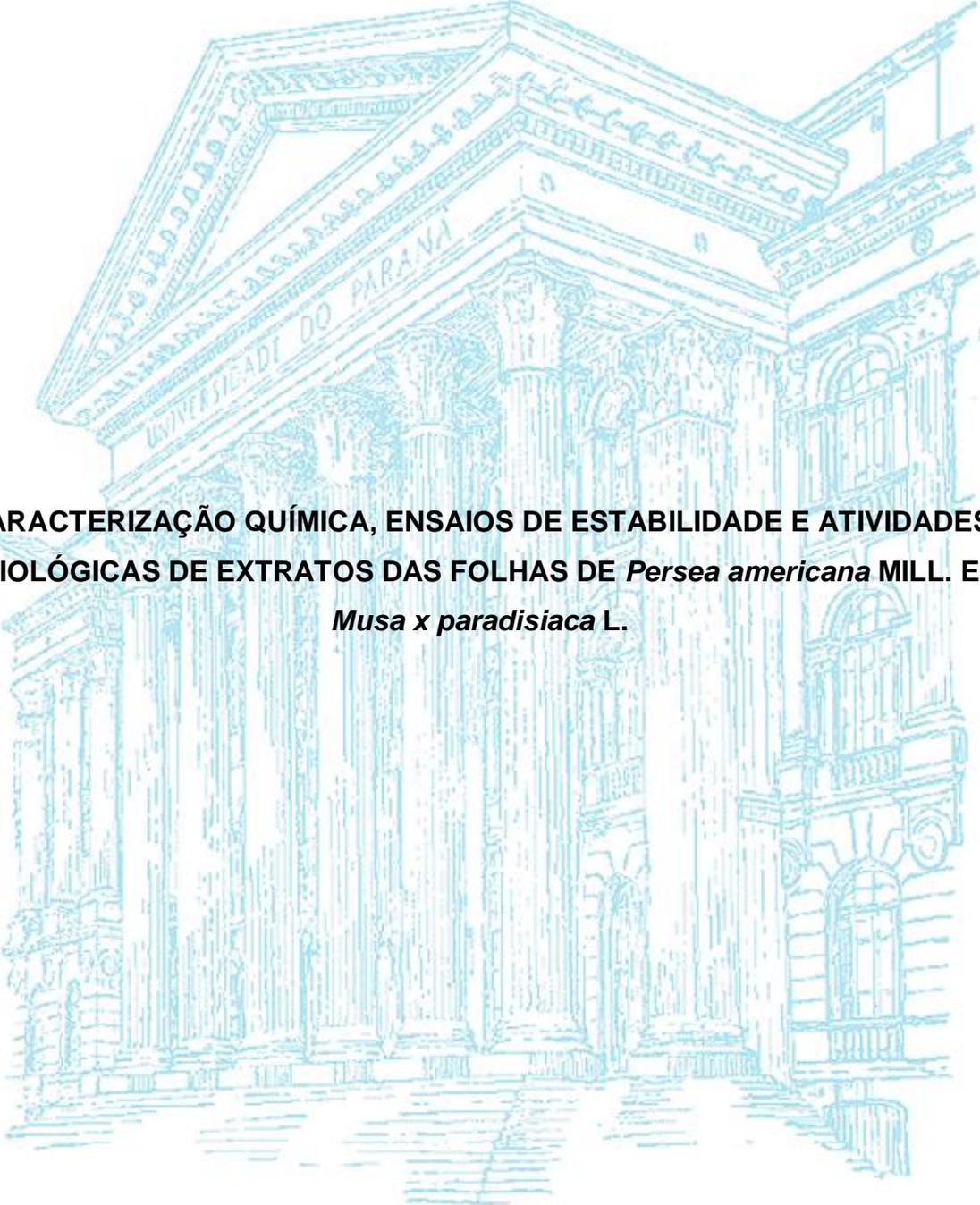


FÁBIO TOMIO YAMASSAKI

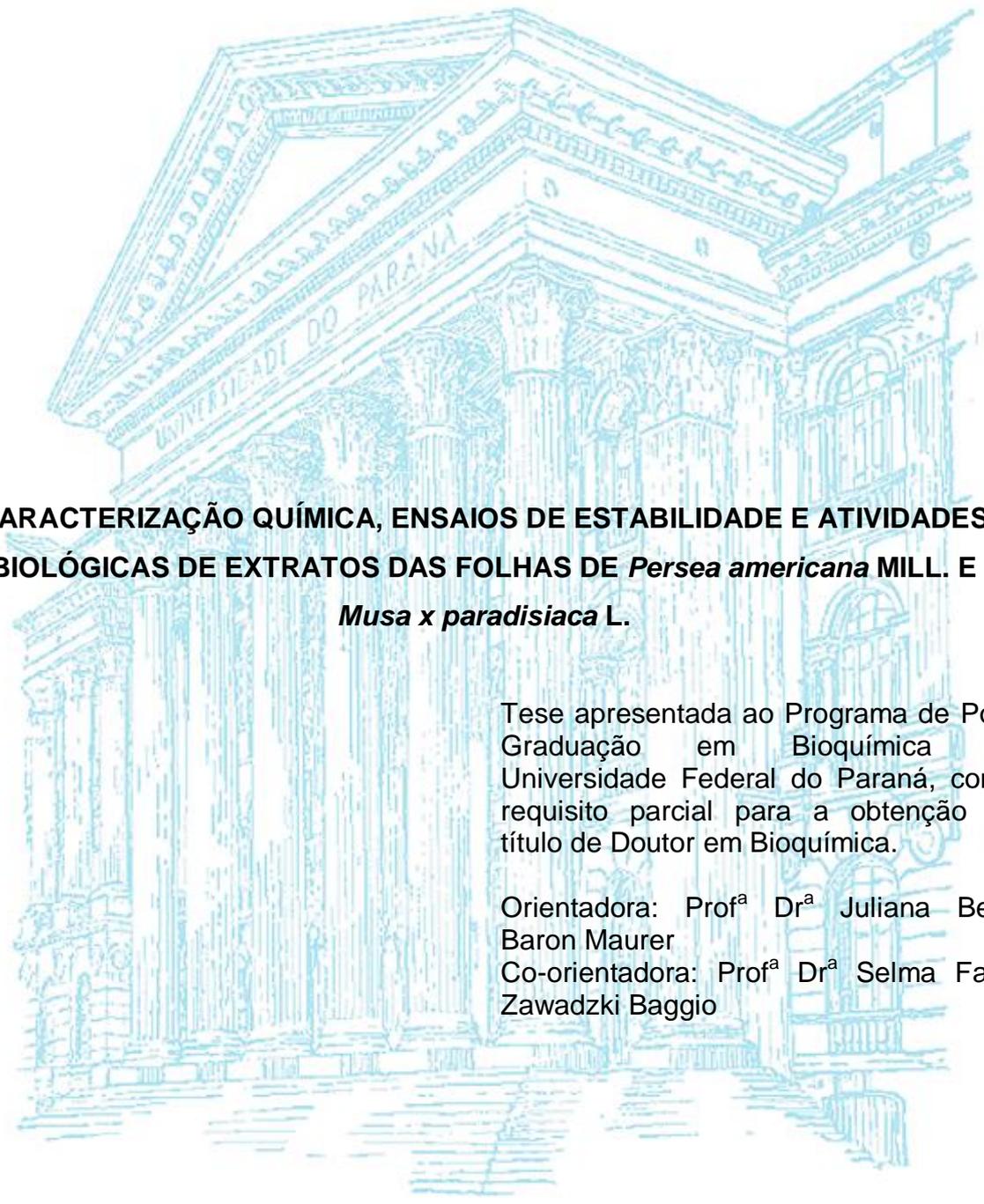


**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ENSAIOS DE ESTABILIDADE E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Persea americana* MILL. E
Musa x paradisiaca L.**

CURITIBA

2017

FÁBIO TOMIO YAMASSAKI



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ENSAIOS DE ESTABILIDADE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Persea americana* MILL. E *Musa x paradisiaca* L.

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Bello Baron Maurer
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Selma Faria Zawadzki Baggio

CURITIBA

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)
Código CAPES: 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **FABIO TOMIO YAMASSAKI**, intitulada: "**Caracterização química, ensaios de estabilidade e atividades biológicas de extratos das folhas de *Persea americana* Mill e *Musa x paradisiaca* L**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

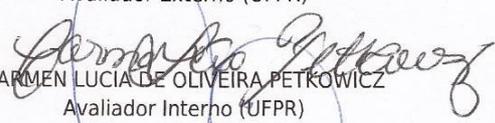
CURITIBA, 27 de Abril de 2017.



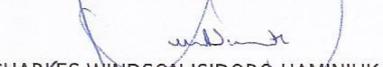
JULIANA BELLO BARON MAURER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



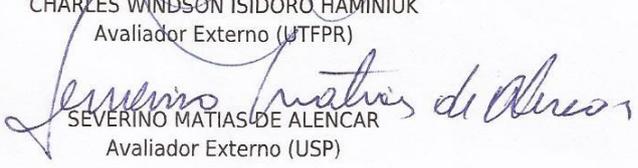
BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALÉS MAIA
Avaliador Externo (UFPR)



CARMEN LUCIA DE OLIVEIRA PETKOWICZ
Avaliador Interno (UFPR)



CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK
Avaliador Externo (UFPR)



SEVERINO MATIAS DE ALENCAR
Avaliador Externo (USP)

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Juliana Bello Baron Maurer e Selma Faria Zawadzki Baggio por todo o apoio e ensinamentos durante esse longo processo formativo. Pra mim, serão sempre exemplos de conduta, exemplos de orientadores, pesquisadores, professores, mães, mulheres. Exemplos de pessoas.

Ao Doutor Luciano Henrique Campestrini por me ensinar muito como lidar com a ciência, deparar com os enigmas, localizar os atalhos, superar as dificuldades e gozar do conhecimento. E que precisamos ser esforçados e levar o serviço a sério.

Ao grupo NUPPLAMED e todos que fizeram e ainda fazem parte. Desde alunos de iniciação científica aos professores, em especial às meninas Andressa, Melina, Vanessa e Raquely por toda amizade, ensinamentos e experimentos compartilhados. Fazem o laboratório sempre mais descontraído sem nunca perder a produtividade.

À Doutora Fernanda Bovo pelas sempre boas conversas. Uma profissional batalhadora e exemplar.

À professora Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz, pelo exemplo de pesquisador e acompanhamento do trabalho, com correção e sugestões sempre muito pertinentes.

Ao professor Marcos Lucio Corazza, por aceitar acompanhar o estudo como banca interna e pelas necessárias correções.

Ao professor Aguinaldo Jose do Nascimento, que com muita gentileza e bom humor, ensinou-me um pouco sobre como interpretar a ciência.

Ao Doutor Arquimedes pela amizade, churrascos, bate papos sobre futebol e pelas análises no ressonância.

À Eliz e Rosane por facilitar vida da pós-graduação, operando o HPSEC e o GC.

À minha família, mãe Mary, pai Roberto e irmãos Hugo, Gustavo (e o Bola) e Marília. E especialmente para a minha batian Emilia. Estaremos sempre juntos.

À minha amada namorada Fernanda que me apoia em todos os momentos. Um anjo na minha história. Parceria pra vida toda.

Ao Fernando e Bruno. Pra sempre irmãos metralhas.

À família Biologia: Thiaguinho, Pepino, Cami, Toni, Diegão, Joyce, Vini, Ká, Van, Samuel, Carol, Dani, Fer amigos de turma. Ao Fabrício, Andréas, Clarissa e Aninha, Rasta, Croto, Ike, Beluga, Luquinhas, Carlinhos, Levek, Flavinha, Tim, Coxa, Amandinha e Indião parceiros de muitas histórias. E os mais novos, Bong, Jere, Dudinha, Dicesar, Luana e Luquinhas.

Ao Vini, Álvaro, Sandra, Erik, Willian, Ivone e tia Marineide pelas conversas e ideias durante o cafezinho.

À família da vila. Ertão, Ferpa, Davidsan, Thiaguin, Wellitrons, Juninho, Vitão, Anderson e Danis. E a Zeza. Napa, Juliano, Tchuca, Chile, Yae, Mi e Leozinho.

Aos amigos colegas de pós-graduação, Alex, Georgia, Mari, Lauro, Kimura, Luis, Cícero, Marco, Anelis, Joseph, Thiago, Vanessa, Denny, Thalita, Robson, Dani, Monique pela parceria e amizade.

Aos demais professores, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica pela grande oportunidade e incentivo.

A Capes e PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

À UFPR pela estrutura, oportunidade e ensino.

“Pelo menos uma vez na vida,
arrisque-se em uma ponte perigosa”

Provérbio japonês

RESUMO

Persea americana (abacateiro) e *Musa x paradisiaca* (bananeira) são espécies cultivadas em todo o globo. Suas folhas são comumente utilizadas na produção de extratos ditos terapêuticos, sendo já relatada a presença de moléculas bioativas como compostos fenólicos em ambas as espécies e uma arabinogalactana-proteína (FRAGP) para o abacateiro. Na presente tese foram avaliadas a composição química de compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de ambas as espécies. Além disso, para as folhas de *P. americana*, foi realizado um estudo sobre a estabilidade dos compostos fenólicos frente a diferentes condições experimentais e outro sobre a avaliação da FRAGP sobre a modulação da via clássica do sistema complemento. Extratos hidroalcoólicos das folhas do abacateiro (EHP) e bananeira (EHM) apresentaram altos teores de carboidratos ($508,5 \pm 85,8$ e $646,1 \pm 59,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente) e compostos fenólicos ($237,1 \pm 25,1$ e $119,2 \pm 1,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente). As concentrações de proteínas ($124,6 \pm 25,4$ e $112,1 \pm 20,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, para EHP e EHM, respectivamente) e ácidos urônicos ($10,6 \pm 2,7$ e $9,7 \pm 3,6$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, para EHP e EHM, respectivamente) foram baixos e semelhantes para ambas os extratos. Devido a maior concentração de compostos fenólicos, a atividade antioxidante da extrato EHP foi maior do que em EHM pelos métodos *in vitro* de captação do radical DPPH (EC50% $57,8 \pm 5,4$ e $194,3 \pm 5,3$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) e poder redutor. Pelo menos 19 compostos fenólicos em EHP, em sua maioria flavonoides (flavan-3-ols e flavonols glicosilados), foram identificados por CL-EM. Altas temperaturas de secagem das folhas de *P. americana* reduziram significativamente a concentração de compostos fenólicos de extratos resultantes. A concentração de compostos fenólicos variou de $130,0 \pm 7,6$ a $233 \pm 36,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, sendo maior na extrato de folhas liofilizadas e menor na extrato de folhas secas à temperatura de 90 °C. O poder redutor e a captação de radicais DPPH (EC50% $53,4 \pm 1,1$ a $110,4 \pm 11,8$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o extrato S60 e S100, respectivamente) também foi diminuído em extratos submetidos à altas temperaturas de secagem. Além disso, em solução, os compostos fenólicos de *P. americana* apresentam grande estabilidade quando submetido às altas temperaturas ou estocagem. Altas temperaturas não foram capazes de alterar a concentrações de compostos fenólicos ($197,4 \pm 9,5$ a $259,3 \pm 28,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$), atividade de captação do radical DPPH ($61,5 \pm 1,7$ a $77,8 \pm 8,1$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) e poder redutor, do extrato EHP. A mesma estabilidade foi observada quando EHP foi submetido à estocagem em refrigerador 4 °C (fenólicos de $201,6 \pm 8,0$ a $250,8 \pm 6,6$ $\mu\text{g}/\text{mg}$; DPPH EC50 de $57,9 \pm 14,0$ a $91,1 \pm 7,1$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) e temperatura ambiente 25 °C (fenólicos de $225,4 \pm 20,4$ a $271,5 \pm 33,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$; DPPH EC50% de $48,5 \pm 14,4$ a $81,7 \pm 3,8$ $\mu\text{g}/\text{mL}$), por até 10 meses. As folhas do abacateiro foram submetidas à extração aquosa e após diversas etapas de purificação, originando a fração FRAGP com rendimento de $0,26$ % (m/m) em relação à massa das folhas secas. Esta fração apresentou altos teores de carboidratos ($767,7 \pm 28,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) e baixos teores de proteínas ($46,3 \pm 3,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$), ácidos urônicos ($11,2 \pm 6,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) e compostos fenólicos ($8,7 \pm 2,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$). Esta fração apresentou cerca de $22,5$ % m/m pelo ensaio de dosagem de AGP, utilizando o reagente $\beta\text{-GlcY}$ (*single diffusion*). Análises CG-EM, metilações seguidas de CG-EM e RMN (^1H e $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ – HSQC) sugerem a presença de um estrutura do tipo arabinogalactana (tipo 2) altamente ramificada e formada por pelo menos cinco

monossacarídeos (*Araf*, *Galp*, *Glc p*, *Rhap* e *Xylp*) distribuídos em diversas ligações químicas. A cadeia principal glicídica é formada por *Galp* (1→3) altamente ramificada em O-6 por cadeias laterais de *Araf* em diversas ligações diferentes e em menores quantidades *Galp*, *Glc p*, *Rhap* e *Xylp*. Por fim, a arabinogalactana-proteína das folhas de *P. americana* (FRAGP) foi capaz de inibir a via clássica de ativação do sistema complemento humano, com valores de IC50% de 2,97 e 17,48 µg/mL em teste de fixação do sistema complemento com e sem pré-incubação, respectivamente. As folhas de ambas as espécies são promissoras fontes de compostos fenólicos antioxidantes, sendo mais evidente para o abacateiro. Além disso, a fração FRAGP se mostrou como um potencial inibidor do sistema complemento.

Palavras chave: *Persea americana*, *Musa paradisiaca*, fenólicos, antioxidantes, arabinogalactanas-proteínas, sistema complemento.

ABSTRACT

Persea americana (avocado tree) and *Musa x paradisiaca* (banana tree) are both species cultivated all over the globe. Its leaves are commonly used as therapeutics extracts and the presence of phenolic compounds and an arabinogalactan-protein for have been already reported. Chemical composition of phenolic compounds and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of both species were evaluated. In addition, for *P. Americana* leaves, a study was performed on the stability of phenolic compounds against different experimental conditions and another on the evaluation of FRAGP on the modulation of the classical pathway of the complement system. Hydroalcoholic extracts from avocado (EHP) and banana (EHM) leaves presented high carbohydrate contents (508.5 ± 85.8 and 646.1 ± 59.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively) and phenolic compounds (237.1 ± 25.1 and 119.2 ± 1.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively). Protein (124.6 ± 25.4 and 112.1 ± 20.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for EHP and EHM, respectively) and uronic acids concentrations (10.6 ± 2.7 and 9.7 ± 3.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for EHP and EHM, respectively) were low and similar for both fractions. The levels of phenolic compounds and antioxidant activity was higher for EHP than fraction EHM by the *in vitro* DPPH radical scavenging ($\text{EC}_{50\%}$ 57.8 ± 5.4 and 194.3 ± 5.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) and reducing power method. At least 19 phenolic compounds in EHP, mostly flavonoids (flavan-3-ols and glycosylated flavonols), were identified by LC-MS. Higher drying temperatures of *P. americana* leaves appear to decrease the phenolic compounds levels. The concentration of phenolic compounds varied from 130.0 ± 7.6 to 233 ± 36.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$, higher in the lyophilized fraction and lower in the fraction dried at 90 °C. Reducing power and DPPH radical uptake ($\text{EC}_{50\%}$ 53.4 ± 1.1 to 110.4 ± 11.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for S60 and S100 fraction, respectively) was also reduced in fractions subjected to higher drying temperatures. In addition, in solution, the phenolic compounds of *P. americana* exhibit great stability when subjected to temperature or storage. Even higher temperatures wasn't able to change the concentrations of phenolic compounds (197.4 ± 9.5 to 259.3 ± 28.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$), DPPH radical uptake activity (61.5 ± 1.7 to 77.8 ± 8.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and reducing power of the EHP fraction. The same stability was observed when EHP was subjected to cold storage at 4 °C (phenolics from 201.6 ± 8.0 to 250.8 ± 6.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$, DPPH $\text{EC}_{50\%}$ from 57.9 ± 14.0 to 91.1 ± 7.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and room temperature 25 °C (phenolics from 225.4 ± 20.4 to 271.5 ± 33.8

$\mu\text{g}/\text{mg}$; DPPH EC50% from 48.5 ± 14.4 to $81, 7 \pm 3.8 \mu\text{g}/\text{mL}$) for up to 10 months. The the avocado leaves were submitted to aqueous extraction and after several purification, gave rise of the FRAGP fraction with a yield of 0.26% (w/w) in relation to dried leaves mass. This fraction had high carbohydrate contents ($767.7 \pm 28.9 \mu\text{g}/\text{mg}$) and low protein ($46.3 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{mg}$), uronic acids ($11.2 \pm 6.7 \mu\text{g}/\text{mg}$) and phenolic compounds contents ($8.7 \pm 2.2 \mu\text{g}/\text{mg}$) This fraction showed about 22.5% m/m by the AGP assay using the reagent $\beta\text{-GlcY}$ (single diffusion). GC-MS, methylations followed by GC-MS and NMR (^1H and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC) analysis suggest the presence of a highly branched arabinogalactan-protein (type II) formed by at least five monosaccharides (*Araf*, *Galp*, *GlcP*, *Rhap* and *Xylp*) in several chemical bonds. The glycosidic backbone is formed by *Galp* (1 \rightarrow 3) highly branched at O6 by side chains mainly formed by *Araf* in several different bonds and smaller amounts of *Galp*, *GlcP*, *Rhap* and *Xylp* residues. Finally, the arabinogalactan-protein from *P. americana* leaves (FRAGP) was able to inhibit the classical pathway activation of human complement system, with IC50% values of 2.97 and 17.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in complement fixation test with and without preincubation, respectively. The leaves of both species are promising sources of phenolic antioxidant compounds, being more evident for the avocado leaves. In addition, AGP has been shown to be able to modulate the complement system by classical pathway.

Key-words: *Persea americana*, *Musa paradisiaca*, phenolics, antioxidants, arabinogalactan-proteins, complement system.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– <i>Persea americana</i> , O ABACATEIRO.....	23
FIGURA 2	– <i>Musa x paradisiaca</i> , A BANANEIRA.....	25
FIGURA 3	– ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	30
FIGURA 4	– FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS COM EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i> E <i>M. paradisiaca</i>	35
FIGURA 5	– FLUXOGRAMAS DAS ETAPAS DOS ENSAIOS DE ESTABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i> ...	39
FIGURA 6	– FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA AGP DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i>	41
FIGURA 7	– CAPTAÇÃO DO RADICAL DPPH DOS EXTRATOS EHP, EHM E PADRÕES COMERCIAIS.....	49
FIGURA 8	– PODER REDUTOR DOS EXTRATOS EHP, EHM E PADRÕES COMERCIAIS.	51
FIGURA 9	– CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO EHP DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i>	52
FIGURA 10	– ESPECTROS DE MASSA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO EHP DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i>	54

FIGURA 11 - COMPOSTOS FENÓLICOS SUGERIDOS PARA O EXTRATO HIDROALCOÓLICO EHP DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i>	61
FIGURA 12 – ESTABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE A DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECAGEM DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i>	63
FIGURA 13 – DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DE CARBOIDRATOS TOTAIS (a), PROTEÍNAS TOTAIS (b) E ÁCIDOS URÔNICOS TOTAIS (c) DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i> SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECAGEM.	66
FIGURA 14 – ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i> FRENTE A DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO DO EXTRATO EHP.....	68
FIGURA 15 – DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DE CARBOIDRATOS TOTAIS (a), PROTEÍNAS TOTAIS (b) E ÁCIDOS URÔNICOS TOTAIS (c) DO EXTRATO EHP SUBMETIDO À DIFERENTES TEMPERATURAS (8 HORAS) EM SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA.	70
FIGURA 16 – DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DE CARBOIDRATOS TOTAIS, PROTEÍNAS TOTAIS E ÁCIDOS URÔNICOS TOTAIS DO EXTRATO EHP SUBMETIDO ESTOCAGEM 4 °C (REFRIGERADOR) (a) E 25 °C (TEMPERATURA AMBIENTE) (b) EM SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA POR 10 MESES.	71
FIGURA 17 – ESTABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE À ESTOCAGEM 4 °C (REFRIGERADOR) DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO EHP DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i>	73

FIGURA 18 – ESTABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE À ESTOCAGEM 25 °C (TEMPERATURA AMBIENTE) DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO EHP DAS FOLHAS DE <i>P. americana</i>	74
FIGURA 19 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES APÓS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA AGP.	78
FIGURA 20 – ESPECTRO DE RESONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹ H DA FRAÇÃO FRAGP.....	82
FIGURA 21 – ESPECTRO DE RESONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR BIDIMENSIONAL ¹ H/ ¹³ C (HSQC) DA FRAÇÃO FRAGP.....	83
FIGURA 22 – EFEITO DOSE-DEPENDENTE DE FRAGP, ZYMOSAN E HEPARINA SOBRE A HEMÓLISE INDUZIDA PELO COMPLEMENTO VIA CLÁSSICA.	86

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** – RENDIMENTOS E CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, ÁCIDOS URÔNICOS E FENÓLICOS DOS EXTRATOS EHP (*Persea americana*) E EHM (*Musa x paradisiaca*)..... 48
- TABELA 2** – ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS DPPH (EC50%) DOS EXTRATOS EHP, EHM E PADRÕES COMERCIAIS.....49
- TABELA 3** – COMPOSTOS FENÓLICOS SUGERIDOS PARA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO EHP DAS FOLHAS DE *P. americana*.....60
- TABELA 4** – ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS DPPH (EC50%) DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *P. americana* SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECAGEM.....64
- TABELA 5** – ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS DPPH (EC50%) DO EXTRATO EHP SUBMETIDO A DIFERENTES TEMPERATURAS (8 HORAS) EM SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA..... 69
- TABELA 6** – ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS DPPH (EC50%) DO EXTRATO EHP SUBMETIDO À ESTOCAGEM A 4 °C (REFRIGERADOR) OU 25 °C (TEMPERATURA AMBIENTE) POR ATÉ 10 MESES..... 75
- TABELA 7** – RENDIMENTOS E CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, ÁCIDOS URÔNICOS E FENÓLICOS DAS FRAÇÕES DE CADA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DA AGP A PARTIR DAS FOLHAS DE *Persea americana*..... 77

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS NEUTROS DE FRAGP E ETAPAS DE PURIFICAÇÃO.....	80
TABELA 9 – ANÁLISE DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS DE FRAGP.....	80
TABELA 10 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO FRAGP..	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

[M - H] ⁻	- Íons formados em espectrometria de massas no modo negativo
β-GlcY	- β-Glucosil Yariv
¹ H	- Hidrogênio de massa 1
¹³ C	- Carbono de massa 13
AG	- Ácido gálico
AGP	- Arabinogalactana-proteína
AGII	- Arabinogalactana do tipo II
ANOVA	- <i>Analysis of variance</i> / Teste estatístico de hipóteses
Araf	- Arabinose furanosídica
BHA	- Butil-hidroxianisol
BHT	- Butil-hidroxitolueno
C1q, C1r, C1s, C2, C3, C3a, C4, C5, C5a, C4bp, C6, C8, C9	- Componentes do sistema complemento
CG-EM	- Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CL-EM	- Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas
DMSO	- Dimetil sulfóxido
DPPH	- <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
EC50%	- Concentração capaz de captar 50 % dos radicais DPPH
EDTA	- Quelante de íons Ca ²⁺ / <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EtOH	- Álcool etílico
Fuçp	- Fucose piranosídica
GalAp	- Ácido galacturônico piranosídico
Galp	- Galactose piranosídica
gl	- Grau de liberdade

GlcAp	- Ácido glucurônico piranosídico
GlcP	- Glucose piranosídica
GPI	- Glicosil-fosfatidil-inositol
HEPES	- <i>Hydroxy ethyl piperazine ethanesulfonic acid</i> / tampão pH fisiológico
HPSEC	- <i>High pressure size exclusion chromatography</i>
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
IC50%	- Concentração capaz de inibir 50 % da hemólise causada pelo sistema complemento
LPS	- Lipopolissacarídeo bacteriano
Manp	- Manose piranosídica
ppm	- Partes por milhão
Que	- Quercetina
RI	- <i>Refractive index</i>
Rhap	- Ramnose piranosídica
RMN	- Ressonância magnética nuclear
SC	- Sistema complemento
TFA	- Ácido trifluoroacético
Xylp	- Xilose piranosídica

LISTA DE ABREVIATURAS DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES

E4-0	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 0 meses
E4-1	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 1 mes
E4-2	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 2 meses
E4-3	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 3 meses
E4-4	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 4 meses
E4-5	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 5 meses
E4-6	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 6 meses
E4-7	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 7 meses
E4-8	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 8 meses
E4-9	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 9 meses
E4-10	- Extrato EHP submetido à estocagem 4 °C por 10 meses
E25-0	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 0 meses
E25-1	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 1 mes
E25-2	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 2 meses
E25-3	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 3 meses
E25-4	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 4 meses
E25-5	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 5 meses
E25-6	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 6 meses
E25-7	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 7 meses
E25-8	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 8 meses
E25-9	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 9 meses
E25-10	- Extrato EHP submetido à estocagem 25 °C por 10 meses
EA	- Extrato aquoso
EAP	- Extrato aquoso precipitado
EAPS	- Extrato aquoso precipitado solúvel
EHP	- Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Persea americana</i>
EHM	- Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Musa x paradisiaca</i>

FRAGP	- Fração AGP das folhas de <i>P. americana</i>
S40	- Extrato hidroalcoólico de folhas secas a 40 °C
S50	- Extrato hidroalcoólico de folhas secas a 50 °C
S60	- Extrato hidroalcoólico de folhas secas a 60 °C
S70	- Extrato hidroalcoólico de folhas secas a 70 °C
S90	- Extrato hidroalcoólico de folhas secas a 90 °C
S100	- Extrato hidroalcoólico de folhas secas a 100 °C
SL	- Extrato hidroalcoólico de folhas liofilizadas
T40	- Extrato EHP submetido à temperatura de 40 °C
T50	- Extrato EHP submetido à temperatura de 50 °C
T60	- Extrato EHP submetido à temperatura de 60 °C
T70	- Extrato EHP submetido à temperatura de 70 °C
T80	- Extrato EHP submetido à temperatura de 80 °C
T90	- Extrato EHP submetido à temperatura de 90 °C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. <i>Persea americanana</i> Mill., o abacateiro	23
2.2. <i>Musa x paradisiaca</i> L., a bananeira.....	24
2.3. Compostos fenólicos vegetais.....	26
2.3.1. Compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	27
2.3.2. Estabilidade de compostos fenólicos.....	27
2.4. Arabinogalactanas-proteínas (AGPs).....	28
2.4.1. Arabinogalactanas-proteínas e o sistema complemento	29
3. JUSTIFICATIVAS	31
4. OBJETIVOS.....	32
4.1. Objetivo geral	32
4.2. Objetivos específicos.....	32
5. MATERIAI E MÉTODOS.....	33
5.1. Dosagens colorimétricas de compostos fenólicos, carboidratos, proteínas e ácidos urônicos	33
5.1.2. Dosagem de fenólicos totais	33
5.1.3. Dosagem de carboidratos totais.....	33
5.1.4. Dosagem de proteínas totais.....	34
5.1.5. Dosagem de açúcares ácidos (ácidos urônicos)	34
5.2. Extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>P. americana</i> Mill. e <i>M. paradisiaca</i> L....	34
.....	
5.2.1. Obtenção de extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>P. americana</i> Mill. e <i>M. paradisiaca</i> L.....	34
5.2.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	36
5.2.2.1. Captação do radical DPPH.....	36
5.2.2.2. Poder Redutor	36
5.2.3. Identificação de compostos fenólicos de EHP por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM)	37

5.2.4. Estabilidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de <i>P. americana</i> Mill.	37
5.2.4.1. Efeito da temperatura de secagem sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de <i>P. americana</i>	38
5.2.4.2. Efeito da temperatura sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHP)	38
5.2.4.3. Efeito da estocagem sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHP)	38
5.3. Extrato aquoso das folhas de <i>P. americana</i> Mill.....	40
5.3.1. Extração aquosa e purificação de AGP a partir das folhas de <i>P. americana</i> Mill.....	40
5.3.2. Caracterização química da fração AGP	41
5.3.2.1. Composição dos monossacarídeos neutros.....	41
5.3.2.2. Análise das ligações entre os monômeros (metilação)	42
5.3.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	42
5.3.2.4. Análise de Homogeneidade	43
5.3.2.5. Dosagem de AGP (<i>Single Diffusion</i>)	43
5.3.3. Teste de fixação do sistema complemento via clássica	43
5.3.3.1. Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro.....	45
5.3.3.2. Obtenção de soro humano (fonte de complemento)	45
5.3.3.3. Preparo das frações-testes	46
5.3.4. Aspectos Éticos e Biossegurança	46
5.4. Análise Estatística	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1. Extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>P. americana</i> Mill. e <i>M. paradisiaca</i> L....	47
6.1.1. Rendimento e análises químicas dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>P. americana</i> Mill. (EHP) e <i>M. paradisiaca</i> L. (EHM)	47
6.1.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>P. americana</i> Mill. (EHP) e <i>M. paradisiaca</i> L. (EHM)	48
6.1.3. Identificação de compostos fenólicos de EHP por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM)	51
6.1.4. Estabilidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de <i>P. americana</i> Mill.	61

6.1.4.1. Efeito da temperatura de secagem das folhas sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de <i>P. americana</i>	62
6.1.4.2. Efeito da temperatura sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHP)	67
6.1.4.3. Efeito do da estocagem sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHP)	71
6.2. Extrato aquoso das folhas de <i>P. americana</i> Mill.....	76
6.2.1. Extração aquosa e purificação de AGP a partir das folhas de <i>P. americana</i> Mill.....	76
6.2.2. Caracterização química da fração AGP (FRAGP).....	79
6.2.3. Atividade de fixação do sistema complemento via clássica por FRAGP	84
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	89
7.1. Extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>P. americana</i> e <i>M. paradisiaca</i>	89
7.2. Fração FRAGP das folhas de <i>P. americana</i>	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS	101

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais representam uma imensa fonte de novos fármacos e medicamentos. Além disso, seu uso pela cultura popular, na forma de chás, tinturas, compressas, etc. tem se mostrado uma eficaz alternativa no tratamento de diversas doenças humanas (LAMEIRA & PEREIRA PINTO, 2008). Entre os compostos de interesse terapêutico, destacam-se os compostos fenólicos. Estes compostos são metabólitos secundários diretamente relacionados à atividade antioxidante de extratos vegetais (DJERIDANE, *et al.*, 2006; TURKMEN, SARI & VELIOGLU, 2006; JAVANMARDI, *et al.*, 2003; VELIOGLU, *et al.*, 1998), entretanto, a concentração de compostos fenólicos pode ser influenciada por diversos fatores, desde a manipulação da porção vegetal *in natura* até a estocagem do extrato resultante (MONTORO *et al.*, 2006; ARABSHAHI-DELOUEE & UROOJ, 2007; KATSUBE *et al.*, 2009).

As folhas de ambas as espécies em estudo (*P. americana* e *M. paradisiaca*) são comumente utilizadas na cultura popular para o combate de diversos quadros patológicos, sendo previamente relatada a presença de compostos fenólicos em extratos das folhas (ASAOLU *et al.*, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2013). Além disso, outra biomolécula vegetal de interesse terapêutico (arabinogalactana-proteína, AGP) foi antes relatada para as folhas de *P. americana* (YAMASSAKI, 2013). Trata-se de uma família de glicoproteínas com diversas aplicações terapêuticas descritas, em especial a de modulação do sistema complemento (YAMADA *et al.*, 1985; GONDA *et al.*, 1990; PAULSEN, 2001). Neste sentido, uma vez desconhecidas, a composição química e atividade antioxidante de compostos fenólicos das folhas de ambas as espécies bem como estrutura e a atividade frente ao sistema complemento da AGP (*P. americana*), devem ser melhores exploradas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Persea americana* Mill., o abacateiro

O abacateiro (FIGURA 1) é uma espécie nativa da região da América Central e México, mas atualmente cultivado em diversos países, inclusive no Brasil. Possui grande interesse comercial devido ao seu fruto (abacate), o qual é rico em sais minerais (sódio, fósforo e ferro), vitaminas A, C e do complexo B e em energia (glicídios e lipídios).

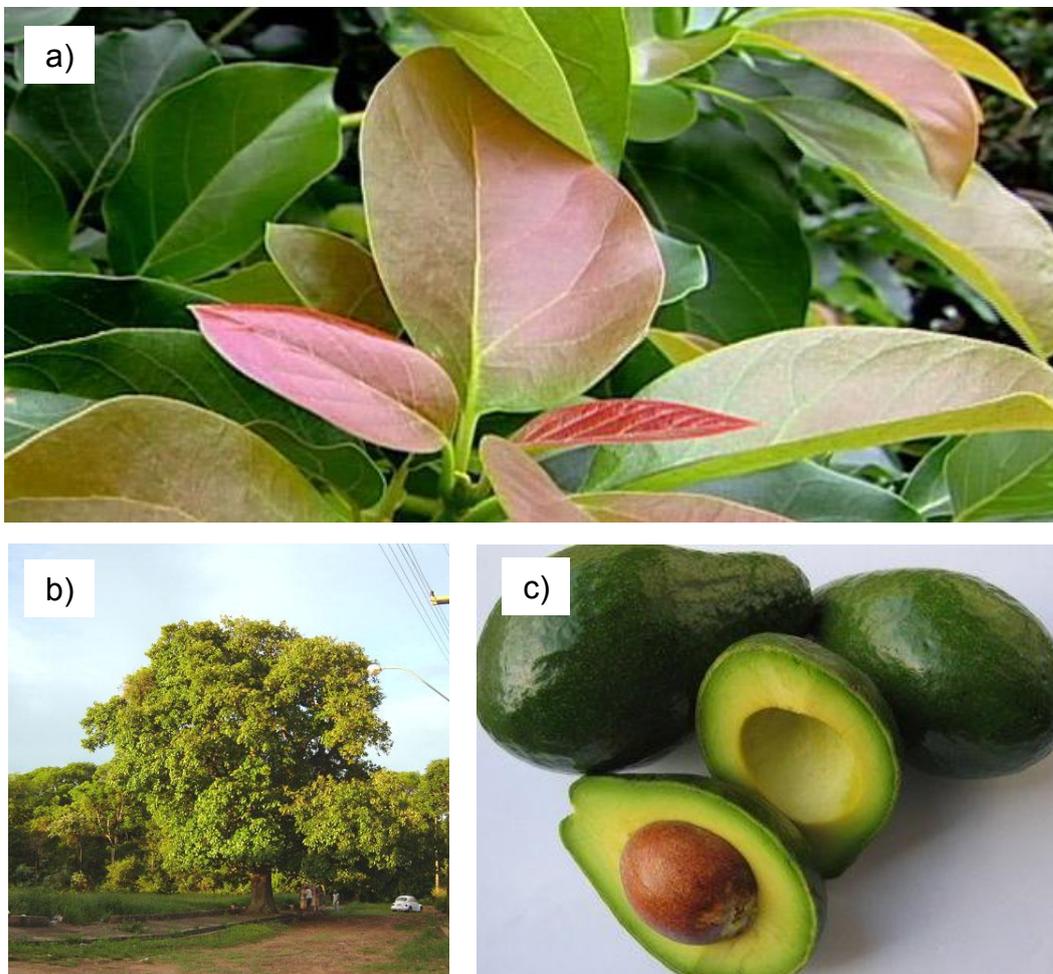


FIGURA 1 – *Persea americana*, O ABACATEIRO.

FONTE: <http://www.infoescola.com/frutas/abacate/>;

<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/abacate/abacate-2.php>;

http://www.umpedeque.com.br/site_umpedeque/arvore.php?id=687

NOTA: a) Detalhe das folhas; b) Imagem panorâmica de um indivíduo; c) Detalhe do fruto e semente.

As folhas do abacateiro são comumente utilizadas na medicina popular na forma de infusões ditas diuréticas, antirreumáticas, carminativas, antianêmicas,

antidiarrêicas, e anti-infecciosas (ALONSO, 2004; LORENZI & ABREU MATOS, 2008). Além disso, foram cientificamente relatadas atividades hipoglicemiantes (BRAI, ODETOLA & AGOMO, 2007), antiviral (DE ALMEIDA *et al.*, 1998), analgésica, anti-inflamatória (ADEYEMI, OKPO & OGUNTI, 2002), anticonvulsivante (OJEWOLE & AMABEOKU, 2006) e antioxidante (ASAOLU *et al.*, 2010) de frações decorrentes das folhas de *P. americana*.

As folhas apresentam metabólitos secundários como alcaloides, taninos, saponinas, terpenos e flavonoides (quercetina, catequina, epicatequina e cianidina) (ADEYEMI, OKPO & OGUNTI, 2002; ALONSO, 2004; ASAOLU *et al.*, 2010). Especificamente, os compostos fenólicos e flavonoides foram quantificados em um extrato metanólico apresentando $1,22 \pm 0,52$ % e $0,58 \pm 0,09$ %, respectivamente (ASAOLU *et al.*, 2004). YAMASSAKI (2013) encontrou 21,1 e 17,6 % de compostos fenólicos para extrato hidroalcoólico e aquoso, respectivamente, enquanto JIMÉNEZ *et al.*, 2017 relataram 3,7 mg/g de folhas frescas. A composição do óleo essencial é diversa, apresentando estragol, metilchavicol, α -pineno, β -pineno, metileugenol, cineol e limoneno (ALONSO, 2004). Quanto aos polissacarídeos, foi identificada a presença de uma AGP no extrato aquoso, entretanto a estrutura não foi plenamente caracterizada (YAMASSAKI, 2013).

2.2. *Musa x paradisiaca* L., a bananeira

O termo "*Musa paradisiaca*" foi primeiramente dado por Carl Linneaus, sendo este termo utilizado até hoje para fins práticos. Ernerst Cheesman, em 1947, relatou que a planta identificada por Linneaus, de fato, não representava uma espécie em si, mas sim um híbrido entre duas espécies selvagens, *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* (CHEESMAN, 1947). Neste sentido, alguns autores utilizam o termo *Musa x paradisiaca* para dar ênfase à característica de híbrido desta planta. Atualmente, devido ao imenso comércio de bananas, criaram-se tantas variedades de bananeiras ao ponto que o sistema de classificação binomial, criado pelo próprio Linneaus, seja simplório e ineficiente para a classificação de bananeiras cultivadas. Devido a esta necessidade, foi desenvolvido um sistema de classificação próprio para variedades de bananeiras cultivadas. Este sistema classifica as variedades de acordo com ploidia e origem da carga genética (SIMMONDS & SHEPHERD, 1955).

Por exemplo, a variedade “prata” (utilizada neste trabalho) é representada como *Musa* AAB, ou seja, trata-se de uma variedade triploide com duas cargas genéticas oriundas da espécie *Musa acuminata* e uma da *Musa balbisiana* (BORGES, SOUZA & TRINIDADE, 2004).

As bananeiras (FIGURA 2) representam umas das plantas mais cultivadas no mundo devido ao intenso comércio/consumo do seu fruto, a banana. Atualmente, a produção anual de banana in natura gira em torno de 68 milhões de toneladas, sendo o Brasil uns dos maiores produtores mundiais, junto com a Índia, China e Equador (FIORAVANÇO, 2003; BORGES, SOUZA & TRINIDADE, 2004).

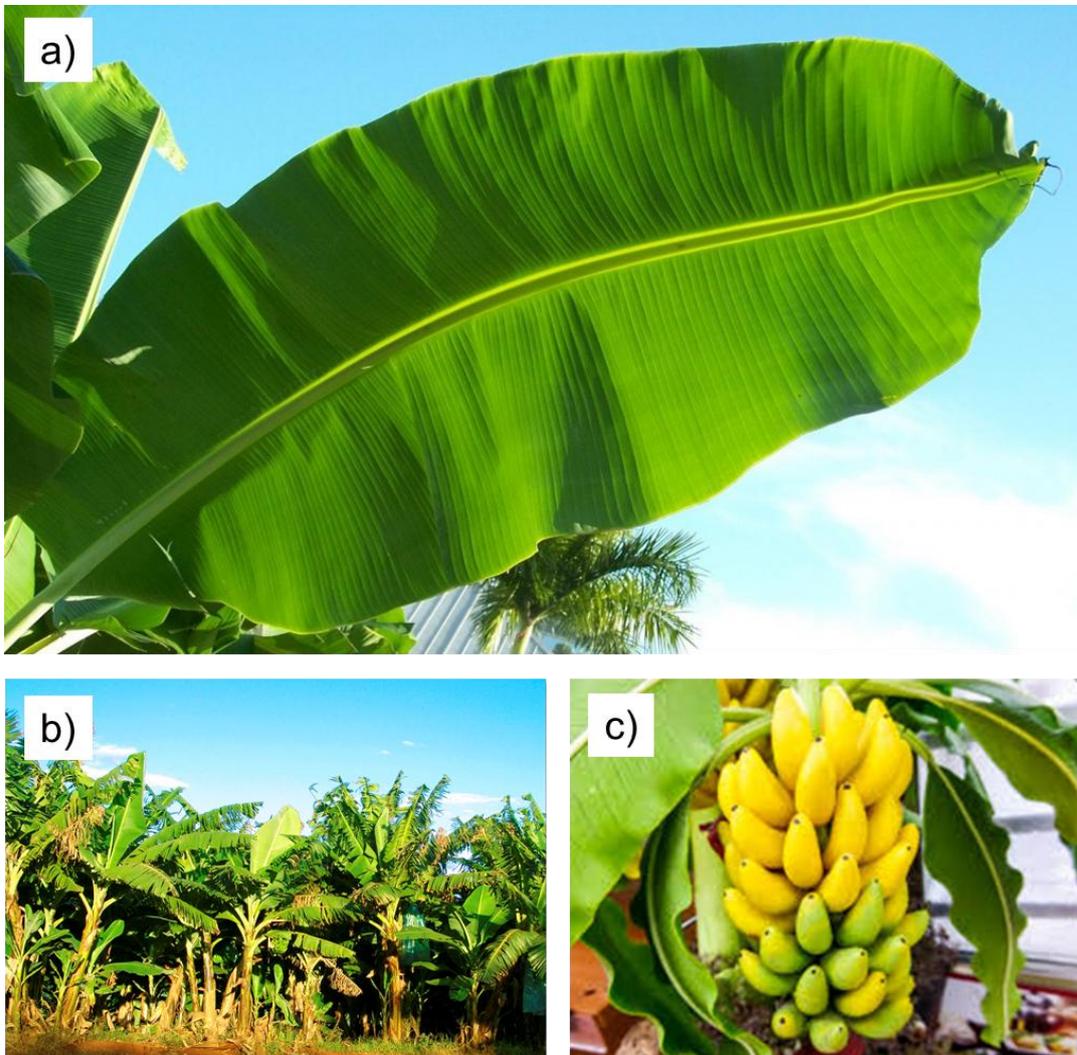


FIGURA 2 – *Musa x paradisiaca*, A BANANEIRA.

FONTE: <http://picturesoftrees.org/Banana-Trees-Pictures.php>

http://www.viagemparasolteiros.com.br/pacotes_mostra.asp?id_pacote=171#.WKdhL1UrLIU

<http://koolaufarmers.com/products/banana-trees/>

NOTA: a) Detalhe das folhas; b) Imagem panorâmica de um bananal; c) Detalhe dos frutos.

As folhas são indicadas pela medicina popular para o tratamento de queimaduras, dermatites (IMAM & AKTER, 2011; KUMAR *et al.*, 2012), sarna, tosse e bronquite (SONI *et al.*, 2013). Já a comunidade científica relatou atividade leishmanicida (ACCIOLY *et al.*, 2012), antimicrobiana (VALARMATHY *et al.*, 2010; IMAM & AKTER, 2011) e principalmente anti-helmíntica (MARIE-MAGDELEINE *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2013). A atividade anti-helmíntica tem sido relacionada com a presença de compostos fenólicos denominados taninos nas folhas da bananeira (PEIXOTO *et al.*, 2013). Entretanto, alguns autores levantam a hipótese de que outras moléculas de menor massa já relatados nesta planta como alcaloides, terpenoides e flavonoides podem influenciar na atividade anti-helmíntica total das folhas de *Musa x paradisiaca* (MARIE-MAGDELEINE *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2011).

2.3. Compostos fenólicos vegetais

Os fenólicos são metabólitos especiais com uma ampla diversidade de compostos com um ou mais grupamentos hidroxilas diretamente ligados a um anel aromático. Podem apresentar estrutura simples como fenilpropanoides (cumarinas e lignanas), flavonoides ou mais complexas como em polifenóis de alta massa molecular (taninos). São compostos que desempenham diversas funções na planta, incluindo pigmentação, defesa e também na formação de componentes estruturais como as ligninas (YAZAKI, 2006).

A estes compostos têm sido relacionadas uma série de bioatividades como antimutagênica, anti-inflamatória, anticarcinogênica (REDDY, ODHAV & BHOOLA, 2003), antimicrobiano (ALMAJANO *et al.*, 2008) e antioxidante (RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1997). Além disso, foi descrito que a inclusão destes compostos na dieta pode inibir a carcinogênese cólon retal induzida (GEE & JOHNSON, 2001) e possivelmente prevenir a incidência de doenças neurodegenerativas como a de Alzheimer e a de Parkinson (ESPOSITO *et al.*, 2002).

2.3.1. Compostos fenólicos e atividade antioxidante

A atividade antioxidante de compostos fenólicos vegetais tem despertado interesse tanto na indústria farmacêutica quanto alimentícia. Na primeira, devido à capacidade destes compostos em inibir a peroxidação lipídica (VAN DER SLUIS, DEKKER & VAN BOEKEL, 2005; ARABSHAHI-DELOUEE & UROOJ, 2007) e captar espécies reativas, por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^\cdot), (SHON, KIM & SUNG, 2003) e radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (SIDDHURAJU & BECKER, 2003). Estes compostos podem acarretar em diversos quadros patológicos (via estresse oxidativo), como doenças neurodegenerativas (SCHEIBMEIR *et al.*, 2005), desordens cardiovasculares (HEITZER *et al.*, 2001), câncer (VALKO, *et al.* 2006) e ao envelhecimento (DEL VALLE, 2011).

Na indústria alimentícia, a atividade antioxidante de compostos fenólicos vegetais é promissora no âmbito de conservantes de perecíveis. Atualmente, são utilizados compostos sintéticos como o BHA (butil-hidroxianisol) e BHT (butil-hidroxitolueno) (AUN *et al.*, 2011). Entretanto, há relatos que a ingestão de altas concentrações destes compostos em camundongos pode induzir genotoxicidade (SASAKI *et al.*, 2002) e carcinogênese (WHYSNER *et al.*, 1994; WILLIAMS, IATROPOULOS & WHYSNER, 1999; BOTTERWECK *et al.*, 2000). Desta forma, os compostos fenólicos se apresentam como uma alternativa natural e não tóxica aos conservantes sintéticos utilizados hoje.

2.3.2. Estabilidade de compostos fenólicos

A atividade antioxidante de extratos vegetais está intimamente relacionada à concentração de compostos fenólicos (DJERIDANE, *et al.*, 2006; TURKMEN, SARI & VELIOGLU, 2006; JAVANMARDI, *et al.*, 2003; VELIOGLU, *et al.*, 1998). Entretanto, a concentração de compostos fenólicos pode ser influenciada por diversos fatores, da manipulação da porção vegetal *in natura* até a estocagem do extrato resultante. MONTORO *et al.* (2006) demonstraram que a estocagem em solução pode diminuir a concentração de compostos fenólicos. ARABSHAHI-DELOUEE & UROOJ (2007) observaram uma diminuição dos níveis de compostos fenólicos com aumento da temperatura de solução e KATSUBE *et al.* (2009) relatam

uma grande diminuição de compostos fenólicos em extratos oriundos de folhas secas a altas temperaturas. Desta forma, um controle restrito da metodologia de extração e estocagem se torna necessário para manutenção dos compostos fenólicos bem como suas propriedades terapêuticas.

2.4. Arabinogalactanas-proteínas (AGPs)

As AGPs são macromoléculas de parede celular vegetal amplamente distribuídas em plantas superiores, mas também encontradas em musgos e algas (GEDDES & WILKIE, 1971; TAUTVYDAS, 1978; FINCHER, STONE & CLARKE, 1983). São encontradas em praticamente qualquer porção vegetal, como raízes, folhas, frutos, exsudato, etc. (FINCHER, STONE & CLARKE, 1983). Trata-se de uma glicoproteína formada por uma pequena porção proteica central (rica em hidroxiprolina) e uma grande porção glicídica na forma de ramificações de arabinogalactanas do tipo II (AGII). As AGII são polissacarídeos formados predominantemente pelos monossacarídeos D-Galp e L-Araf, sendo que a proporção Gal:Ara pode variar entre 10:90 e 85:15, mas geralmente o conteúdo de galactose é maior (FINCHER, STONE & CLARKE, 1983). As unidades de D-Galp formam uma cadeia principal (1→3) ligadas, a qual é muito ramificada (em O-6) principalmente por Araf e Galp, podendo também conter outros monossacarídeos neutros (Arap, Rhap, Manp, Xylp e Glcp) e ácidos (GlcAp, GalAp) (FINCHER, STONE & CLARKE, 1983; SEIFERT & ROBERTS, 2007).

A extremidade C-terminal da cadeia proteica pode estar acoplada covalentemente à membrana celular através de uma âncora GPI (glicosil-fosfatidilinositol). A presença desta âncora corrobora a hipótese de que as AGPs desempenham funções relacionadas à sinalização celular (SCHULTZ *et al.*, 1998, SHOWALTER, 2001; SEIFERT & ROBERTS, 2007), sendo já descrito que baixas concentrações de AGPs acarretam em drásticas alterações no crescimento e desenvolvimento vegetal (MAJEWSKA-SAWKA & NOTHNAGEL, 2000; PEREIRA-NETTO *et al.*, 2007).

As AGPs se ligam especificamente com um reagente sintético denominado β -Glucosil Yariv, desta forma, este reagente se mostra uma eficaz ferramenta para identificação, quantificação e purificação das AGPs (YARIV *et al.*, 1962; YARIV *et*

al., 1967). Entretanto, há relatos de que algumas AGPs que não se ligam (ou ligam fracamente) ao reagente β -Glucosil Yariv (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2007), nestes casos, a identificação das AGPs pode ser realizada através do uso de anticorpos (SHOWALTER, 2001), métodos cromatográficos e espectroscópicos.

2.4.1. Arabinogalactanas-proteínas e o sistema complemento

O sistema complemento (SC) é composto por um conjunto de proteínas séricas (zimogênios) com função de proteger o organismo de agentes agressores, participando da imunidade inata e adaptativa (ABBAS, 2003; DUTTA & DAS, 2011). O SC liga a imunidade inata à humoral aumentando a produção de anticorpos e a memória imunológica através da lise direta de células estranhas ao organismo pelo complexo de ataque à membrana (ABBAS, 2003; DUTTA & DAS, 2011).

A ativação do sistema complemento pode ser iniciada através de três principais vias: clássica (FIGURA 3b), alternativa e das lectinas (ABBAS, 2003). Esta ativação resulta na liberação de mediadores inflamatórios (C3a e C5a), uma cascata de reações e posteriormente formação do complexo de ataque à membrana e consequente lise celular (FIGURA 3a).

O SC também está envolvido em vários outros processos fisiológicos tais como a regeneração de tecidos e depuração dos complexos imunes e células mortas. A ativação excessiva de complemento está envolvida na patogênese de muitas doenças autoimunes e doenças inflamatórias, portanto, a inibição do sistema complemento é uma estratégia no tratamento dessas doenças. Por outro lado, além do papel importante da defesa do organismo contra patógenos, a ativação do complemento pode atuar benéficamente em termos de imunoestimulação não específica, para manter o processo de cicatrização e na terapêutica antitumoral. Desta forma, dependendo do enfoque ou da situação clínica específica tanto a inibição como a ativação do SC podem ser relevantes.

Componentes de cápsulas bacterianas (por exemplo, o LPS lipopolissacarídeo) são ativadores da via clássica e da via alternativa do complemento. Já polissacarídeos sulfatados, como a heparina, são inibidores de ambas as vias (ALBAN *et al.*, 2002). Além desses, diversos polissacarídeos e glicoconjugados (como AGPs) obtidos de plantas medicinais têm sido descritos como moduladores do sistema complemento tanto da via clássica quanto da via

alternativa (YAMADA *et al.*, 1985; GONDA *et al.*, 1990; PAULSEN, 2001; ZHU *et al.*, 2009).

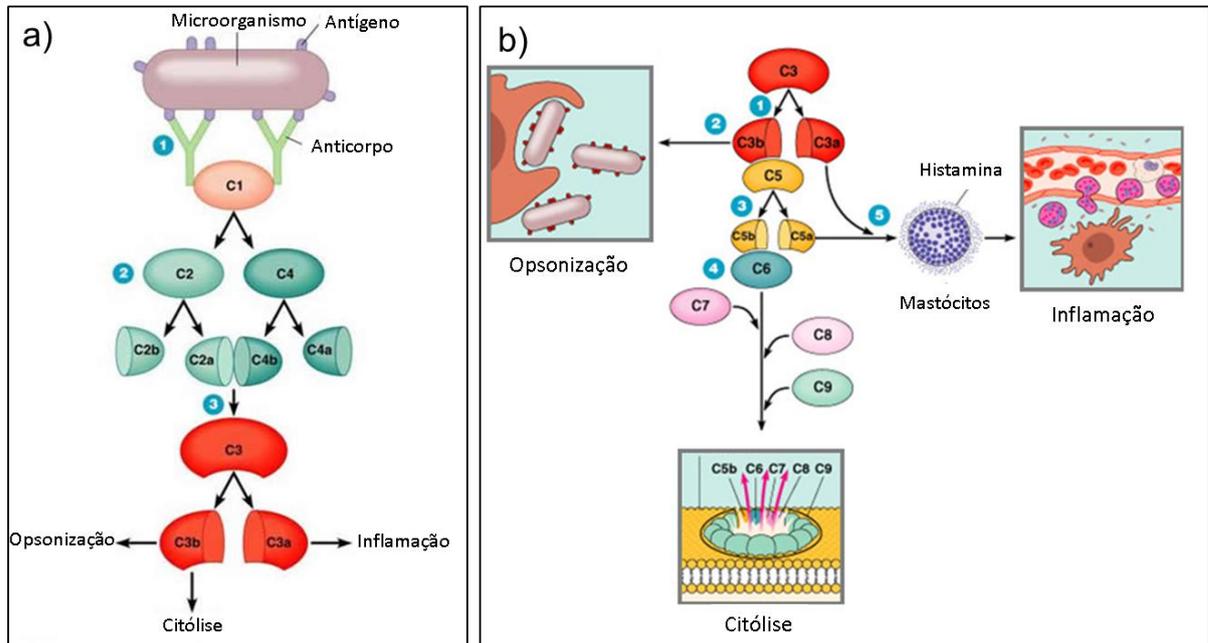


FIGURA 3 – ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.

FONTE: Adaptado de <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap16/lecture5.htm>

NOTA: a) Ativação do sistema complemento via clássica. 1 – C1 é ativado pela ligação no complexo antígeno-anticorpo; 2 – C1 ativo cliva C2 em C2a e C2b e C4 em C4a e C4b; 3 – C2a e C4b combinados ativam C3, clivando em C3a e C3b; b) via comum da cascata de reações e principais funções do sistema complemento. 1 – ativação e clivagem de C3 em C3a e C3b; 2 – C3b se liga ao microorganismo resultando em opsonização; 3 – C3b cliva C5 em C5a e C5b; 4 – C5b se liga ao C6 e junto com os componentes C7, C8 e C9 formam o complexo de ataque a membrana; 5 – C3a e C5a induzem mastócitos a liberar histamina resultando em inflamação local; Opsonização: Aumento da fagocitose por envoltório de C3b; Inflamação: Aumento da permeabilidade sanguínea e atração quimiotática de fagócitos; Citólise: Ataque ao microorganismo com influxo de fluido extracelular pelo canal transmembrana formado pelo complexo de ataque a membrana (C5 – C9).

3. JUSTIFICATIVA

A atividade antioxidante de extratos vegetais está diretamente ligada à concentração de compostos fenólicos (DJERIDANE, *et al.*, 2006; TURKMEN, SARI & VELIOGLU, 2006; JAVANMARDI, *et al.*, 2003; VELIOGLU, *et al.*, 1998). A estes compostos tem sido atribuída a uma série de bioatividades, sendo já descrito que a inclusão destes compostos na dieta pode inibir a carcinogênese cólon retal induzida (GEE & JOHNSON, 2001) e prevenir a incidência de doenças neurodegenerativas como a de Alzheimer e a de Parkinson (ESPOSITO *et al.*, 2002). A concentração destes compostos em extratos vegetais depende de diversos fatores desde a manipulação da porção vegetal *in natura* até a estocagem do extrato resultante. A temperatura de secagem das folhas, temperatura de solução e o modo de estocagem são exemplos de variáveis que podem influenciar na estabilidade de compostos fenólicos vegetais (MONTORO *et al.*, 2006; ARABSHAHI-DELOUEE e UROOJ, 2007; KATSUBE *et al.*, 2009). Neste sentido, uma vez já relatada presença de compostos fenólicos nas folhas de *P. americana* e *M. x paradisiaca*, torna-se válido determinar a composição química bem como estabelecer algumas condições de extração e estocagem de modo a preservar estes compostos, bem como a atividade antioxidante relacionada.

A atividade imunomoduladora de polissacarídeos tem sido muito relacionada à capacidade destes compostos em modular a ação do sistema complemento (PAULSEN, 2001; ZHU *et al.*, 2009). O sistema complemento, por sua vez, é um importante mediador de diversos processos inflamatórios, de modo que tanto a ativação quanto a inibição induzida pode ser necessária, dependendo do quadro clínico. Assim, estudos que abordam estratégias experimentais que possibilitem a diferenciação entre ativadores e inibidores do sistema complemento, bem como correlacionar a estrutura química com os efeitos biológicos são relevantes para o desenvolvimento de formas terapêuticas complementares para o tratamento de diferentes patologias.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Caracterizar quimicamente, realizar ensaios de estabilidade e avaliar atividades biológicas de extratos das folhas de *Persea americana* Mill. e *Musa paradisiaca* L.

4.2. Objetivos específicos

- a) Extrair e quantificar os compostos fenólicos das folhas de *P. americana* e *M. paradisiaca*.
- b) Caracterizar quimicamente os compostos fenólicos das folhas de *P. americana*.
- c) Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. americana* e *M. paradisiaca*.
- d) Relacionar o efeito da temperatura de secagem das folhas; temperatura; e estocagem do extrato sobre o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. americana*.
- e) Relacionar o efeito da temperatura de secagem das folhas; temperatura; e estocagem do extrato sobre a atividade antioxidante nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. americana*.
- f) Extrair, quantificar, purificar e caracterizar quimicamente a AGP foliar de *P. americana*.
- g) Avaliar a ação imunomoduladora *in vitro* da AGP foliar de *P. americana*, utilizando o modelo de fixação do sistema complemento humano via clássica.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Dosagens colorimétricas de compostos fenólicos, carboidratos, proteínas e ácidos urônicos

5.1.2. Dosagem de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado utilizando o método descrito por SINGLETON & ROSSI JR.(1965) com modificações. Inicialmente, 50 µg (50 µL de solução 1 mg/mL) foi adicionado a 200 µL de H₂O, 1,25 mL do reagente de FOLIN 10 % (v/v) e 1 mL de carbonato de cálcio 7,5 % (m/v), todos solubilizados em água purificada. Em seguida, a solução permaneceu em repouso por 5 min a 50 °C. Após este período, a solução foi analisada a 760 nm em espectrofotômetro de microplacas modelo ELX800 UV-Vis (BIOTEK, Winooski, Vermont, EUA). A concentração de compostos fenólicos foi obtida a partir de uma curva padrão (1-50 µg) de ácido gálico (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) e expressa em microgramas equivalentes por miligrama do material liofilizado. Todas as análises foram realizadas em triplicatas para cada fração teste.

5.1.3. Dosagem de carboidratos totais

O conteúdo de carboidratos totais foi determinado através do ensaio colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*,1956). A fração testada (40 µg, 40 µL de solução 1 mg/mL) foi misturada a 40 µL de fenol e 200 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), permanecendo em repouso por 10 min (100 °C). Em seguida a reação foi interrompida em banho de gelo e analisada em espectrofotômetro de microplacas modelo ELX800 UV-Vis (BIOTEK, Winooski, Vermont, EUA). A concentração glicídica foi estimada a partir de uma curva padrão (0,4 a 40 µg) de D-galactose (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) e expressa em microgramas equivalentes por miligrama do material liofilizado. Todas as análises foram realizadas em triplicatas para cada fração teste.

5.1.4. Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada por meio do teste utilizando o corante *Coomassie Brilliant Blue* G250 descrito por BRADFORD (1976). Inicialmente, 400 µL do reagente de proteínas (40 mg de *Coomassie Brilliant Blue* G250, 20 mL de etanol 95 % v/v e 40 mL de ácido *o*-fosfórico (diluído 3 vezes em água purificada) foi adicionado a 40 µg (40 µL de solução 1 mg/mL) da fração teste e em seguida analisados por espectrofotômetro de microplacas modelo ELX800 UV-Vis (BIOTEK, Winooski, Vermont, EUA) a 595 nm. A concentração proteica foi determinada a partir da curva padrão (0,4 a 40 µg) de ovo-albumina (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) e expressa em microgramas equivalentes por miligrama do material liofilizado. Todas as análises foram realizadas em triplicatas para cada fração teste.

5.1.5. Dosagem de açúcares ácidos (ácidos urônicos)

A quantificação de açúcares ácidos (urônicos) foi realizada de acordo com o método *m*-hidroxibifenil descrito por FILISETTI-COZZI & CARPITA (1991). Inicialmente, 20 µL de sulfamato de potássio 4 M e 1,2 mL de tetraborato de sódio 75 mM (em H₂SO₄) foram adicionados a 100 µg (100 µL de solução 1 mg/mL) das frações testes, em triplicatas, e 100 µL de água purificada. A solução permaneceu em repouso a 100 °C por 15 min e em seguida foi adicionado 40 µL de *m*-hidroxibifenil 0,15 % (em NaOH 0,5 % v/v) e analisado a 525 nm em espectrofotômetro de multiplacas (modelo ELX800 UV-Vis, BIOTEK, Winooski, Vermont, EUA). A concentração de ácido urônicos foi determinada se baseando em uma curva padrão (1-100 µg) de ácido D-glucurônico (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) e expressa em microgramas equivalentes por miligrama do material liofilizado.

5.2. Extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. americana* Mill. e *M. paradisiaca* L.

5.2.1. Obtenção de extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. americana* Mill. e *M. paradisiaca* L.

As folhas de *P. americana* Mill. (Curitiba-PR / S-25,45, O-49,23) e *M. paradisiaca* L. (Morretes-PR / S25°33', O48°48') foram inicialmente lavadas (etanol

70 % v/v e água purificada) e em seguida submetidas à secagem (estufa 50 °C) e moagem em processador de alimentos. Com o material pulverizado, foi realizada uma extração do tipo hidroalcoólica na proporção de 100 g de folhas / 500 mL de EtOH 70 % (v/v) por quatro dias no escuro (temperatura ambiente), sob agitação periódica. Os produtos das extrações, após filtração (filtro de papel), concentração (rotaevaporador a 40 °C) e liofilização, deram origem aos extratos denominados EHP (extração hidroalcoólica *Persea*) e EHM (extração hidroalcoólica *Musa*). Ambos os extratos (EHP e EHM) foram submetidos à dosagens colorimétricas de compostos fenólicos (SEÇÃO 5.1.2.), carboidratos (SEÇÃO 5.1.3.), proteínas (SEÇÃO 5.1.4.), ácidos urônicos (SEÇÃO 5.1.5.) e atividade antioxidante (SEÇÃO 5.2.2.), enquanto que somente EHP foi submetida aos ensaios de estabilidade frente à temperatura de solução (SEÇÃO 5.2.4.2.) e estocagem (SEÇÃO 5.2.4.3.) (FIGURA 4). A estabilidade frente à temperatura de secagens das folhas (SEÇÃO 5.2.4.1.) foi realizada somente para as folhas de *P. americana*.

Os rendimentos de todos os extratos foram calculados a partir da massa liofilizada em relação à massa das folhas secas e a percentagem de umidade foi calculada a partir do rendimento das folhas secas em relação às folhas *in natura*.

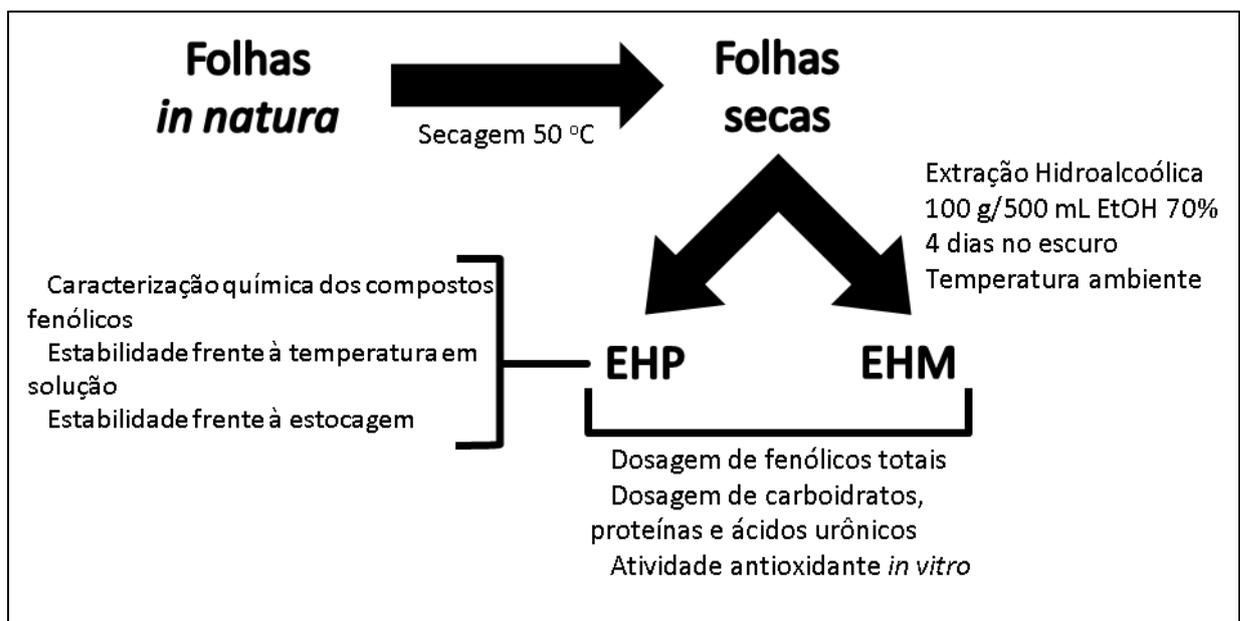


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS COM EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DAS FOLHAS DE *P. americana* e *M. paradisiaca*.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Dosagem de fenólicos totais pelo método de SINGLETON & ROSSI JR., 1965 (SEÇÃO 5.1.2.). Dosagem de carboidratos totais pelo método de DUBOIS, *et al.*, 1956 (SEÇÃO 5.1.3.). Dosagem de proteínas totais pelo método de BRADFORD, 1976 (SEÇÃO 5.1.4.). Dosagem de ácidos urônicos pelo método de FILISETTI-COZZI & CARPITA, 1991 (SEÇÃO 5.1.5.). Atividade antioxidante pelos

métodos de captação do radical DPPH de BLOIS, 1958 (SEÇÃO 5.2.2.1.) e poder redutor de OYAIKU, 1986 (SEÇÃO 5.2.2.2.); Caracterização química de compostos fenólicos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (SEÇÃO 5.2.3.); Estabilidade frente à temperatura em solução (SEÇÃO 5.2.4.2.); Estabilidade frente à estocagem (SEÇÃO 5.2.4.3.); EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*; EHM – extrato hidroalcoólico das folhas de *M. paradisiaca*.

5.2.2. Atividade antioxidante *in vitro*

5.2.2.1. Captação do radical DPPH

O radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) é um composto que na sua forma oxidada possui coloração violeta e quando reduzido torna-se um composto de coloração amarelada, diminuindo a absorção em 515 nm. A taxa de captura foi mensurada a partir do método de BLOIS (1958) com adaptações. Inicialmente, 300 µL das frações (10, 20, 40, 80, 160, 240, 320, 480 e 640 µg/mL em etanol) ou padrões [ácido gálico (AG), quercetina (Que) e hidroxitolueno butilado (BHT)] (5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 160 e 320 µg/mL em etanol) foram misturados com 100 µL de DPPH 40 mM (em metanol). A solução permaneceu em repouso no escuro por 20 min, temperatura ambiente. As soluções foram então transferidas para microplacas de 96 poços e analisadas a 515 nm (espectrofotômetro de microplacas modelo ELX800 UV-Vis, BIOTEK, Winooski, Vermont, EUA). A taxa de captação do radical de DPPH (%) foi determinado a partir da equação:

$$\text{Captação do radical DPPH} = \{ [A_0 - (A - A_b)] / A_0 \} \times 100$$

onde, A_0 é a absorbância somente da solução de DPPH; A é a absorbância da solução de DPPH e amostras; e A_b é a absorbância somente das amostras.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas para cada concentração e estão apresentadas na forma de EC50% (concentração efetiva 50 %) que corresponde à concentração capaz de captar 50 % dos radicais DPPH.

5.2.2.2. Poder Redutor

O poder redutor foi determinado por método adaptado de OYAIKU (1986). Este ensaio se baseia no fato de que compostos com alto poder redutor são capazes de reduzir o ferricianeto de potássio em ferrocianeto de potássio, que por sua vez reage com o cloreto férrico formando um composto de alta absorbância em

700 nm. Inicialmente, 250 µL das amostras (10, 20, 40, 80, 160, 240, 320, 480 e 640 µg/mL) ou padrões AG, Que e BHT (5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 160 e 320 µg/mL) foram misturados a 250 µL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,6 e 250 µL de ferricianeto 1 % (m/v em H₂O). Após repouso de 20 min a 50 °C, 250 µL de ácido tricloroacético foi adicionado. Em seguida alíquota (200 µL) foi transferida para microplaca de 96 poços, reveladas com 50 µL de cloreto férrico 0,1% (m/v em H₂O) e analisadas em 700 nm (espectrofotômetro de microplacas modelo ELX800 UV-Vis, BIOTEK, Winooski, Vermont, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicatas para cada concentração.

5.2.3. Identificação de compostos fenólicos de EHP por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM)

As análises por CL-EM foram realizadas em equipamento AGILENT (Santa Clara, Califórnia, EUA) série 1200 acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo série 6400. A separação foi realizada em coluna de fase reversa (C₁₈, 150 x 2,1 mm, 5 µm, Shim-Pack CLC-ODS, SHIMADZU, Kyoto, Japão) a 25 °C. A fase móvel aplicada formada por 0,5 % (v/v) de ácido fórmico em H₂O (solvente A) e 0,5 % (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B) no seguinte gradiente: 0-10: 10 % de B; 10-20 min: 10-30 % de B; 20-30 min: 30-50 % de B; 30-32 min: 50 % de B; 32-38 min 50-10 % de B; 38-48 min: 10 % de B. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e volume de injeção de 5 µL. Os extratos foram eluídos previamente à análise em cartuchos C₁₈ (VARIAN, Palo Alto, Califórnia, EUA) para remoção dos carboidratos de baixa massa.

A ionização por *electrospray* seguiu os seguintes parâmetros: nebulizador 50 psi, 4500 V, fluxo do gás de arraste (N₂) de 11 L/min e temperatura de ionização de 350 °C. O espectrômetro de massas tipo *ion trap* foi operado em modo negativo com varredura de massas de 150 a 1000 massa/carga (m/z).

5.2.4. Estabilidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de *P. americana* Mill.

5.2.4.1. Efeito da temperatura de secagem sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de *P. americana*

As folhas foram divididas em grupos de aproximadamente 150 g e então submetidas à secagem em estufa a temperatura de 40, 50, 60, 70, 90, 100 °C ou liofilizadas. As secagens continuaram até não haver diferença na umidade calculada em dois tempos diferentes. As folhas secas foram submetidas às extrações hidroalcoólicas (SEÇÃO 5.2.1.), dando origem às extratos denominados S40 (40 °C), S50 (50 °C), S60 (60 °C), S70 (70 °C), S90 (90 °C), S100 (100 °C) e SL (liofilizado) de acordo com a condição de secagem (FIGURA 5a). Todos os extratos foram obtidos em duplicatas e avaliados com relação ao conteúdo de fenólicos totais (SEÇÃO 5.1.2.), carboidratos totais (SEÇÃO 5.1.3.), proteínas totais (SEÇÃO 5.1.4.), ácidos urônicos totais (SEÇÃO 5.1.5.) e atividade antioxidante (SEÇÃO 5.2.2.).

5.2.4.2. Efeito da temperatura sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHP)

O extrato controle EHP foi solubilizado (50 mg/mL em etanol 70 %) e submetido a seis diferentes temperaturas (40, 50 60, 70, 80 e 90 °C), em banho maria. Os extratos solubilizados permaneceram em cada temperatura por até 8 h com alíquotas retiradas nos tempos de 0, 3 e 8 h de incubação. As alíquotas foram liofilizadas dando origem aos extratos chamados T40 (40 °C), T50 (50 °C), T60 (60 °C), T70 (70 °C), T80 (80 °C), T90 (90 °C) de acordo com a condição de incubação (FIGURA 5b). Todos os extratos foram obtidos em duplicatas e avaliados com relação ao conteúdo de fenólicos totais (SEÇÃO 5.1.2.), carboidratos totais (SEÇÃO 5.1.3.), proteínas totais (SEÇÃO 5.1.4.), ácidos urônicos totais (SEÇÃO 5.1.5.) e atividade antioxidante (SEÇÃO 5.2.2.).

5.2.4.3. Efeito da estocagem sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHP)

O extrato controle EHP foi solubilizado (50 mg/mL em etanol 70%) e submetido a duas diferentes condições de estocagem (geladeira 4 °C e temperatura

ambiente 25 °C). Os extratos solubilizados permaneceram estocados em cada condição por até 10 meses. Alíquotas foram coletadas em cada mês e após liofilização deram origem aos extratos denominados E4-0, E4-1, E4-2, E4-3, E4-4, E4-5, E4-6, E4-7, E4-8, E4-9, E4-10 (refrigerador 4 °C) e E25-0, E25-1, E25-2, E25-3, E25-4, E25-5, E25-6, E25-7, E25-8, E25-9, E25-10 (temperatura ambiente 25 °C), de acordo com a condição e tempo de estocagem (FIGURA 5b). Todos os extratos foram obtidas em duplicatas e avaliados com relação ao conteúdo de fenólicos totais (SEÇÃO 5.1.2.), carboidratos totais (SEÇÃO 5.1.3.), proteínas totais (SEÇÃO 5.1.4.), ácidos urônicos totais (SEÇÃO 5.1.5.) e atividade antioxidante (SEÇÃO 5.2.2.).

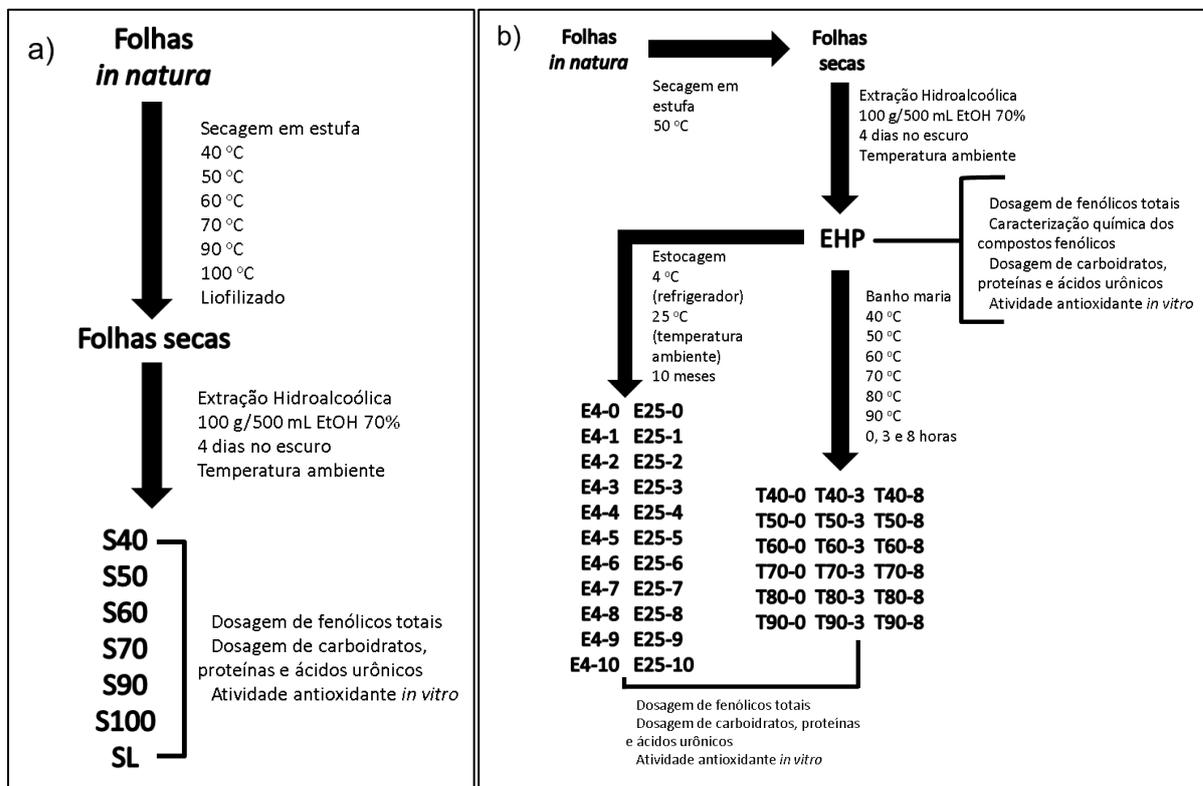


FIGURA 5 – FLUXOGRAMAS DAS ETAPAS DOS ENSAIOS DE ESTABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE *P. americana*.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: a) Fluxograma das etapas de obtenção das amostras submetidas a diferentes temperaturas de secagem das folhas; b) Fluxograma das etapas de obtenção das amostras submetidas à temperatura em solução e estocagem; Dosagem de fenólicos totais pelo método de SINGLETON & ROSSI JR., 1965 (SEÇÃO 5.1.2.). Dosagem de carboidratos totais pelo método de DUBOIS, *et al.*, 1956 (SEÇÃO 5.1.3.). Dosagem de proteínas totais pelo método de BRADFORD, 1976 (SEÇÃO 5.1.4.). Dosagem de ácidos urônicos pelo método de FILISETTI-COZZI & CARPITA, 1991 (SEÇÃO 5.1.5.). Atividade antioxidante pelos métodos de capturação do radical DPPH de BLOIS, 1958 (SEÇÃO 5.2.2.1.) e poder redutor de OYAIZU, 1986 (SEÇÃO 5.2.2.2.); SL – liofilizado; S40 – secagem 40 °C; S50 – secagem 50 °C; S60 – secagem 60 °C; S70 – secagem 70 °C; S90 – secagem 90 °C; S100 – secagem 100 °C; T40 – temperatura em solução 40 °C; T50 – temperatura em solução 50 °C; T60 – temperatura em solução 60 °C; T70 – temperatura em solução 70 °C; T80 – temperatura em solução 80 °C; T90 – temperatura em solução 90 °C; E4 – estocagem 4 °C; E25 – estocagem 25 °C.

5.3. Extrato aquoso das folhas de *P. americana* Mill.

5.3.1. Extração aquosa e purificação de AGP a partir das folhas de *P. americana* Mill.

As etapas de purificação da AGP a partir das folhas do abacateiro estão mostradas no fluxograma da FIGURA 6. Inicialmente, as folhas do abacateiro (Curitiba-PR / S-25,45, O-49,23) previamente secas e pulverizadas foram submetidas à extração aquosa quente (80 °C) na proporção de 100 g / 500 mL por 30 min. Após filtração em filtro de papel, o filtrado foi precipitado em três volumes de etanol dando origem à fração denominada EAP (extração aquosa precipitada). O precipitado foi novamente solubilizado (em H₂O) e submetido a cinco séries de gelo-degelo, sendo cada série composta por congelamento (-20 °C), descongelamento (temperatura ambiente) seguido de centrifugação (2000 rpm/20 min) e coleta do sobrenadante. Após a etapa de gelo-degelo, o sobrenadante foi liofilizado dando origem à fração EAPS (extração aquosa precipitada solúvel).

Por fim, foi realizada a retirada de compostos conjugados por metodologia adaptada de MONOBE *et al.* (2008). Nesta técnica, a cada 100 mg de EAPS foi diluído em 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M e 1 mL de hipoclorito de sódio (NaClO⁻), permanecendo em repouso por 18h a 4 °C. Em seguida, a solução foi dialisada (membrana 12-14 kDa) e precipitada em acetona (concentração final 70 % v/v). O precipitado foi novamente solubilizado em 10 mL de água purificada e submetido à centrifugação por 30 min (1200 x g), dando origem a um sobrenadante claro e uma fração insolúvel de coloração escura. A fração solúvel foi novamente precipitada (acetona concentração final 70% v/v), submetida às lavagens com etanol e acetona, originando a fração AGP das folhas de *P. americana* (denominada FRAGP). As frações obtidas em cada etapa foram monitoradas por cromatografia líquida para avaliação da homogeneidade (SEÇÃO 5.3.2.4.), pela dosagem de carboidratos totais e AGPs, pelos métodos do fenol-ácido sulfúrico (SEÇÃO 5.1.3.) e *single diffusion* (SEÇÃO 5.3.2.5.), respectivamente.

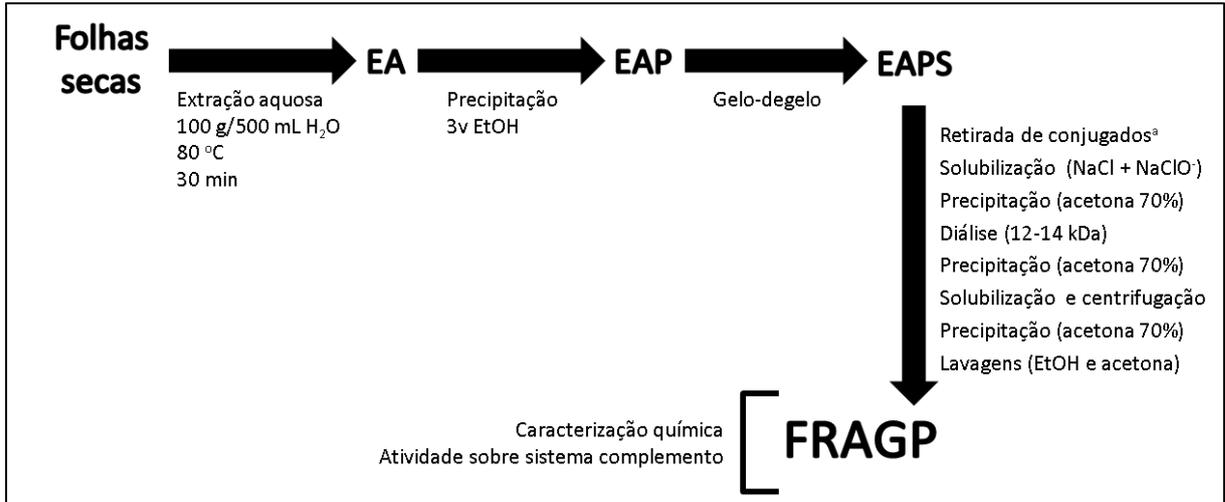


FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA AGP DAS FOLHAS DE *P. americana*.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: ^a Retirada de conjugados conforme MONOBE *et al.*(2008) (SEÇÃO 5.3.1.). As frações obtidas em cada etapa foram monitoradas por cromatografia líquida para avaliação da homogeneidade (SEÇÃO 5.3.2.4.), pela dosagem de carboidratos totais e AGPs pelos métodos do fenol-ácido sulfúrico (SEÇÃO 5.1.3.) e *single diffusion* (SEÇÃO 5.3.2.5.), respectivamente; EA – extrato aquoso; EAP – extrato aquoso precipitado; EAPS – extrato aquoso precipitado solúvel; FRAGP – fração APG das folhas de *P. americana*.

5.3.2. Caracterização química da fração AGP

5.3.2.1. Composição dos monossacarídeos neutros

A composição dos monossacarídeos neutros foi determinada a partir de método descrito por ALBERSHEIM *et al.*, 1967 com adaptações. Os monossacarídeos foram derivatizados a acetato de alditóis e analisados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Por este método, 200 µg de FRAGP, foi submetido à hidrólise com 100 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 2,5 M a 100 °C por 2 h. O produto de hidrólise foi seco em N₂ e ressuspenso em 50 µL de hidróxido de amônio (NH₄OH) 1 M e 50 µL da solução de boridreto de sódio 1 M em hidróxido de amônio 2 M durante 2 h 30 min para a redução. Em seguida o material foi lavado 3-4 vezes com metanol/ácido acético 5 % (v/v) em metanol intercaladas por secagem em N₂. A amostra seca foi acetilada com 250 µL de anidrido acético em estufa (100 °C) por 2 h 30 min. Após este período foi adicionado água purificada (parando a reação) e clorofórmio para solubilizar os acetatos de alditóis resultantes. Por fim, foram realizadas 3-4 lavagens com água purificada (descartando a fase aquosa) e a fase clorofórmica foi seca em N₂ e analisada em cromatógrafo gasoso VARIAN, modelo 3800 acoplado a

espectrômetro de massas SATURN 2000R (CG-EM) (Palo Alto, CA, EUA). A injeção da amostra foi a 50 °C com aumento de 40 °C.min⁻¹ (até no máximo 220 °C), coluna DB-225, 30 m x 0,25 mm (J & M SCIENTIFIC, Folsom, CA, EUA), e hélio como gás de arraste. Todo o material de vidraria utilizado neste processo foi previamente tratado com solução sulfocrômica.

5.3.2.2. Análise das ligações entre os monômeros (metilação)

A determinação dos tipos de ligações entre os monossacarídeos da fração FRAGP foi realizada pelo método de metilação descrito por CIUCANU & KEREK, 1984. O polissacarídeo (100 µg, 50 µL de solução 2 mg/mL) foi inicialmente solubilizado em 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 50 µL de NaOH 120 mg/mL (em DMSO) e após 30 min sob agitação foi adicionado 20 µL de iodeto de metila (CH₃I) por três vezes. A reação foi interrompida com a adição de 1 mL de tiosulfato de sódio 100 mg/mL (em água purificada) e a solução resultante foi solubilizada em 500 µL de clorofórmio. Nesta etapa o material foi lavado diversas vezes com água purificada, sempre descartando a fase aquosa junto com as impurezas. Por fim, a amostra foi seca em N₂ e submetida à hidrólise, redução, acetilação e análise em CG-EM, conforme descrito (SEÇÃO 5.3.2.1.). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes foram identificados através de comparações com o tempo de retenção e perfil de fragmentação de massas (SASSAKI *et al.*, 2005).

5.3.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN-¹H (unidimensional) e HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy* (bidimensional ¹³C/¹H) foram obtidos em equipamento BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance (BRUKER, Karlsruhe, Alemanha) em temperaturas de 70 °C. A fração FRAGP (10 mg) foi solubilizada em 400 µL de água deuterada (D₂O) e os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ), baseados no padrão interno acetona (δ 30,2 e δ 2,22 no ¹³C e ¹H, respectivamente). Os espectros resultantes foram analisados no programa TOPSPIN (BRUKER, Karlsruhe, Alemanha).

5.3.2.4. Análise de Homogeneidade

As homogeneidades das frações testes foram determinadas por meio de cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC – *high pressure size exclusion chromatography*), equipamento WATERS (Milford, MA, EUA), com quatro colunas *ultrahydrogel* 2000, 500, 250 e 120 em série (limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ Da, respectivamente) e acoplado a detectores de UV e índice de refração diferencial (RI – *refractive index*), WATERS modelo 2410 (Milford, MA, USA). As frações testes (1 mg/mL) foi solubilizada em nitrito de sódio 0,1 M contendo azida sódica 200 ppm, filtrada em membranas de acetato de celulose 0,22 μm (MILLIPORE, Billerica, MA, EUA) e aplicada ao cromatógrafo em fluxo de 0,6 mL/min a 20 °C. Os cromatogramas foram analisados no programa ASTRA (WYATT TECHNOLOGY, Goleta, CA, EUA).

5.3.2.5. Dosagem de AGP (*Single Diffusion*)

A dosagem de AGPs foi realizada através do método de difusão radial (*Single Diffusion*) em gel de agarose contendo o reagente β -Glucosil-Yariv (β -GlcY), descrito por VAN HOLST & CLARKE (1985). Neste método, as frações testes foram aplicadas no gel e a quantidade de AGPs é proporcional ao diâmetro do halo formado por difusão. Primeiramente, as frações testes foram solubilizadas em NaCl 1 % (m/v) na concentração de 10 mg/mL e aplicadas, em duplicatas, em orifícios de uma placa de agarose tipo C 1 % (m/v) (CALBIOCHEM, La Jolla, CA, EUA) contendo 0,02 mg/mL de β -GlcY. A placa permaneceu em repouso por 18 h, em ambiente úmido e temperatura ambiente para a realização da difusão radial das AGPs. A síntese do reagente β -GlcY foi realizada de acordo com YARIV *et al.*, 1962 e o teor de AGPs foi determinado a partir de uma curva padrão de goma arábica (0,25 – 3 μg) SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) em relação à percentagem de carboidratos.

5.3.3. Teste de fixação do sistema complemento via clássica

Os efeitos de FRAGP sobre o sistema complemento foi determinado via teste de fixação do sistema complemento por via clássica descrito por YAMADA *et*

al., (1985) com modificações. O método se baseia ativação do sistema complemento pelos eritrócitos sensibilizados, causando hemólise e liberando hemoglobina de alta absorvância a 405 nm.

Inicialmente, foram adicionados 20 µL das frações testes (SEÇÃO 5.3.3.3.) a 50 µL de soro humano diluído em tampão HEPES (SEÇÃO 5.3.3.2.) e após 30 min de incubação a 37 °C (denominada fase de pré-incubação), 50 µL da suspensão de eritrócitos de carneiro sensibilizados 1,2 % (v/v) (SEÇÃO 5.3.3.1.) foram adicionados. Em seguida a solução permaneceu incubada (37 °C) por mais 30 min e então centrifugada (1440 x g por 5 min). Por fim, o sobrenadante (100 µL) foi transferido para placas de 96 poços, que foram analisadas a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas modelo ELX800 UV-Vis (BIOTEK, Winooski, Vermont, EUA).

É importante ressaltar que os componentes do SC, quando ativados possuem um pequeno tempo de meia vida. Neste sentido, ALBAN *et al.*, 2002, modificaram a técnica do ensaio hemolítico de fixação do complemento, utilizado neste estudo, para que seja capaz de diferenciar moléculas ativadoras das inibidoras. Desta forma, foram realizados os mesmos ensaios, mas sem a fase de pré-incubação para diferenciar as moléculas ativadoras das inibidoras (ALBAN, *et al.*, 2002). Assim, 20 µL das frações testes (SEÇÃO 5.3.3.3.), 50 µL de soro humano diluído em tampão HEPES (SEÇÃO 5.3.3.2.) e 50 µL da suspensão de eritrócitos de carneiro sensibilizados 1,2 % (v/v) (SEÇÃO 5.3.3.1) foram misturados e incubados a 37 °C por 30 min. Em seguida, as soluções foram centrifugadas (1440 x g por 5 min) e analisadas a 405 nm em espectrofotômetro.

Todas as placas foram analisadas com os seguintes controles: 1) 100 % de hemólise: incubando os eritrócitos (50 µL) com água (70 µL) ao invés de soro (50 µL) e frações diluídas (20 µL); 2) 100 % de hemólise causada pelo complemento: incubando os eritrócitos (50 µL) e soro (50 µL) com tampão HEPES (20 µL) ao invés das frações diluídas (20 µL); 3) 0 % de hemólise causada pelo complemento: incubando os eritrócitos (50 µL), tampão HEPES (20 µL) e soro inativado (50 µL de soro humano aquecido a 56 °C por 30 min).

Todos os resultados foram apresentados na forma de média ± desvio padrão de cada concentração em triplicatas. As concentrações indicadas nas figuras representam a concentração final nas misturas contendo as frações testes,

complemento e eritrócitos. Os resultados estão na forma de IC50% que corresponde à concentração capaz de inibir 50 % da hemólise causada pelo complemento.

5.3.3.1 Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro

Os eritrócitos de carneiro (5 mL) foram coletados por punção venosas e transferidos a tubos contendo anticoagulante EDTA.Na₂ e centrifugados (1440 x g / 5 min). Em seguida, os eritrócitos foram lavados (3 vezes) com NaCl 0,9 % (m/v) e com tampão HEPES (10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,11 mM, MgCl₂ 0,5 mM, pH 7,4). Após as lavagens, a suspensão foi centrifugada e os eritrócitos ressuspendidos no mesmo tampão na concentração de 2,4 % (v/v). Os eritrócitos foram previamente sensibilizados com adição do mesmo volume de hemolisina (soro de coelho anti-eritrócitos de carneiro, LABORCLIN, Curitiba, PR, Brasil) na diluição de 1:1500, e a mistura incubada a 37 °C por 30 min. Ao fim da incubação, os eritrócitos sensibilizados (concentração 1,2 % v/v) foram utilizados para os ensaios de fixação do sistema complemento via clássica.

5.3.3.2. Obtenção de soro humano (fonte de complemento)

O sangue humano (tipo O⁻) foi obtido de doadores voluntários coletados na ausência de anticoagulante. Em seguida, o sangue foi centrifugado (1440 x g, 15 °C por 20 min) e o soro estocado em alíquotas de 500 µL (refrigerador -80 °C) até a utilização. Primeiramente, foi realizada uma curva de titulação do soro com objetivo de determinar a concentração do soro que lise 50% dos eritrócitos. Para isso, o soro foi diluído (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64; 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800) e 50 µL (em triplicatas) adicionado a 50 µL da suspensão de eritrócitos 1,2 % (v/v) sensibilizados com hemolisina e 20 µL do tampão HEPES. As misturas permaneceram incubadas a 37 °C por 30 min e em seguida centrifugadas (1440 x g por 5 min). Por fim, o sobrenadante (100 µL) foi transferido para microplaca de 96 poços e analisados em espectrofotômetro de microplacas (modelo ELX800 UV-Vis, BIOTEK, Winooski, Vermont, EUA) a 405 nm. A diluição que lisou 50 % dos eritrócitos foi determinada em 1:72 e então utilizada para os ensaios de fixação do sistema complemento.

5.3.3.3. Preparo das frações-testes

A fração FRAGP e os controles heparina suína (polissacarídeo sulfatado padrão de inibidor) (BLAU, Cotia, SP, Brasil) e *zymosan* (glucana $\beta(1\rightarrow3)$ padrão de ativador) (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) foram solubilizados em tampão HEPES para que a concentração final no experimento ficasse 0,2; 0,8; 4,2; 8,3; 16,7; 33,3; 66,7; 100,0; 133,3 e 166,7 $\mu\text{g/mL}$ para FRAGP e 3,2; 6,5; 13,0; 26,0; 52,1; 104,2; 208,3; 416,7 $\mu\text{g/mL}$ para os controles.

Todas as amostras foram previamente testadas com relação à capacidade hemolítica das mesmas. Para isso, foram realizados ensaios de hemólise na ausência da fonte de complemento (soro humano). Inicialmente foram adicionados 20 μL das soluções testes (em todas as concentrações em triplicatas) a 50 μL da suspensão de eritrócitos sensibilizados 1,2 % e a 50 μL do tampão HEPES. As misturas permaneceram incubadas a 37 °C por 30 min, centrifugadas (1440 x g por 5 min) e analisadas a 405 nm (espectrofotômetro de microplacas modelo ELX800 UV-Vis, BIOTEK, Winooski, Vermont, EUA). Para todas as concentrações, a taxa de hemólise foi próxima à zero, desta forma, as frações prosseguiram para os ensaios de fixação do sistema complemento (SEÇÃO 5.3.3.).

5.3.4. Aspectos Éticos e Biossegurança

Os procedimentos experimentais envolvendo os bioensaios utilizando animais de laboratórios foram aprovados e realizados de acordo com as normas do Comitê de Experimentação e Ética Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (855, processo 23075.053625/2014-18) (ANEXO III) e Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UFPR (UFPR/Hospital de Clinicas) (ANEXO IV).

5.4. Análise Estatística

As dosagens de fenólicos, carboidratos, proteínas e ácidos urônicos foram realizadas cinco vezes (EHP – 17 dosagens), em diferentes dias, para as replicatas de cada tratamento. Os ensaios antioxidantes DPPH e poder redutor foram realizados duas vezes para as replicatas com triplicatas de cada concentração. Os

ensaios de fixação do sistema complemento foram realizados três vezes, em diferentes dias, com triplicatas para cada concentração.

Os resultados foram submetidos ao teste de hipóteses *one-way* ANOVA (*Analysis of Variance*) seguido pelo teste de múltiplas comparações teste de Tukey, ou Teste de Student, com nível de significância $p \leq 0,05$. O EC50% (ensaio de DPPH) e IC50% (ensaio do sistema complemento) foram calculados a partir da regressão linear ($r^2 \geq 0,90$) após linearização da curva dose resposta. A correlação de Pearson foi utilizada para verificar a associação entre temperatura de secagem das folhas, concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante (EC50%). O teste de hipóteses Teste t para coeficiente r de Pearson foi utilizado para determinar a significância do valor de r (considerado $r \neq 0$ para $p \leq 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. americana* Mill. e *M. paradisiaca* L.

6.1.1. Rendimento e análises químicas dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. americana* Mill. (EHP) e *M. paradisiaca* L. (EHM)

Os rendimentos e análises químicas estão mostrados na TABELA 1. As folhas secas de *P. americana* (65 % m/m de umidade) e *M. paradisiaca* (55 % m/m de umidade) foram submetidas à extração hidroalcoólica (70 %) por 4 dias no escuro e após liofilização do extrato, os rendimentos foram de $25,2 \% \pm 3,7$ e $15,6 \% \pm 3,3$ (m/m), respectivamente. Os extratos resultantes demonstraram altos teores de carboidratos, $508,5 \pm 85,8$ ($50,8 \% \pm 8,5$ m/m) e $646,1 \pm 59,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($64,6 \% \pm 6,0$ m/m) para *P.americana* e *M. paradisiaca*, respectivamente, sendo maior no extrato oriundo das folhas da bananeira (teste T; $T=2,9$; $gl=8$; $p=0,019$; $n=5$).

A concentração de proteínas foi semelhante para os dois extratos (teste T; $T=0,8$; $gl=8$; $p=0,421$; $n=5$), com cerca de $12,5 \% \pm 2,5$ ($124,6 \pm 25,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) e $11,2 \% \pm 2,1$ (m/m) ($112,1 \pm 20,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) para o extrato do abacateiro e bananeira, respectivamente. A concentração de ácidos urônicos foi baixa e estatisticamente similar para os dois extratos (teste T; $T=0,4$; $gl=8$; $p=0,680$; $n=5$), sendo a média de $1,1 \% \pm 0,3$ ($10,6 \pm 2,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) e $1,0 \% \pm 0,4$ (m/m) ($9,7 \pm 3,6$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) para EHP e EHM, respectivamente. Por fim a, concentração de compostos fenólicos foi de $237,1$

$\pm 25,1$ (23,7 % $\pm 2,5$ m/m) e $119,2 \pm 1,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (11,9 % $\pm 0,1$ m/m) para os extratos EHP e EHM, respectivamente, sendo bem maior no extrato EHP (teste T; T=10,32; gl=20; $p < 0,0001$; $n_{\text{EHP}}=17$; $n_{\text{EHM}}=5$).

TABELA 1 – RENDIMENTOS E CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, ÁCIDOS URÔNICOS E FENÓLICOS DOS EXTRATOS EHP (*Persea americana*) E EHM (*Musa x paradisiaca*).

Extrato	Rendimento (%) ^a	Carboidratos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ^b	Proteínas ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ^c	Ácidos Urônicos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ^d	Fenólicos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ^e
EHP	$25,2 \pm 3,7$	$508,5 \pm 85,8$	$124,6 \pm 25,4$	$10,6 \pm 2,7$	$237,1 \pm 25,1$
EHM	$15,6 \pm 3,3$	$646,1 \pm 59,8$	$112,1 \pm 20,9$	$9,7 \pm 3,6$	$119,2 \pm 1,1$

FONTE: O autor (2017).

NOTA: ^a Determinado a partir da massa do extrato liofilizado em relação à massa inicial das folhas secas; ^b Determinado através da dosagem colorimétrica de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956) (SEÇÃO 5.1.3.) com curva padrão de glucose 0,4-40 μg ($y=0,00275x$; $r^2=0,98$) e representado na forma de μg equivalentes por mg do extrato seco; ^c Determinado através da dosagem colorimétrica de proteínas (BRADFORD, 1976) (SEÇÃO 5.1.4.) com curva padrão de ovo-albumina 0,4-40 μg ($y=0,0405x-0,012$; $r^2=0,96$) e representado na forma de μg equivalentes por mg do extrato seco; ^d Determinado através da dosagem colorimétrica de ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI & CARPITA, 1991) (SEÇÃO 5.1.5.) com curva padrão de ácido glucurônico 1-100 μg ($y=0,0549x$; $r^2=0,99$) e representado na forma de μg equivalentes por mg do extrato seco; ^e Determinado através da dosagem colorimétrica de compostos fenólicos (SINGLETON & ROSSI JR., 1965) (SEÇÃO 5.1.2.) com curva padrão de ácido gálico 1-50 μg ($y=0,0239x$; $r^2=0,95$) e representado na forma de μg equivalentes por mg do extrato seco; Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de cinco dosagens de cada replicata (EHP – 17 dosagens); EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*; EHM – extrato hidroalcoólico das folhas de *M. paradisiaca*.

6.1.2. Atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. americana* Mill. (EHP) e *M. paradisiaca* L. (EHM)

Os resultados de atividade antioxidante (EHP e EHM) por captação do radical DPPH (FIGURA 7 e TABELA 2) e poder redutor (FIGURA 8) indicam que ambos os extratos possuem atividade antioxidante. A captação do radical livre DPPH de ambos os extratos (EHP e EHM) foi dose dependente (*one-way* ANOVA; $F=107,2$; $p < 0,0001$; gl=8; grupos=9; $n=2$ e $F=309,1$; $p < 0,0001$; gl=8; grupos=9; $n=2$, para EHP e EHM, respectivamente) e maior no extrato oriundo das folhas da *P. americana* (EHP). Na maior concentração testada (640 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a captação chegou a $88,4 \% \pm 2,1$ e $79,3 \% \pm 2,5$ dos radicais DPPH para EHP e EHM, respectivamente (FIGURA 7).

A concentração capaz de captar 50% dos radicais DPPH (EC50%) foi estatisticamente menor para o extrato EHP (EC50% = $57,8 \pm 5,4 \mu\text{g/mL}$) em relação à EHM (EC50% = $194,3 \pm 5,3 \mu\text{g/mL}$) (teste T; $T=25,5$; $gl=2$; $p=0,0015$; $n=2$), indicando maior atividade de captação do radical DPPH para o extrato EHP (TABELA 2). Os EC50% dos padrões comerciais foram de $9,2 \pm 1,3$; $21,0 \pm 1,4$ e $9,4 \pm 1,4$ para ácido gálico (AG), BHT (*butylated hydroxytoluene*) e quercetina (Que) (TABELA 2).

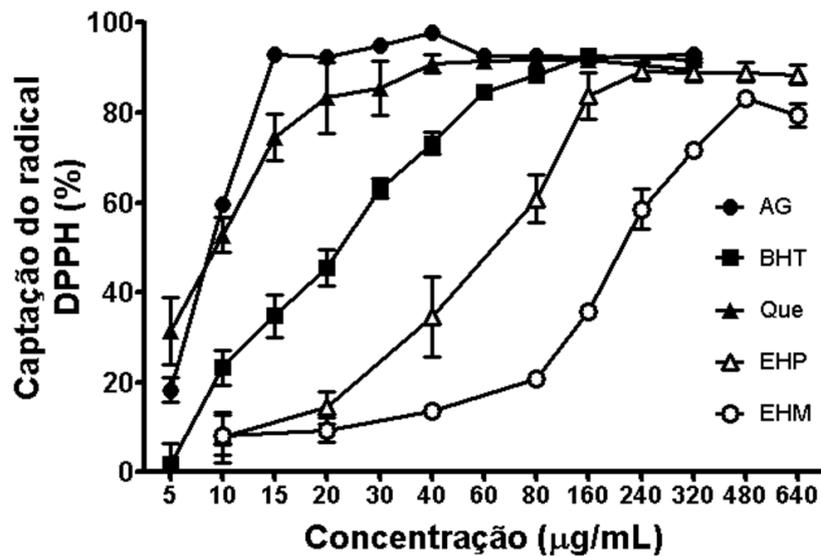


FIGURA 7 – CAPTAÇÃO DO RADICAL DPPH DOS EXTRATOS EHP, EHM E PADRÕES COMERCIAIS.

AUTOR: O autor (2017).

NOTA: Determinado através da dosagem colorimétrica de captação do radical DPPH (BLOIS, 1958) (SEÇÃO 5.2.2.1.); Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de duas dosagens de cada replicata; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*; EHM – extrato hidroalcoólico das folhas de *M. paradisiaca*; AG – ácido gálico; BHT - *butylated hydroxytoluene*; Que – quercetina.

TABELA 2 – ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS DPPH (EC50%) DOS EXTRATOS EHP, EHM E PADRÕES COMERCIAIS.

Captação de DPPH	EHP	EHM	GA	BHT	Que
EC50% ($\mu\text{g/mL}$)	$57,8 \pm 5,4$	$194,3 \pm 5,3$	$9,2 \pm 1,3$	$21,0 \pm 1,4$	$9,4 \pm 1,4$

FONTE: O autor (2017)

NOTA: Determinado através da dosagem colorimétrica de captação do radical DPPH (BLOIS, 1958) (SEÇÃO 5.2.2.1.); EC50% calculado a partir da equação das curvas de captação de radicais DPPH linearizada (FIGURA 7); Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão do EC50% de cada replicata; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*; EHM – extrato hidroalcoólico das folhas de *M. paradisiaca*; AG – ácido gálico; BHT - *butylated hydroxytoluene*; Que – quercetina.

Como no ensaio de captação de radical DPPH, o poder redutor foi maior para o extrato de *P.americana* e apresentou resposta dose dependente (*one-way* ANOVA; F=26,9; p<0,0001; gl=8; grupos=9; n=2; para EHP e F=88,1; p<0,0001; gl=8; grupos=9; n=2; para EHM), sendo que na concentração de 640 µg/mL, o poder redutor de EHP apresentou valor 2,8 vezes maior que de EHM (teste T; T=12,9; gl=2; p=0,006; n=2) (FIGURA 8).

Comparando-se com os padrões utilizados que são fortes antioxidantes purificados, os resultados, por ambos os métodos, indicam que os extratos EHP e EHM possuem alta atividade antioxidante, sendo maior no extrato EHP. Uma série de trabalhos tem mostrado a relação entre atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos de extratos vegetais (DJERIDANE, *et al.*, 2006; TURKMEN, SARI & VELIOGLU, 2006; JAVANMARDI, *et al.*, 2003; VELIOGLU, *et al.*, 1998). Neste sentido, a maior atividade antioxidante do extrato EHP provavelmente ocorre devido ao maior teor de compostos fenólicos, quando comparado com o extrato EHM.

A concentração de compostos fenólicos de EHP ($237,1 \pm 25,1$ µg/mg) e EHM ($119,2 \pm 1,1$ µg/mg) foram maiores que em extratos de folhas ditos antioxidantes, como de *Camelia sinensis* ($58,7 \pm 2,9$ µg/mg) (CHAN, LIM & CHEW, 2007) amora (*Morus indica* L.) ($71,0 \pm 2,5 - 93,2 \pm 1,0$ µg/mg) (ARABSHAHI-DELOUEE & UROOJ, 2007), amora silvestre (*Rubus* sp.) ($48,5 \pm 5,1$ µg/mg), framboesa (*Rubus idaeus* L.) ($54,7 \pm 3,8$ µg/mg) e morango (*Fragaria x ananassa* D.) ($30,9 \pm 3,1$ µg/mg) (WANG & LIN, 2000). Neste sentido, fica evidente que o potencial das folhas de *M. paradisiaca* e principalmente de *P. americana* como fontes naturais de compostos fenólicos antioxidantes pode ser muito explorado. Desta maneira, os experimentos de caracterização química e estabilidade dos compostos fenólicos foram realizados somente para as folhas com maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (*P. americana*).

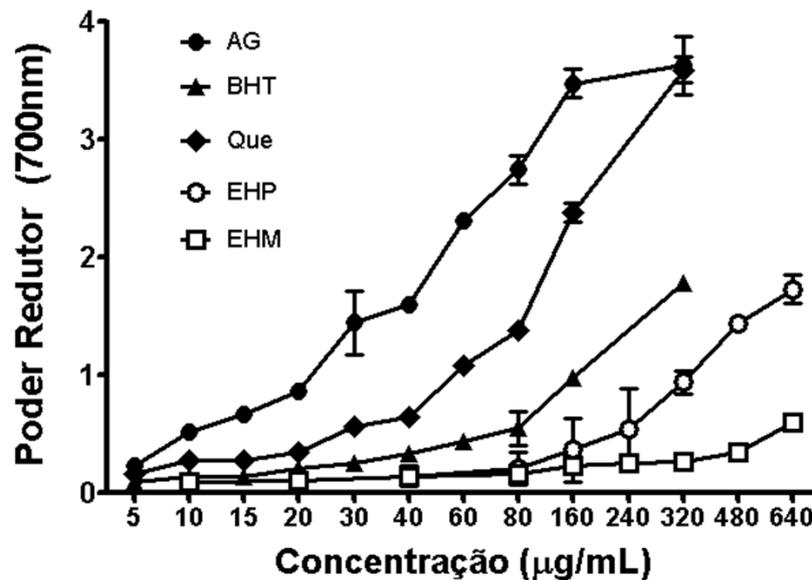


FIGURA 8 – PODER REDUTOR DAS EXTRATOS EHP, EHM E PADRÕES COMERCIAIS. AUTOR: O autor (2017).

NOTA: Determinado através da dosagem colorimétrica de poder redutor OYAIU (1986) (SEÇÃO 5.2.2.2.); Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de duas dosagens de cada replicata; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*; EHM – extrato hidroalcoólico das folhas de *M. paradisiaca*; AG – ácido gálico; BHT - *butylated hydroxytoluene*; Que – quercetina.

6.1.3. Identificação de compostos fenólicos de EHP por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM)

A CL-EM foi realizada com objetivo de identificar os compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana* (EHP). Com esta técnica, é possível obter uma série de informações sobre a estrutura de compostos fenólicos em extratos vegetais sem necessidade de isolamento prévio dos compostos (ESCARPA & GONZÁLEZ, 1998; ALONSO-SALCES *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2007). O perfil de eluição apresentou a separação de pelo menos 26 grupos de compostos em 30 min de corrida (FIGURA 9). Destes 26 picos, 21 foram identificados e sugeridos (TABELA 3 / FIGURA 11) baseados nos tempos de eluição e massas em comparação com a literatura (FIGURA 10) (DE ALMEIDA *et al.*, 1998; APÁTI, *et al.*, 2002; ALONSO-SALCES, *et al.*, 2005; MONAGAS, *et al.*, 2005; STRACKE *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007; BERNAL, *et al.*, 2013; BRITO, *et al.*, 2014; ALVÁREZ *et al.*, 2016; JIMÉNEZ *et al.*, 2017).

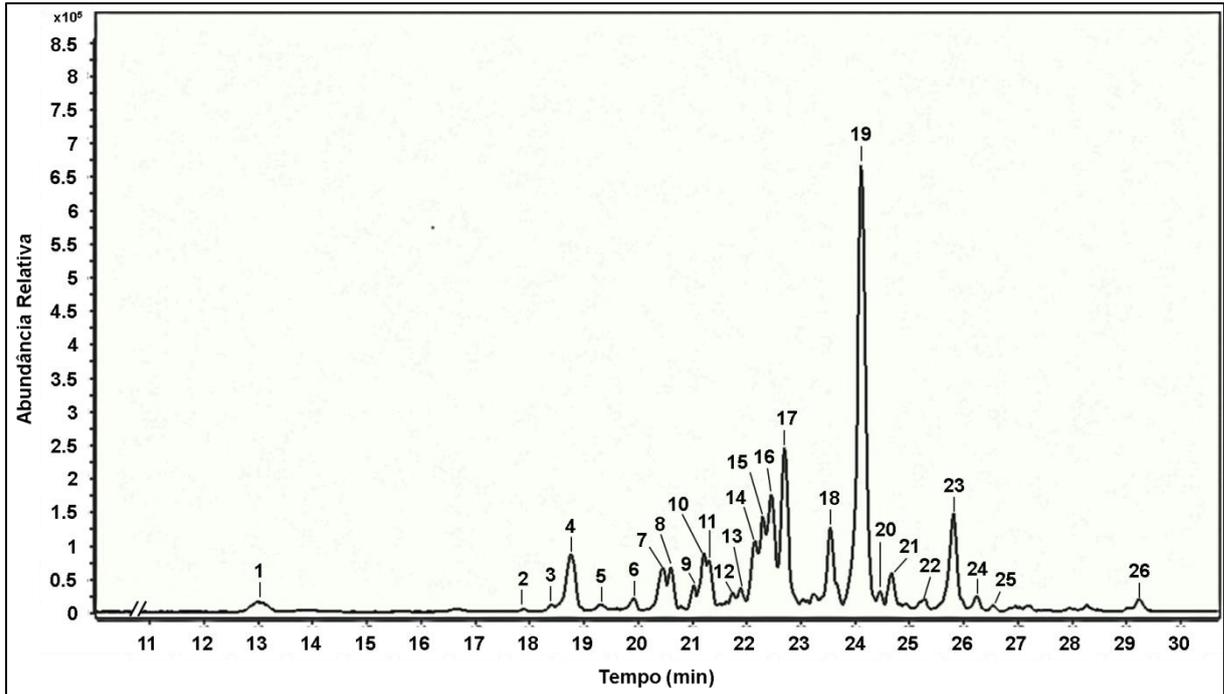


FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO EHP DAS FOLHAS DE *P. americana*.

AUTOR: O autor (2017).

NOTA: Cromatograma obtido em equipamento AGILENT série 1200; Separação realizada em coluna de fase reversa (C₁₈, 150 x 2,1 mm, 5 μm) a 25 °C; Fase móvel 0,5 % de ácido fórmico em H₂O (solvente A) e 0,5 % de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B) no seguinte gradiente: 0-10: 10 % de B; 10-20 min: 10-30 % de B; 20-30 min: 30-50 % de B; 30-32 min: 50 % de B; 32-38 min 50-10 % de B; 38-48 min: 10 % de B. Fluxo de 1,0 mL/min E volume de injeção de 5 μL (SEÇÃO 5.2.3.).

Os picos 1, 3, 4, 5 e 6 apresentaram íons $[M - H]^-$ em m/z 577, 863, 865, 863 (575) e 865, respectivamente, característicos de uma classe de compostos fenólicos denominados flavan-3-ols. O pico 1 foi identificado como um dímero de procianidina tipo B, provavelmente procianidina B1 (epicatequina-(4β→8)-catequina) (FIGURA 10a). Picos 4 e 6 foram identificados como trímeros de procianidinas tipo B, sendo o primeiro provavelmente procianidina C1(epicatechin-(4β-8)-epicatechin-(4β-8)-epicatechin) (FIGURA 10c,e). Os picos 3 e 5 apresentaram íons $[M - H]^-$ em m/z 575 e 863 que foram considerados dímeros (provavelmente procianidina A2) e trímeros de procianidias tipo A, respectivamente (FIGURA 10b,d).

Para os picos 7-25, todos os compostos identificados foram classificados como flavonols glicosilados (kaempferol e quercetina). Kaempferol tri-glicosilado foi identificado nos picos 7, 10 e 11 com íons $[M - H]^-$ em m/z 739, 741 e 741, respectivamente (FIGURA 10f,h,i). Flavonols mono-glicosilados como kaempferol-3-O-arabinosídeo (pico 21, íon $[M - H]^-$ em m/z 417) (FIGURA 10r), kaempferol-3-O-glucosídeo (astragalina, pico 20 e 22, íon $[M - H]^-$ em m/z 447) (FIGURA 10q,s) e

kaempferol-3-O-ramnosídeo (afzelina, pico 23 e 24, íon $[M - H]^-$ em m/z 431) (FIGURA 10t,u) também foram identificados.

Para os glicosídeos de quercetina, foi sugerido a presença de quercetina-3-O-[ramnosil-glicosídeo]-7-ramnosídeo (pico 8, íon $[M - H]^-$ em m/z 755) (FIGURA 10g), quercetina-3-O-arabinoglucosídeo (peltatosídeo, pico 12, íon $[M - H]^-$ em m/z 595) (FIGURA 10j); quercetina-3-O-ramnoglicosídeo (rutina, pico 14, íon $[M - H]^-$ em m/z 609) (FIGURA 10l), quercetina-3-O-galactosídeo (hiperosídeo, pico 16, íon $[M - H]^-$ em m/z 463) (FIGURA 10m) e quercetina-3-O-glucosídeo (isoquercitrina, pico 17, íon $[M - H]^-$ em m/z 463) (FIGURA 10n). Pico 18 apresentou dois íons $[M - H]^-$ principais em 433 e 505, os quais podem ser referentes à avicularina (quercetina-3-O-arabinosídeo) e quercetina-3-O-glucose-6''-acetato, respectivamente (FIGURA 10o). O pico 19 (íon $[M - H]^-$ em m/z 447) foi identificado como quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo) (FIGURA 10q) e por fim, pico 26, com maior retenção, foi assinalado como uma flavona luteolina-8-glucosídeo (orientina, íon $[M - H]^-$ em m/z 447) (FIGURA 10v).

DE ALMEIDA *et al.* (1998) e ALVÁREZ *et al.* (2016) reportaram a grande concentração de flavonols glicosilados nas folhas do gênero *Persea* (incluindo *P. americana*), como kaempferol-3-O-arabinosídeo, kaempferol-3-O-ramnosídeo (afzelina), quercetina-3-O-arabinosídeo (peltatosídeo), quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina), quercetina-3-O-galactosídeo (hiperosídeo), quercetina-3-O-glucosídeo (isoquercitrina). Os compostos astragalina (kaempferol-3-O-ramnosídeo), rutina (quercetina-3-O-ramnoglicosídeo) bem como os dímeros e trímeros de procianidinas também já foram relatados para as folhas de *P. americana* (JIMÉNEZ *et al.*, 2017). Interessantemente, não foi encontrado a aglicona quercetina nem kaempferol di-glicosilados previamente reportado por JIMÉNEZ *et al.* (2017). Por outro lado, a presença de flavonols tri-glicosilados (kaempferol tri-glicosilados e quercetina-3-O-[ramnosil-glicosídeo]-7-ramnosídeo), encontrados em outras espécies vegetais (STRACKE *et al.*, 2007), parece ser inédita para a espécie *P. americana*. É importante ressaltar que a alta concentração de quercitrina (pico 19) também não foi relatada por outros autores (DE ALMEIDA *et al.*, 1998; JIMÉNEZ *et al.*, 2017). Desta forma, é possível concluir que as folhas de *P. americana* representam uma rica fonte de compostos fenólicos com diversas estruturas

químicas, principalmente flavonoides denominados flavan-3-ols e flavonols glicosilados.

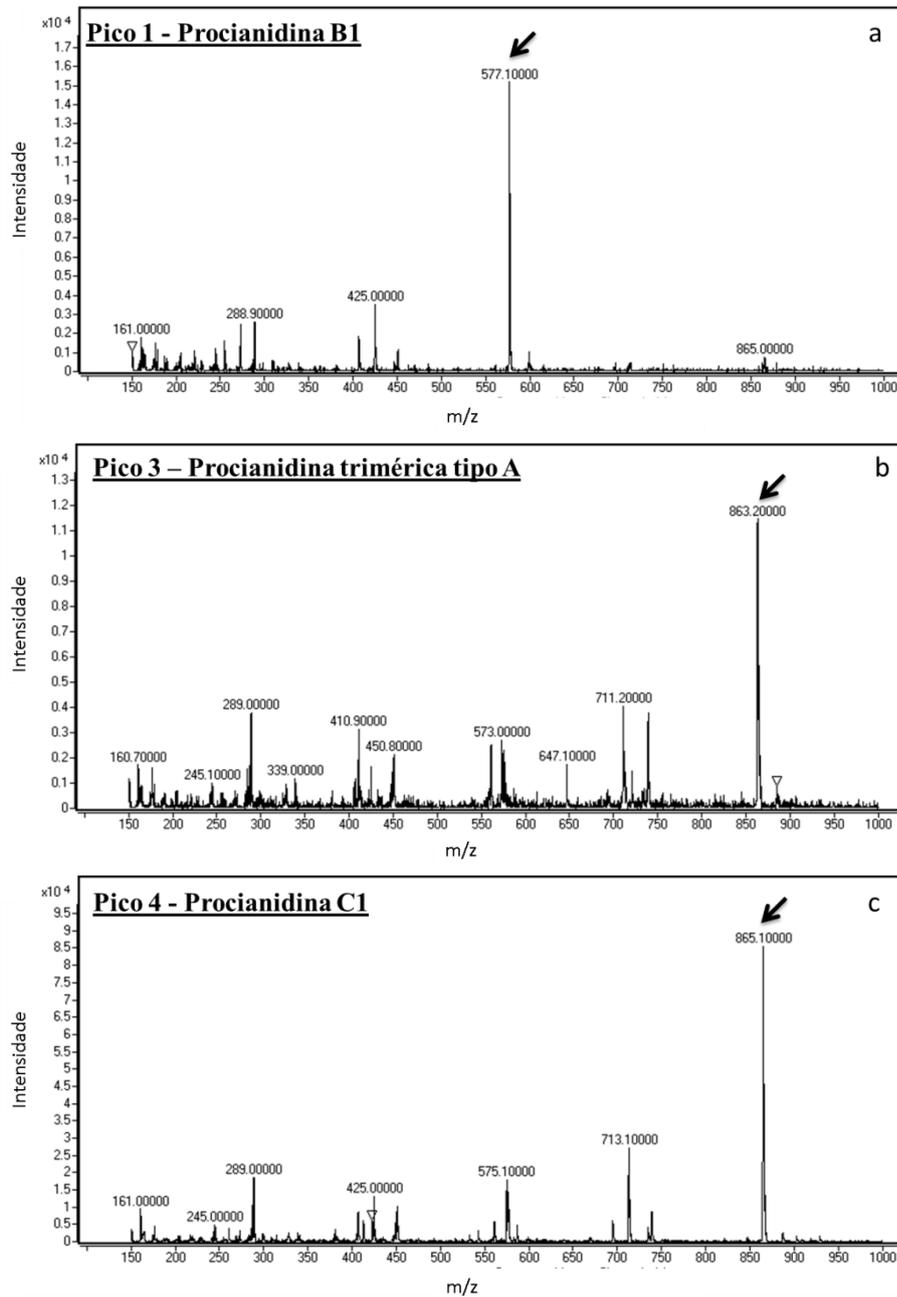
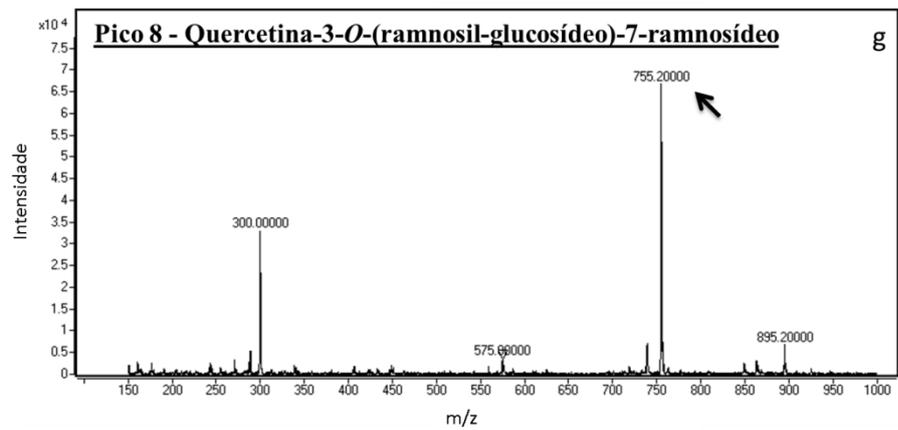
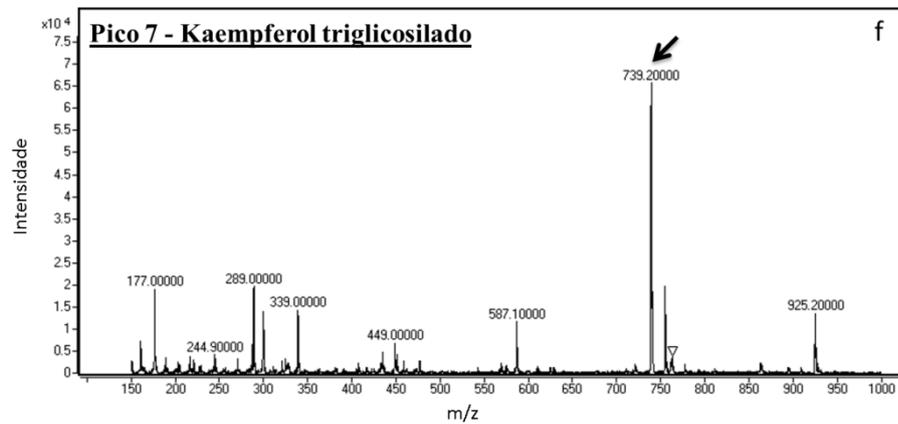
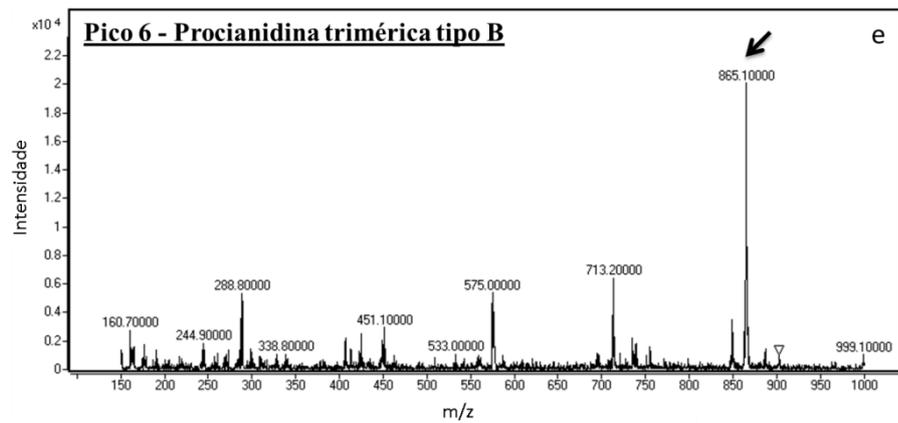
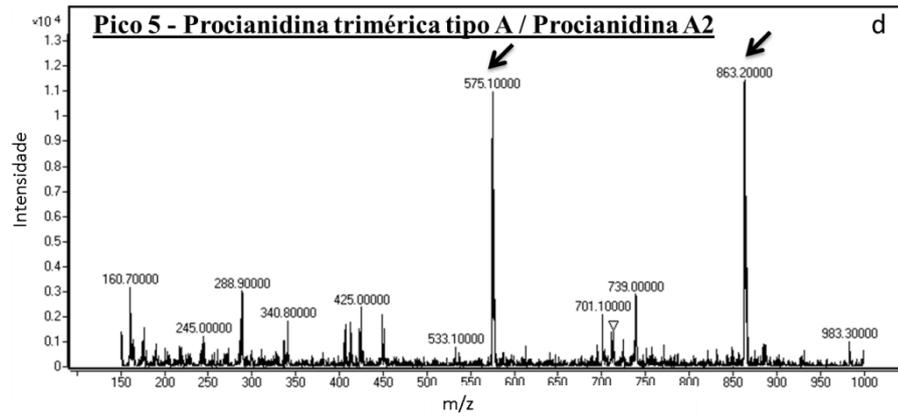


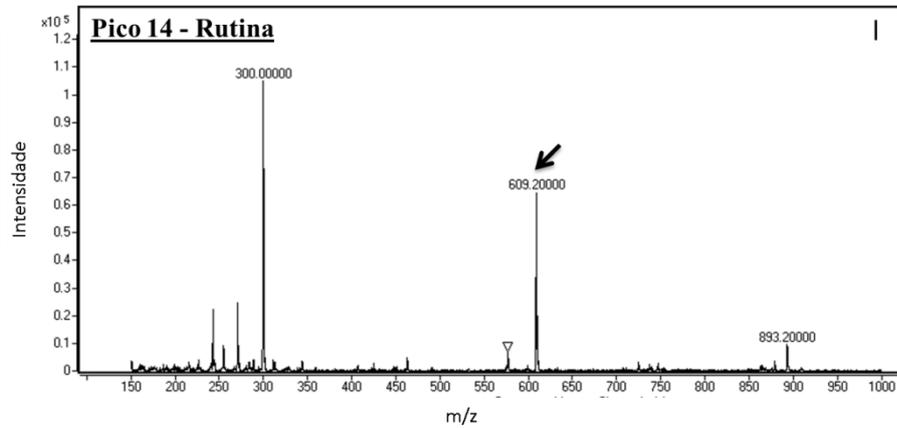
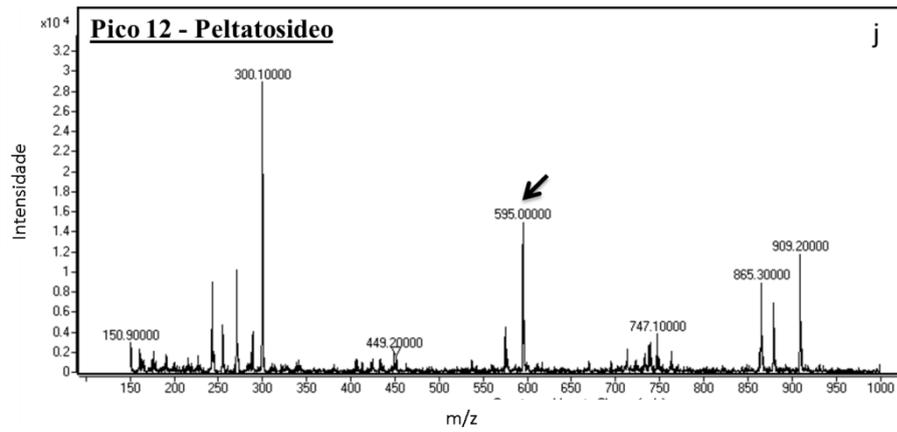
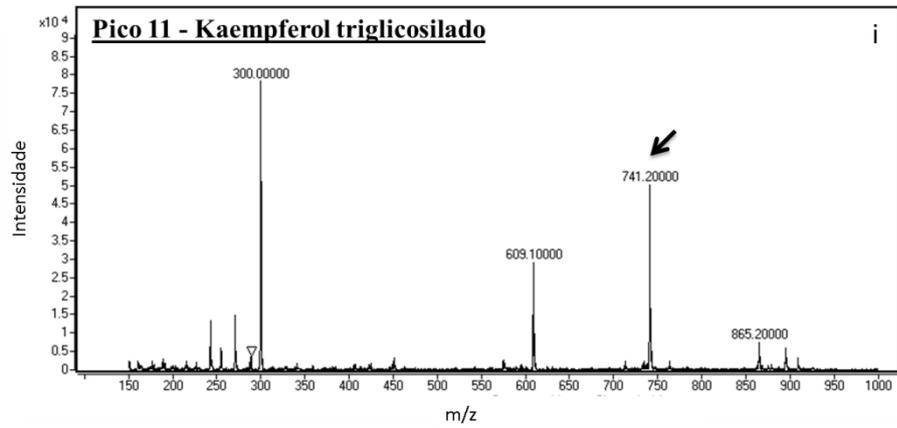
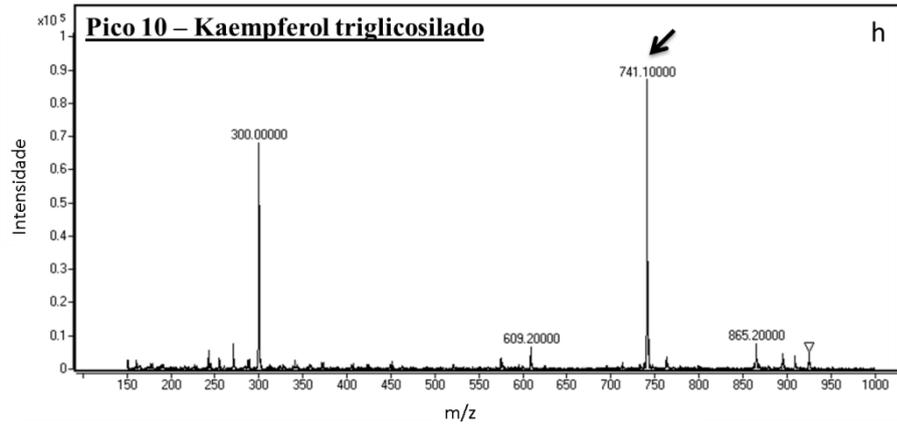
FIGURA 10 – ESPECTROS DE MASSA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO EHP DAS FOLHAS DE *P. americana*.

FONTE: O autor (2017).

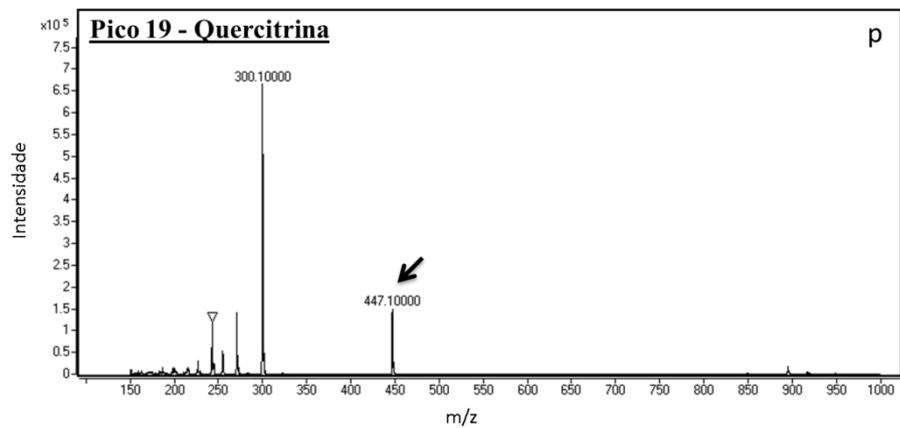
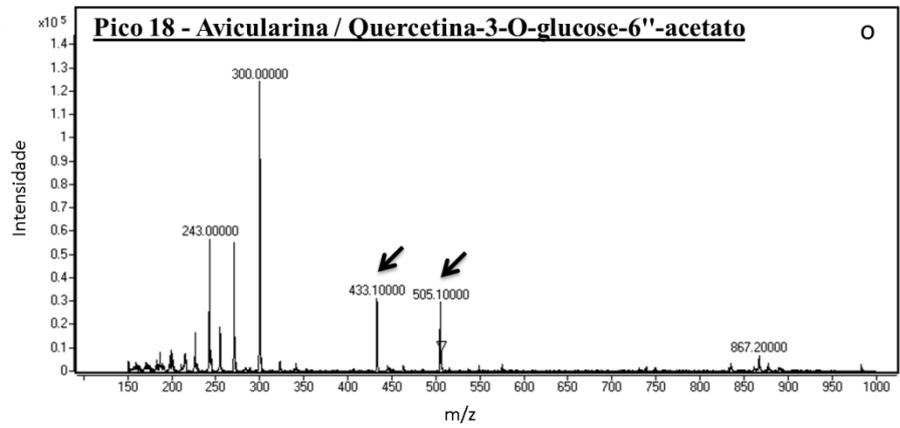
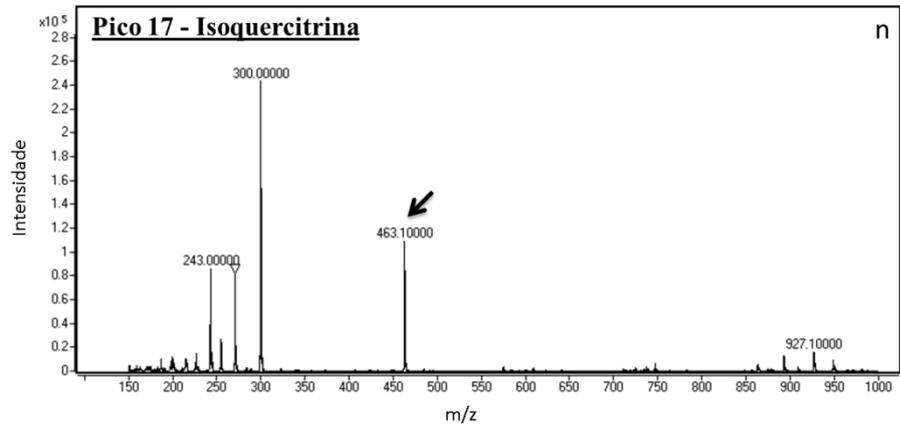
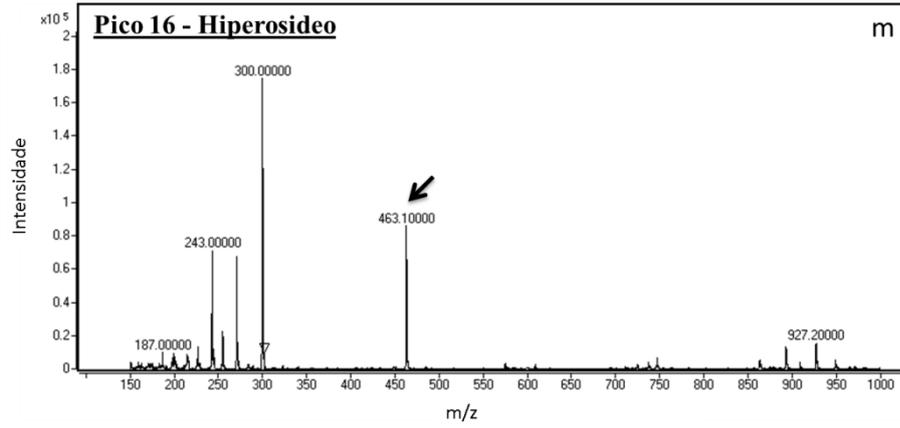
NOTA: a) Procianidina B1; b) Procianidina trimérica tipo A; c) Procianidina C1; d) Procianidina trimérica tipo A / Procianidina A2; e) Procianidina trimérica tipo B; f,h,i) Kaempferol tri-glicosilado; g) Quercetina-3-O-(ramnosil-glucosídeo)-7-ramnosídeo; j) Peltatosídeo; l) Rutina; m) Hiperosídeo; n) Isoquercitrina; o) Avicularina / Quercetina-3-O-glucose-6"-acetato; p) Quercitrina; q,s) Astragalina; r) Kaempferol-3-O-arabinosídeo; t,u) afzelina; v) Orientina; Determinados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (SEÇÃO 5.2.3.); Separação por cromatografia líquida demonstrada no cromatograma da FIGURA 9; Ionização por *electrospray* com nebulizador 50 psi, 4500 V, fluxo do gás de arraste (N₂) de 11 L/min e temperatura de ionização de 350 °C. Espectrômetro de massas tipo *ion trap* operado em modo negativo com varredura de massas de 150 a 1000 massa/carga (m/z).



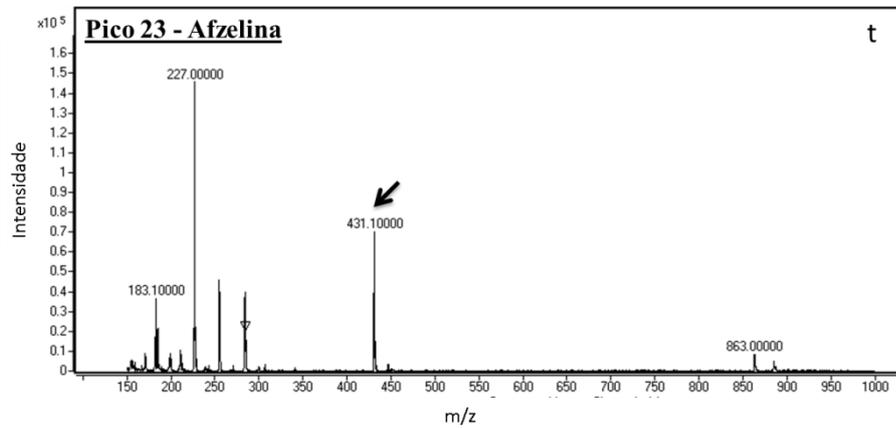
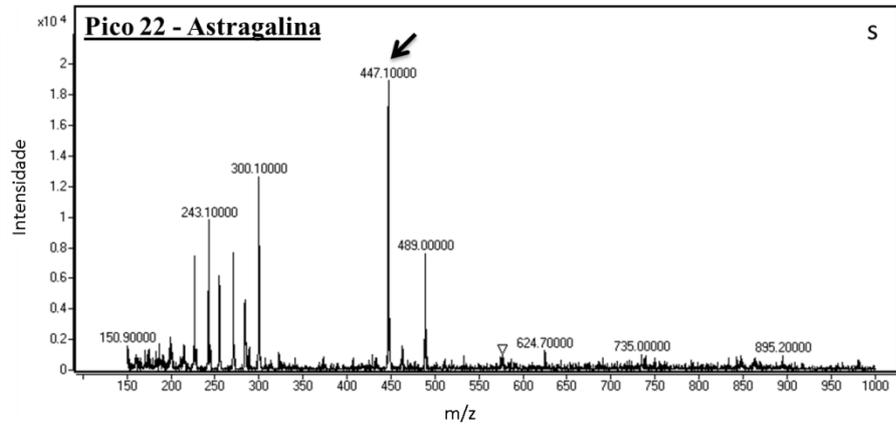
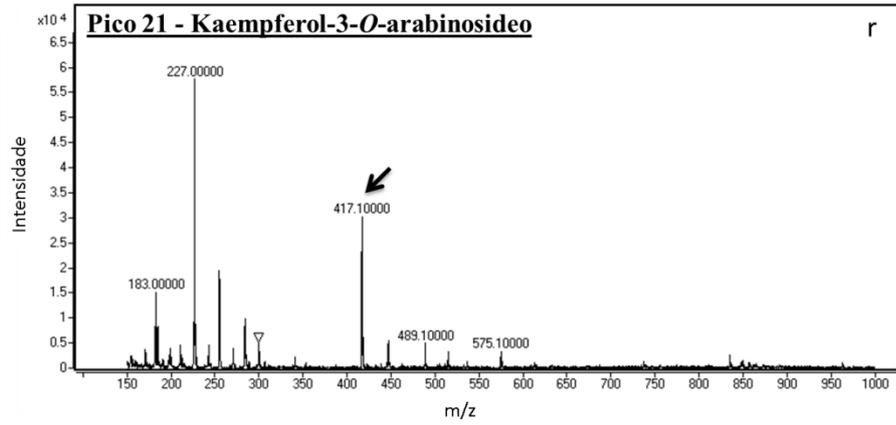
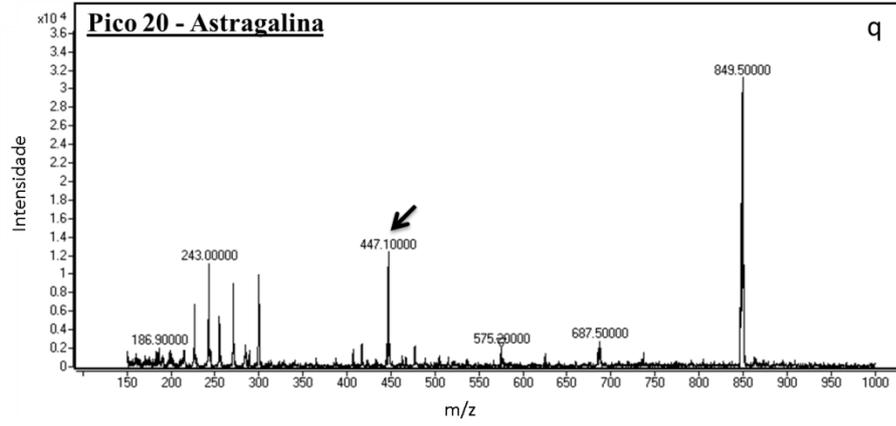
CONTINUAÇÃO



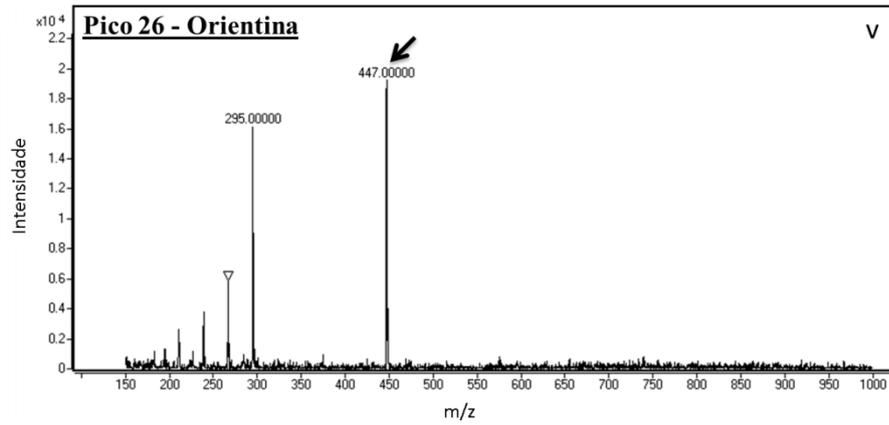
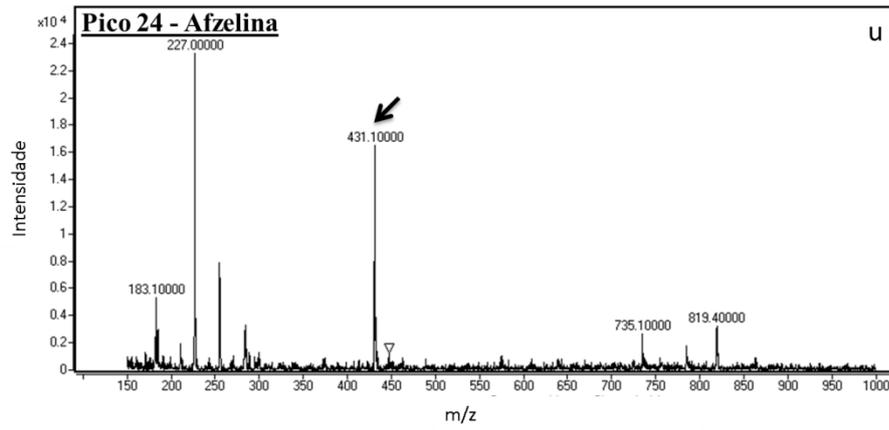
CONTINUAÇÃO



CONTINUAÇÃO



CONTINUAÇÃO



CONTINUAÇÃO.

TABELA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS SUGERIDOS PARA O EXTRATO HIDROALCOÓLICO EHP DAS FOLHAS DE *P. americana*.

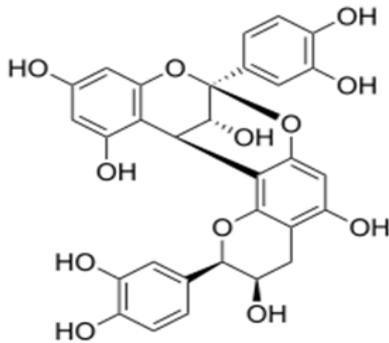
Pico	TR (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Composto Sugerido
1	13,0	577	Procianidina B1
2	17,9	329	nd
3	18,4	863	Procianidina trimérica tipo A
4	18,8	865	Procianidina C1
5	19,3	575 / 863	Procianidina trimérica tipo A e Procianidina A2
6	19,9	865	Procianidina trimérica tipo B
7	20,5	739	Kaempferol triglicosilado
8	20,6	755	Quercetina-3-O-(Rha-Glu)-7-Rhamnosideo
9	21,0	909	nd
10	21,2	741	Kaempferol triglicosilado
11	21,3	741	Kaempferol triglicosilado
12	21,7	595	Quercetina-3-O-arabinoglucosideo (Peltatosideo)
13	21,9	300	nd
14	22,2	609	Quercetina-3-O-rhamnoglucosideo (Rutina)
15	22,4	300	nd
16	22,5	463	Quercetina-3-O-galactosideo (Hyperosideo)
17	22,7	463	Quercetina-3-O-glucosideo (Isoquercitrina)
18	23,5	433 / 505	Quercetina-3-O-arabinosideo (Avicularina) e Quercetina-3-O-glucose-6"-acetato
19	24,1	447	Quercetin-3-O-rhamnoside (Quercitrina)
20	24,5	447	Kaempferol-3-O-glucosideo (Astragalina)
21	24,7	417	Kaempferol-3-O-arabinosideo
22	25,3	447	Kaempferol-3-O-glucosideo (Astragalina)
23	25,8	431	Kaempferol-3-O-rhamnosideo (Afzelina)
24	26,2	431	Kaempferol-3-O-rhamnosideo (Afzelina)
25	26,5	575	nd
26	29,2	447	Luteolina-8-C-glucoside (Orientina)

FONTE: O autor (2017).

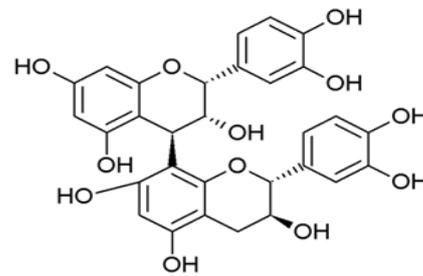
NOTA: Determinados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (SEÇÃO 5.2.3.); Separação por cromatografia líquida demonstrada no cromatograma da FIGURA 9; Espectros de massas mostrados na FIGURA 10; TR – tempo de retenção; nd – não determinado.

Procianidinas diméricas

Tipo A

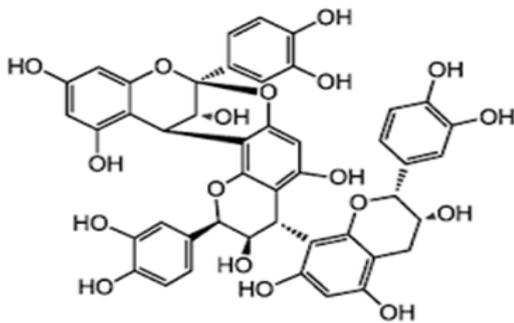


Tipo B

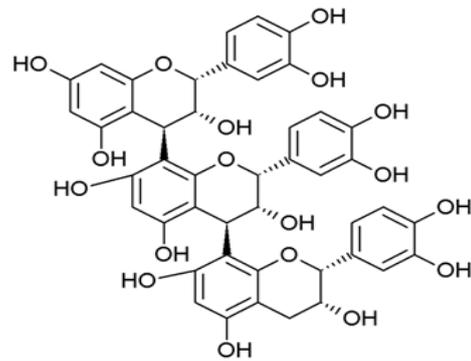


Procianidinas triméricas

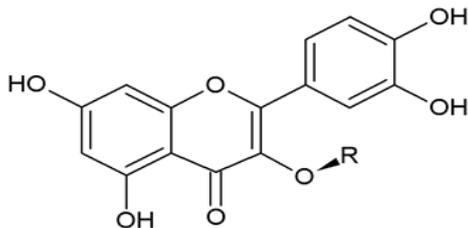
Tipo A



Tipo B

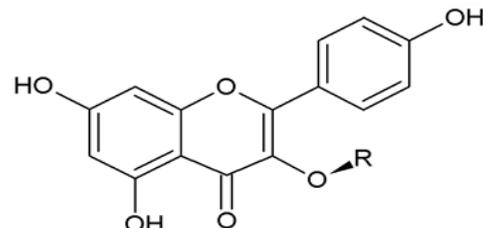


Quercetina



- R
- (Rha-Glu)-7-Rhamnosídeo
 - Arabinoglucosídeo
 - Ramnoglusídeo
 - Galactosídeo
 - Glucosídeo
 - Arabinosídeo
 - Ramnosídeo

Kaempferol



- R
- Triglicosiado
 - Arabinosídeo
 - Glucosídeo
 - Ramnosídeo

FIGURA 11 - COMPOSTOS FENÓLICOS SUGERIDOS PARA O EXTRATO HIDROALCOÓLICO EHP DAS FOLHAS DE *P. americana*.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Determinados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (SEÇÃO 5.2.3.); Separação por cromatografia líquida demonstrada no cromatograma da FIGURA 9; Espectros de massas mostrados na FIGURA 10.

6.1.4. Estabilidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de *P. americana* Mill.

6.1.4.1. Efeito da temperatura de secagem das folhas sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de *P. americana*

As folhas do abacateiro, após secagem em sete modos diferentes (40, 50, 60, 70, 90, 100 °C e liofilizado) e extração hidroalcoólica (70 % por 4 dias no escuro) apresentaram teor de umidade e rendimento médios de 61,4 % ± 2,2 (m/m) e 22,6 % ± 4,4 (m/m), respectivamente. A taxa de desidratação foi maior com o aumento da temperatura, sendo os tempos de secagem de 43,4 h (40 °C), 19,2 h (50 °C), 7,1 h (60 °C), 6,2 h (70 °C), 3,2 h (90 °C) e 1,0 h (100 °C) (correlação de Pearson; $r=-0,82$; $p=0,043$; $n=6$).

As secagens a 40 °C (S40), 50 °C (S50) e 60 °C (S60) e liofilizada (SL) deram origem a extratos com concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante semelhantes. Por outro lado, extratos oriundos de folhas secas acima de 70 °C (S70, S90 e S100) apresentaram uma redução na concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante (FIGURA 12). A concentração de compostos fenólicos variou de 130,0 ± 7,6 a 233 ± 36,8 µg/mg, sendo maior no extrato SL (liofilizada) e menor no extrato S90 (secagem à 90 °C) (*one-way* ANOVA; $F=13,28$; $p=0,0016$; $gl=6$; $grupos=7$; $n=2$) (FIGURA 12a). As temperaturas de secagem das folhas foram negativamente correlacionadas às concentrações de compostos fenólicos (correlação de Pearson; $r=-0,81$; $p=0,025$; $n=6$), sugerindo que altas temperaturas dão origem a extratos com menores teores de compostos fenólicos (FIGURA 12a₁).

A atividade antioxidante de captação do radical DPPH (EC50%) apresentou dois grupos distintos: extratos com maior atividade oriundas de folhas secas a temperaturas abaixo de 70 °C (40, 50, 60 °C e liofilizadas); e extratos com menor atividade, oriundas de folhas secas acima de 70 °C (70, 90 e 100 °C) (*one-way* ANOVA; $F=10,69$; $p=0,0032$; $gl=6$; $grupos=7$; $n=2$) (TABELA 4). A temperatura de secagem das folhas se mostrou também correlacionada com o DPPH-EC50% (correlação de Pearson; $r=+0,90$; $p=0,014$; $n=6$) e poder redutor (640 µg/mL) (correlação de Pearson; $r=-0,89$; $p=0,016$; $n=6$), sugerindo que altas temperaturas

de secagem das folhas dão origem a extratos com atividades antioxidantes menores (FIGURA 12b₁).

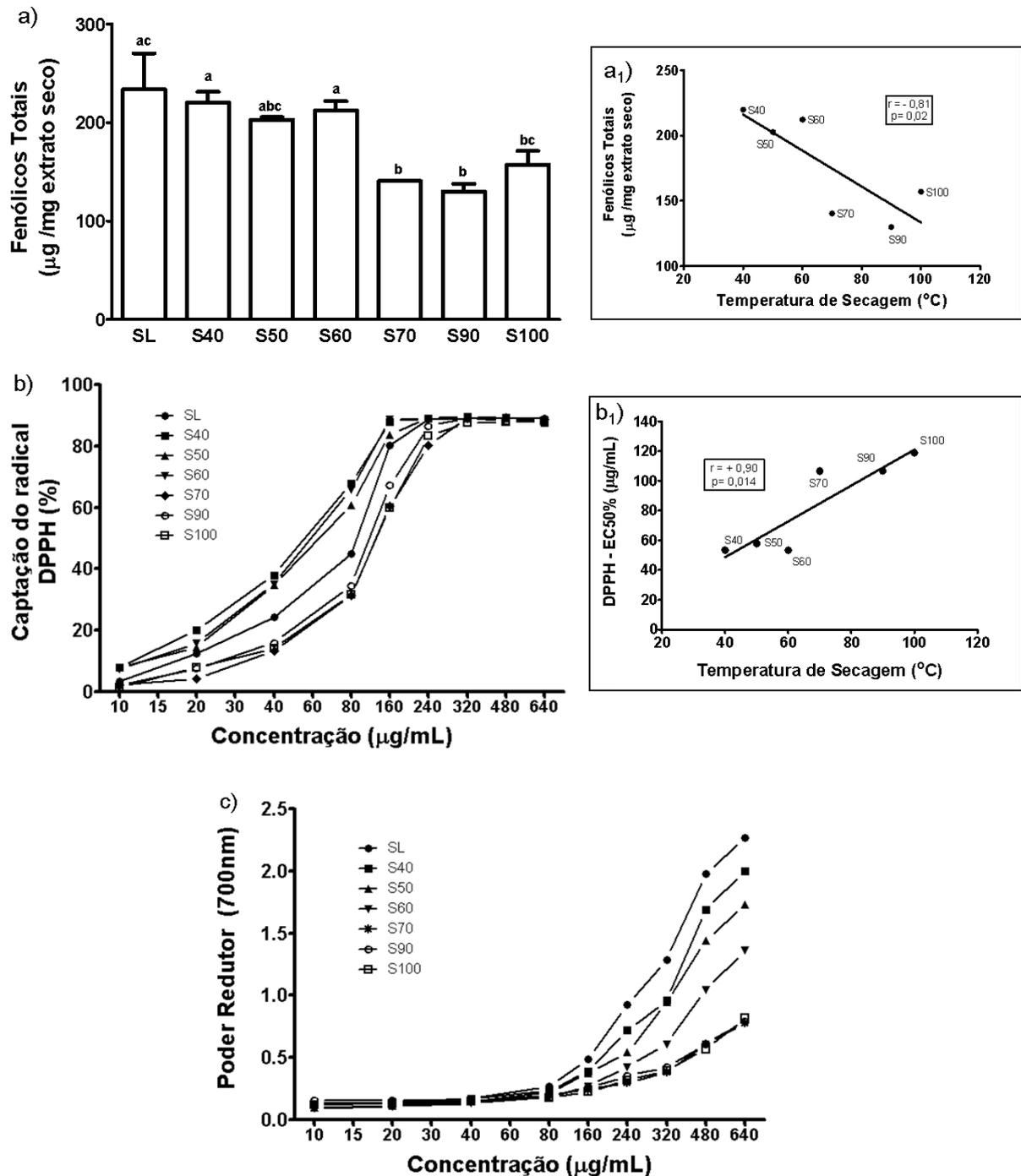


FIGURA 12 – ESTABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE A DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECAGEM DAS FOLHAS DE *P. americana*.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: a) Conteúdo de compostos fenólicos totais; a1) Correlação temperatura de secagem x fenólicos totais; b) Captação do radical DPPH; b1) Correlação temperatura de secagem x DPPH – EC50%; c) Poder redutor; Fenólicos totais determinados através da dosagem colorimétrica de compostos fenólicos (SINGLETON & ROSSI JR., 1965) (SEÇÃO 5.1.2.) com curva padrão de ácido gálico 1-50 μg ($y=0,0239x$; $r^2=0,95$); Os resultados de fenólicos totais estão expressos em média \pm desvio padrão de cinco dosagens de cada replicata ($n=2$); Diferentes letras (gráfico “a”) representam diferenças significativas determinadas por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p<0,05$);

Captação do radical DPPH determinado através da dosagem colorimétrica de captação do radical DPPH (BLOIS, 1958) (SEÇÃO 5.2.2.1.); EC50% calculado a partir da equação das curvas de captação de radicais DPPH linearizada; Os resultados de EC50% estão expressos em média de cada replicata (n=2); Poder redutor determinado através da dosagem colorimétrica de poder redutor OYAIZU (1986) (SEÇÃO 5.2.2.2.); Os resultados de captação de DPPH e poder redutor estão expressos em média de duas dosagens de cada replicata (n=2); SL – liofilizado; S40 – secagem 40 °C; S50 – secagem 50 °C; S60 – secagem 60 °C; S70 – secagem 70 °C; S90 – secagem 90 °C; S100 – secagem 100 °C.

Por fim, como observado por outros autores (DJERIDANE, *et al.*, 2006; TURKMEN, SARI & VELIOGLU, 2006; JAVANMARDI, *et al.*, 2003; VELIOGLU, *et al.*, 1998), houve associação entre a concentração de compostos fenólicos com captação de radicais DPPH (EC50%) (correlação de Pearson; $r=-0,93$; $p=0,003$; $n=6$) e poder redutor (640 $\mu\text{g/mL}$) (correlação de Pearson; $r=+0,92$; $p=0,005$; $n=6$), sugerindo que as altas temperaturas de secagens das folhas diminuíram as concentrações de compostos fenólicos, que por sua vez atenuou a atividade antioxidante dos extratos resultantes.

TABELA 4 – ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS DPPH (EC50%) DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *P. americana* SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECAGEM.

Extrato	DPPH EC50% ($\mu\text{g/mL}$)
SL	76,1 \pm 18,2 ^{ab}
S40	53,4 \pm 18,3 ^a
S50	57,8 \pm 5,4 ^a
S60	53,4 \pm 1,1 ^a
S70	106,6 \pm 5,2 ^b
S90	106,7 \pm 8,4 ^b
S100	110,4 \pm 11,8 ^b

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Determinado através da dosagem colorimétrica de captação do radical DPPH (BLOIS, 1958) (SEÇÃO 5.2.2.1.); EC50% calculado a partir da equação das curvas de captação de radicais DPPH linearizada (FIGURA 11b); Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão do EC50% de cada replicata (n=2); Diferentes letras representam diferenças significativas determinadas por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p<0,05$); SL – liofilizado; S40 – secagem 40 °C; S50 – secagem 50 °C; S60 – secagem 60 °C; S70 – secagem 70 °C; S90 – secagem 90 °C; S100 – secagem 100 °C.

MAILLARD & BERSET (1995) propõem três possíveis mecanismos para explicar a variação de compostos fenólicos de extratos submetidos a altas temperaturas: primeiro, liberação de fenólicos ligados a macromoléculas (ex. ligações ácido *p*-cumárico e lignina / ligações ácido ferúlico e arabinoxilanas); segundo, degradação parcial da lignina e liberação de ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos); e por fim, a degradação térmica pode ocorrer.

QUE *et al.* (2008) e VEGA-GÁLVEZ, *et al.* (2009) sugerem que o aumento da atividade antioxidante de extratos oriundos de secagens a altas temperaturas pode ser devido: 1 – aos altos tempos de secagens a baixas temperaturas; e 2 – pela formação de compostos de alta atividade antioxidante denominados melanoidinas (macromoléculas de alta massa molecular formadas em altas temperaturas via reação de Maillard). Entretanto, a maioria dos relatos sugere que altas temperaturas de secagem atuam diminuindo a concentração de compostos fenólicos de extratos vegetais via degradação térmica (LARRAURI, RUPÉREZ & SAURA-CALIXTO, 1997; KATSUBE *et al.*, 2009; MRAD *et al.*, 2012).

Neste estudo, particularmente, a diminuição na concentração de compostos fenólicos em extratos submetidos a altas temperaturas de secagem sugerem que a degradação térmica é provavelmente o principal mecanismo. Desta forma, um controle rígido da temperatura de secagem se mostra um importante passo para a manutenção dos altos níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos provenientes das folhas de *P. americana*.

Diferentemente dos compostos fenólicos, as concentrações de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos não foram alterados pela temperatura de secagem das folhas (*one-way* ANOVA; $F=1,016$; $p=0,484$; $gl=6$; $grupos=7$; $n=2$, $F=0,180$; $p=0,974$; $gl=6$; $grupos=7$; $n=2$ e $F=0,698$; $p=0,661$; $gl=6$; $grupos=7$; $n=2$, respectivamente) (FIGURA 13). Desta forma, é possível inferir que estes compostos são estáveis à temperatura de secagem das folhas e que pouco influenciam na atividade antioxidante resultante do extrato.

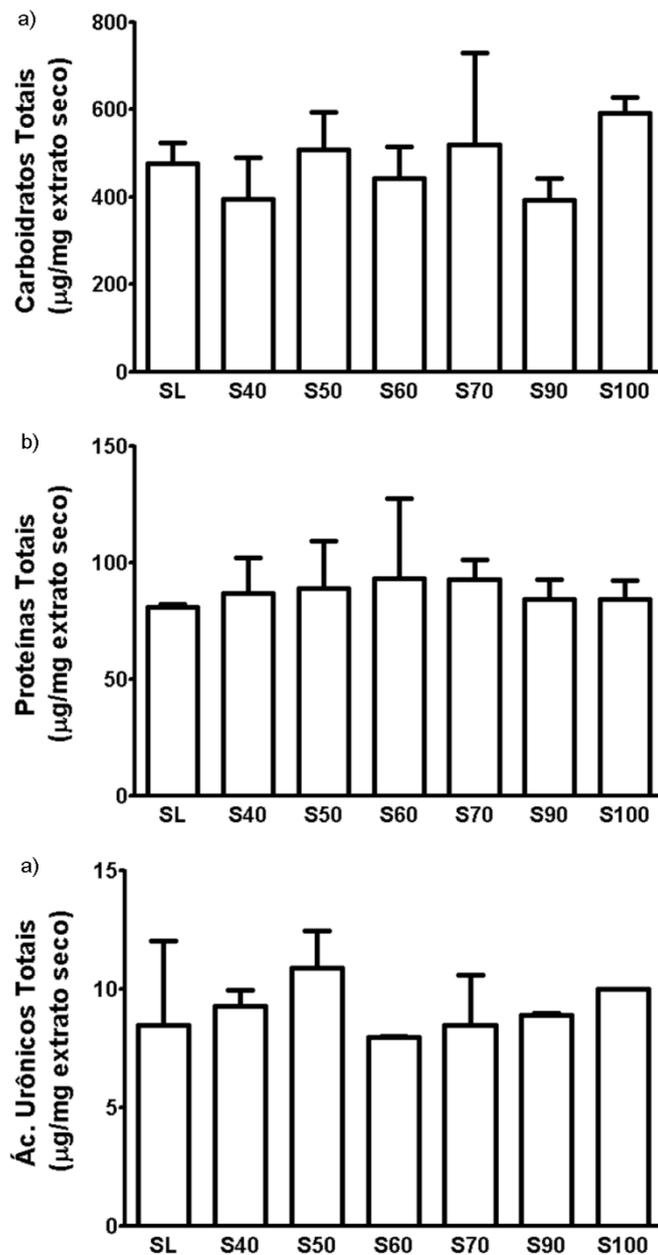


FIGURA 13 – DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DE CARBOIDRATOS TOTAIS (a), PROTEÍNAS TOTAIS (b) E ÁCIDOS URÔNICOS TOTAIS (c) DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *P. americana* SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECAGEM.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Carboidratos totais determinados através da dosagem colorimétrica de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956) (SEÇÃO 5.1.3.) com curva padrão de glucose 0,4-40 µg ($y=0,00275x$; $r^2=0,98$); Proteínas totais determinados através da dosagem colorimétrica de proteínas (BRADFORD, 1976) (SEÇÃO 5.1.4.) com curva padrão de ovo-albumina 0,4-40 µg ($y=0,0405x-0,012$; $r^2=0,96$); Ácidos urônicos totais determinados através da dosagem colorimétrica de ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI & CARPITA, 1991) (SEÇÃO 5.1.5.) com curva padrão de ácido glucurônico 1-100 µg ($y=0,0549x$; $r^2=0,99$); Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de cinco dosagens de cada replicata ($n=2$); Não houve diferenças significativas na concentração de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey; SL – liofilizado; S40 – secagem 40 °C; S50 – secagem 50 °C; S60 – secagem 60 °C; S70 – secagem 70 °C; S90 – secagem 90 °C; S100 – secagem 100 °C.

6.1.4.2. Efeito da temperatura sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHP)

A incubação do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana* (EHP) em diversas temperaturas (40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C por até 8 h) não apresentou efeito significativo tanto na concentração de compostos fenólicos quanto na atividade antioxidante relacionada (FIGURA 14). A concentração de compostos fenólicos apresentou valores entre $197,4 \pm 9,5$ a $259,3 \pm 28,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ e estatisticamente semelhantes ao extrato de origem EHP ($259,3 \pm 28,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) (*one-way* ANOVA; $F=1,113$; $p=0,382$; $gl=18$; $\text{grupos}=19$; $n=2$; $n_{\text{EHP}}=17$).

A atividade antioxidante e dosagens de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos foram realizadas somente para os extratos submetidas a 8 horas de incubação. Para os ensaios de captação do radical DPPH, as curvas de atividades foram bem semelhantes (FIGURA 14b) e com valores de EC50% entre $61,5 \pm 1,7$ a $77,8 \pm 8,1$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mesmo os extratos submetidos a altas temperaturas, a atividade antioxidante (EC50%) não foi diferente do extrato controle EHP (DPPH-EC50% = $57,8 \pm 5,4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) (*one-way* ANOVA; $F=2,903$; $p=0,0589$; $gl=6$; $\text{grupos}=7$; $n=2$) (TABELA 5). O poder redutor do extrato EHP também se mostrou estável frente à temperatura em solução (FIGURA 14c), com atividades semelhantes mesmo na maior concentração testada (640 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (*one-way* ANOVA; $F=3,812$; $p=0,0517$; $gl=6$; $\text{grupos}=7$; $n=2$).

O estresse térmico em extratos solúveis geralmente diminui a concentração de compostos fenólicos via degradação térmica (ARABSHAHI-DELOUEE & UROOJ, 2007; KATSUBE *et al.*, 2009), mas raramente pode induzir a formação de compostos com propriedades antioxidantes (GAZZANI *et al.*, 1998). Interessantemente, os compostos fenólicos de EHP em solução parecem ser estáveis e capazes de manter a atividade antioxidante relacionada frente a todas as temperaturas testadas.

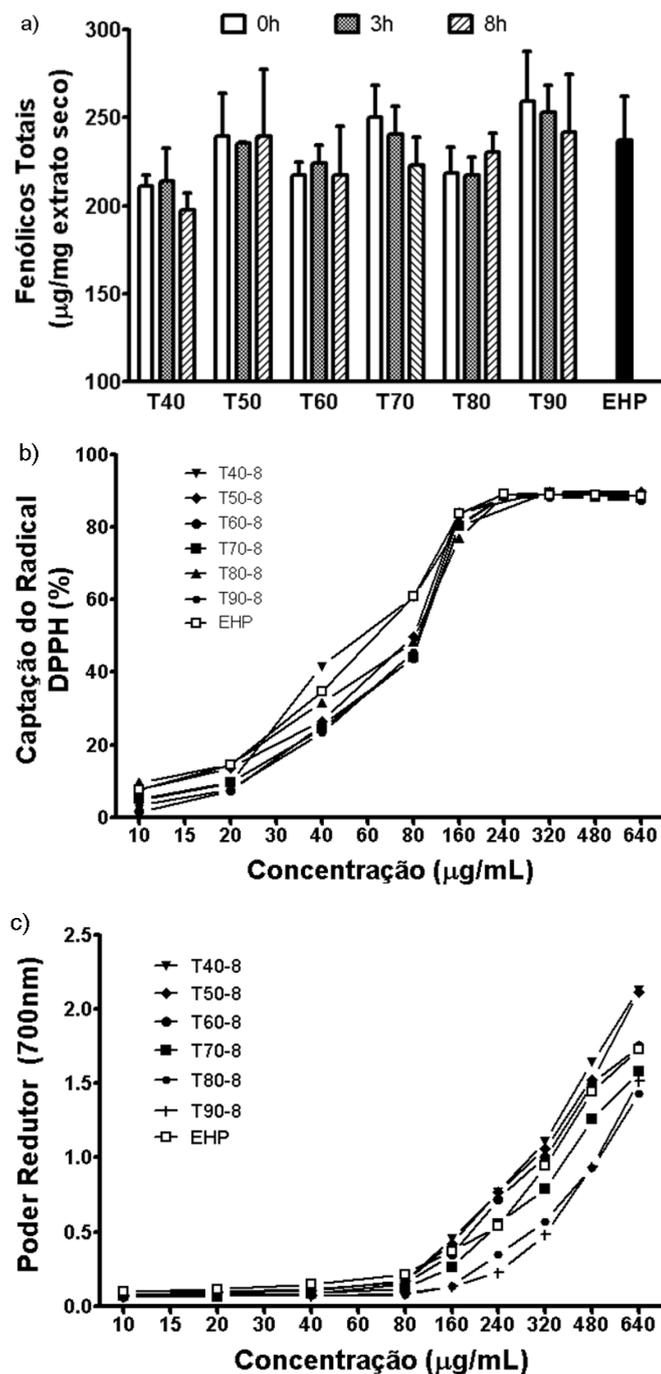


FIGURA 14 – ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *P. americana* FRENTE A DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO DO EXTRATO EHP.

FONTES: O autor (2017).

NOTA: a) Conteúdo de compostos fenólicos totais; b) Captação do radical DPPH; c) Poder redutor; Fenólicos totais determinados através da dosagem colorimétrica de compostos fenólicos (SINGLETON & ROSSI JR., 1965) (SEÇÃO 5.1.2.) com curva padrão de ácido gálico 1-50 μg ($y=0,0239x$; $r^2=0,95$); Os resultados de fenólicos totais estão expressos em média \pm desvio padrão de cinco dosagens de cada replicata (EHP – 17 dosagens); Não houve diferenças significativas na concentração de compostos fenólicos (gráfico “a”) por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey; Atividade antioxidante determinada para os extratos submetidos a 8 h de incubação; Captação do radical DPPH determinado através da dosagem colorimétrica de captação do radical DPPH (BLOIS, 1958) (SEÇÃO 5.2.2.1.); Poder redutor determinado através da dosagem colorimétrica de poder redutor OYAIZU (1986) (SEÇÃO 5.2.2.2.); Os resultados de captação de DPPH e poder redutor estão

expressos em média de duas dosagens de cada replicata (n=2); T40-8 – temperatura em solução 40 °C por 8 h; T50-8 – temperatura em solução 50 °C por 8 h; T60-8 – temperatura em solução 60 °C por 8 h; T70-8 – temperatura em solução 70 °C por 8 h; T80-8 – temperatura em solução 80 °C por 8 h; T90-8 – temperatura em solução 90 °C por 8 h; ; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*.

TABELA 5 – ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS DPPH (EC50%) DA EXTRATO EHP SUBMETIDO A DIFERENTES TEMPERATURAS (8 HORAS) EM SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA.

Extrato	DPPH EC50% (µg/mL)
T40-8	61,5 ± 1,7
T50-8	70,9 ± 0,6
T60-8	77,8 ± 8,1
T70-8	77,0 ± 0,7
T80-8	69,1 ± 6,5
T90-8	74,1 ± 8,2
EHP	57,8 ± 5,4

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Determinado através da dosagem colorimétrica de captação do radical DPPH (BLOIS, 1958) (SEÇÃO 5.2.2.1.); EC50% calculado a partir da equação das curvas de captação de radicais DPPH linearizada (FIGURA 13b); Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão do EC50% de cada replicata; Não houve diferenças significativas nos ECs50% por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey; T40-8 – temperatura em solução 40 °C por 8 h; T50-8 – temperatura em solução 50 °C por 8 h; T60-8 – temperatura em solução 60 °C por 8 h; T70-8 – temperatura em solução 70 °C por 8 h; T80-8 – temperatura em solução 80 °C por 8 h; T90-8 – temperatura em solução 90 °C por 8 h; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*.

Por fim, as concentrações de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos não foram alteradas pela temperatura em solução do extrato hidroalcoólico EHP (*one-way* ANOVA; F=1,016; p=0,484; gl=6; grupos=7; n=2, *one-way* ANOVA; F=0,180; p=0,974; gl=6; grupos=7; n=2 e *one-way* ANOVA; F=0,698; p=0,661; gl=6; grupos=7; n=2, respectivamente) (FIGURA 15). Desta forma, é possível inferir que estes compostos são também estáveis a altas temperaturas em solução por até 8 horas.

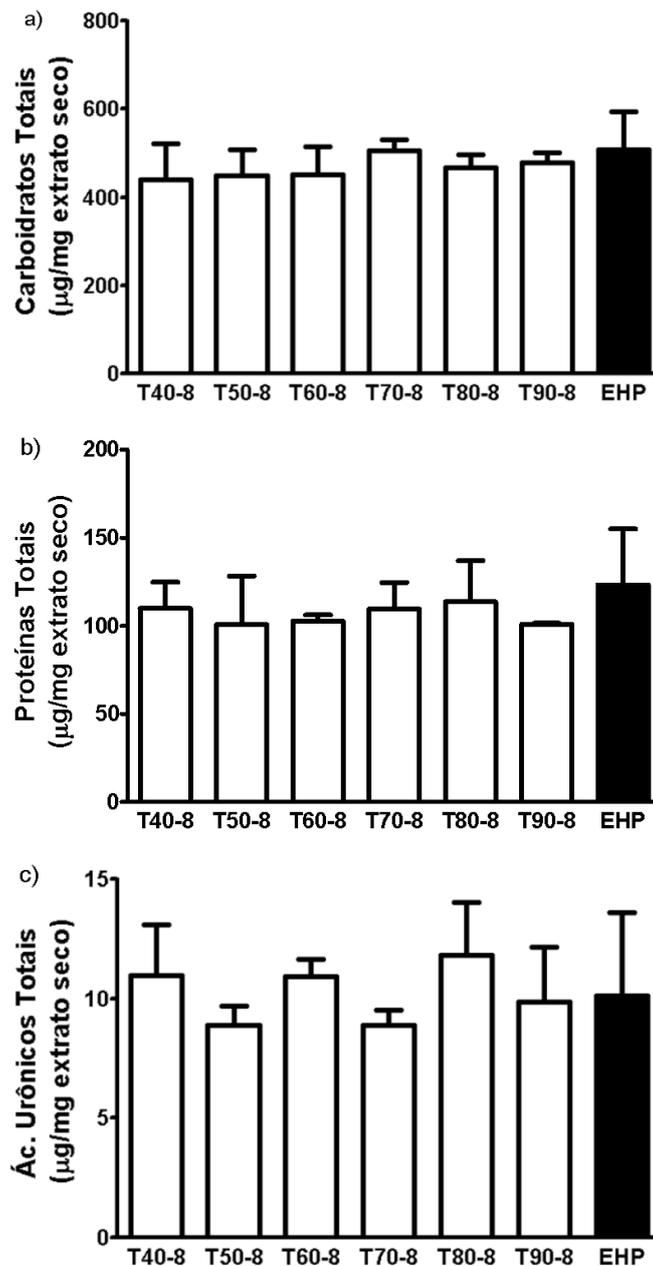


FIGURA 15 – DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DE CARBOIDRATOS TOTAIS (a), PROTEÍNAS TOTAIS (b) E ÁCIDOS URÔNICOS TOTAIS (c) DO EXTRATO EHP SUBMETIDO À DIFERENTES TEMPERATURAS (8 HORAS) EM SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Carbohidratos totais determinados através da dosagem colorimétrica de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956) (SEÇÃO 5.1.3.) com curva padrão de glucose 0,4-40 μg ($y=0,00275x$; $r^2=0,98$); Proteínas totais determinados através da dosagem colorimétrica de proteínas (BRADFORD, 1976) (SEÇÃO 5.1.4.) com curva padrão de ovo-albumina 0,4-40 μg ($y=0,0405x-0,012$; $r^2=0,96$); Ácidos urônicos totais determinados através da dosagem colorimétrica de ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI & CARPITA, 1991) (SEÇÃO 5.1.5.) com curva padrão de ácido glucurônico 1-100 μg ($y=0,0549x$; $r^2=0,99$); Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de cinco dosagens de cada replicata ($n=2$); Não houve diferenças significativas na concentração de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey; T40-8 – temperatura em solução 40 °C por 8 h; T50-8 – temperatura em solução 50 °C por 8 h; T60-8 – temperatura em solução 60 °C por 8 h; T70-8 – temperatura em solução 70 °C por 8 h; T80-8 – temperatura em solução 80 °C por 8 h; T90-8 – temperatura em solução 90 °C por 8 h; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*.

6.1.4.3. Efeito da estocagem sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHP)

Durante ambas as estocagens (refrigerador 4 °C e temperatura ambiente), a concentração de compostos fenólicos do extrato de folhas permaneceu inalterada, com médias variando de 201,6 ± 8,0 a 250,8 ± 6,6 e 225,4 ± 20,4 a 271,5 ± 33,8 µg/mg, respectivamente (*one-way* ANOVA; F=1,427; p=0,2174; gl=11; grupos=12; n=2; n_{EHP}=17, *one-way* ANOVA; F=0,9261; p=0,308; gl=11; grupos=12; n=2; n_{EHP}=17, respectivamente) (FIGURA 17a e FIGURA 18a).

Neste mesmo sentido, a atividade antioxidante também não foi afetada pela estocagem de EHP em solução hidroalcoólica. A atividade de captação do radical DPPH (FIGURA 17b e FIGURA 18b) apresentou valores de EC50% semelhantes à extrato EHP (57,8 ± 5,4 µg/mL), variando de 57,9 ± 14,0 a 91,1 ± 7,1 e 48,5 ± 14,4 a 81,7 ± 3,8 µg/mL, para extratos estocados a 4 e 25 °C, respectivamente (*one-way* ANOVA; F=2,913; p=0,0396; gl=11; grupos=12; n=2, *one-way* ANOVA; F=0,8288; p=0,6111; gl=11; grupos=12; n=2, respectivamente) (TABELA 6). O poder redutor também permaneceu constante frente à estocagem a 4 e 25 °C, com atividades estatisticamente iguais mesmo na maior concentração testada (640 µg/mL) (*one-way* ANOVA; F=0,8522; p=0,6010; gl=11; grupos=12; n=2, *one-way* ANOVA; F=0,2100; p=0,9927; gl=11; grupos=12; n=2, respectivamente) (FIGURA 17c e FIGURA 18c).

A condição de estocagem pode afetar a concentração de compostos fenólicos por modificações químicas, como hidrólises, oxidações e complexações (ZAFRILLA *et al.*, 2003). Comumente, a estocagem de extratos vegetais promove a diminuição de compostos fenólicos, como antocianinas e flavonoides (MONTORO *et al.*, 2006; MARQUEZ, SERRATOSA, & MERIDA, 2014). Entretanto, alguns compostos fenólicos se mostraram estáveis frente à estocagem (VAN DER SLUIS, DEKKER & VAN BOEKEL, 2005) e até um aumento de ácidos fenólicos livres foi reportado (RECAMALES *et al.*, 2006). Neste estudo, foi demonstrado que os compostos fenólicos (e a consequente atividade antioxidante) de extratos hidroalcoólicos das folhas do abacateiro são estáveis à estocagem (4 e 25 °C) por até 10 meses.

As concentrações de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos também não foram alteradas pela estocagem a 4 °C (*one-way* ANOVA; F=3,030; p=0,0346; gl=11; grupos=12; n=2, *one-way* ANOVA; F=1,084; p=0,4435; gl=11; grupos=12; n=2

e *one-way* ANOVA; $F=0,7154$; $p=0,7068$; $gl=11$; grupos=12; $n=2$, respectivamente) e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*one-way* ANOVA; $F=0,2833$; $p=0,9774$; $gl=11$; grupos=12; $n=2$, *one-way* ANOVA; $F=1,033$; $p=0,4754$; $gl=11$; grupos=12; $n=2$ e *one-way* ANOVA; $F=0,5393$; $p=0,8420$; $gl=11$; grupos=12; $n=2$, respectivamente) (FIGURA 16). Desta forma, é possível inferir que estes compostos são também estáveis frente à estocagem, nas condições analisadas.

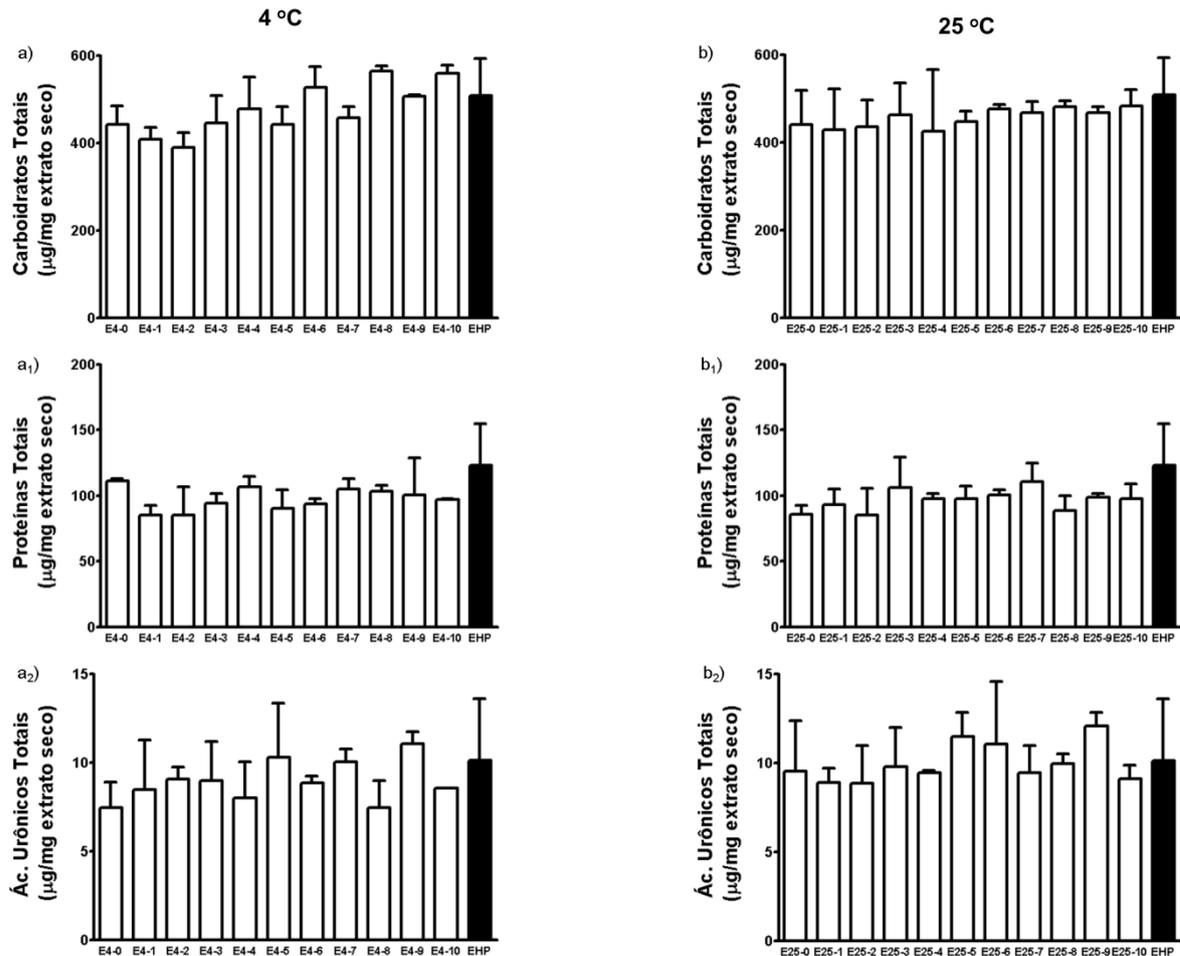


FIGURA 16 – DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DE CARBOIDRATOS TOTAIS, PROTEÍNAS TOTAIS E ÁCIDOS URÔNICOS TOTAIS DO EXTRATO EHP SUBMETIDO À ESTOCAGEM $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (REFRIGERADOR) (a) E $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TEMPERATURA AMBIENTE) (b) EM SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA POR 10 MESES.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Carbohidratos totais determinados através da dosagem colorimétrica de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956) (SEÇÃO 5.1.3.) com curva padrão de glicose $0,4-40\text{ }\mu\text{g}$ ($y=0,00275x$; $r^2=0,98$); Proteínas totais determinados através da dosagem colorimétrica de proteínas (BRADFORD, 1976) (SEÇÃO 5.1.4.) com curva padrão de ovo-albumina $0,4-40\text{ }\mu\text{g}$ ($y=0,0405x-0,012$; $r^2=0,96$); Ácidos urônicos totais determinados através da dosagem colorimétrica de ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI & CARPITA, 1991) (SEÇÃO 5.1.5.) com curva padrão de ácido glucurônico $1-100\text{ }\mu\text{g}$ ($y=0,0549x$; $r^2=0,99$); Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de cinco dosagens de cada replicata ($n=2$); Não houve diferenças significativas na concentração de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey; T40-8 – temperatura em solução $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 h; T50-8 – temperatura em solução $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 h; T60-8 – temperatura em solução $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 h; T70-8 – temperatura em solução $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 h; T80-8 – temperatura em solução $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 h; T90-8 – temperatura em solução $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 h; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*.

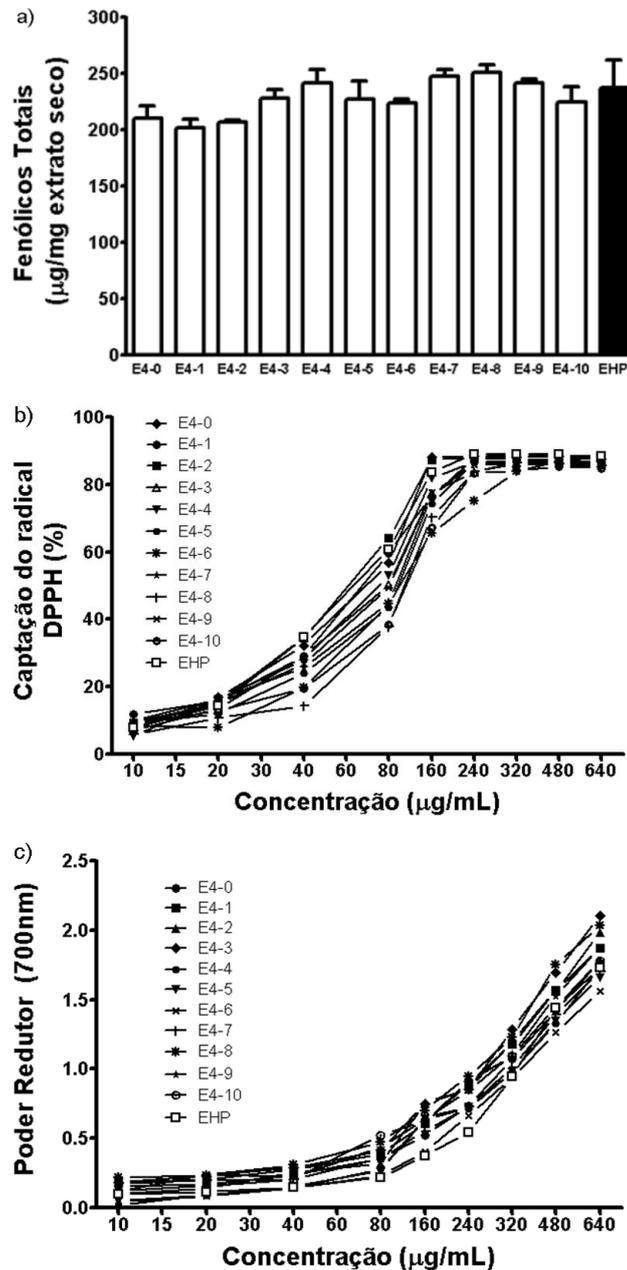


FIGURA 17 – ESTABILIDADE FRENTE À ESTOCAGEM 4 °C (REFRIGERADOR) DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO EHP DAS FOLHAS DE *P. americana*.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: a) Conteúdo de compostos fenólicos totais; b) Captação do radical DPPH; c) Poder redutor; Fenólicos totais determinados através da dosagem colorimétrica de compostos fenólicos (SINGLETON & ROSSI JR., 1965) (SEÇÃO 5.1.2.) com curva padrão de ácido gálico 1-50 µg ($y=0,0239x$; $r^2=0,95$); Os resultados de fenólicos totais estão expressos em média \pm desvio padrão de cinco dosagens de cada replicata (EHP – 17 dosagens); Não houve diferenças significativas na concentração de compostos fenólicos (gráfico “a”) por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey; Captação do radical DPPH determinado através da dosagem colorimétrica de captação do radical DPPH (BLOIS, 1958) (SEÇÃO 5.2.2.1.); Poder redutor determinado através da dosagem colorimétrica de poder redutor OYAIZU (1986) (SEÇÃO 5.2.2.2.); Os resultados de captação de DPPH e poder redutor estão expressos em média de duas dosagens de cada replicata; E4-0 – estocagem 4 °C por 0 meses; E4-1 – estocagem 4 °C por 1 mês; E4-2 – estocagem 4 °C por 2 meses; E4-3 – estocagem 4 °C por 3 meses; E4-4 – estocagem 4 °C por 4 meses; E4-5 – estocagem 4 °C por 5 meses; E4-6 – estocagem 4 °C por 6 meses; E4-7 – estocagem 4 °C por 7 meses; E4-8 – estocagem 4 °C por 8 meses; E4-9 – estocagem 4 °C por 9 meses; E4-10 – estocagem 4 °C por 10 meses; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*.

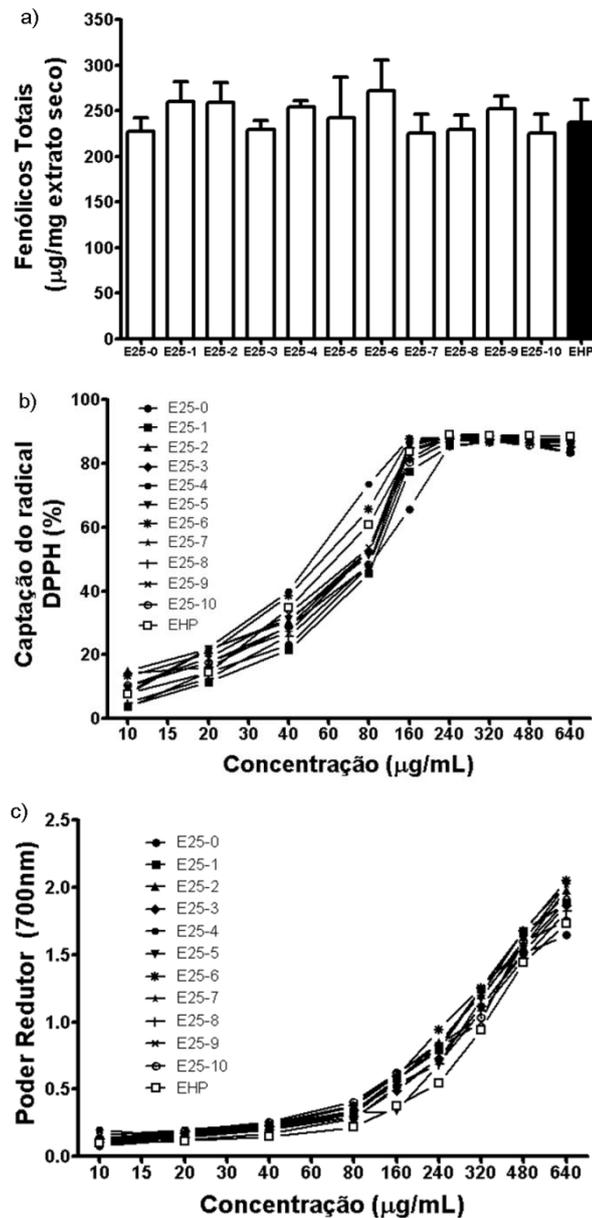


FIGURA 18 – ESTABILIDADE FRENTE À ESTOCAGEM 25 °C (TEMPERATURA AMBIENTE) DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO EHP DAS FOLHAS DE *P. americana*.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: a) Conteúdo de compostos fenólicos totais; b) Captação do radical DPPH; c) Poder redutor; Fenólicos totais determinados através da dosagem colorimétrica de compostos fenólicos (SINGLETON & ROSSI JR., 1965) (SEÇÃO 5.1.2.) com curva padrão de ácido gálico 1-50 µg ($y=0,0239x$; $r^2=0,95$); Os resultados de fenólicos totais estão expressos em média \pm desvio padrão de cinco dosagens de cada replicata (EHP – 17 dosagens); Não houve diferenças significativas na concentração de compostos fenólicos (gráfico “a”) por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey; Captação do radical DPPH determinado através da dosagem colorimétrica de captação do radical DPPH (BLOIS, 1958) (SEÇÃO 5.2.2.1.); Poder redutor determinado através da dosagem colorimétrica de poder redutor OYAIZU (1986) (SEÇÃO 5.2.2.2.); Os resultados de captação de DPPH e poder redutor estão expressos em média de duas dosagens de cada replicata; E25-0 – estocagem 4 °C por 0 meses; E25-1 – estocagem 4 °C por 1 mês; E25-2 – estocagem 4 °C por 2 meses; E25-3 – estocagem 4 °C por 3 meses; E25-4 – estocagem 4 °C por 4 meses; E25-5 – estocagem 4 °C por 5 meses; E25-6 – estocagem 4 °C por 6 meses; E25-7 – estocagem 4 °C por 7 meses; E25-8 – estocagem 4 °C por 8 meses; E25-9 – estocagem 25 °C por 9 meses; E25-10 – estocagem 4 °C por 10 meses; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*.

TABELA 6 – ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS DPPH (EC50%) DO EXTRATO EHP SUBMETIDO À ESTOCAGEM A 4 °C (REFRIGERADOR) ou 25 °C (TEMPERATURA AMBIENTE) POR ATÉ 10 MESES.

Extrato	DPPH EC50% (µg/mL)	Extrato	DPPH EC50% (µg/mL)
E4-0	58,4 ± 9,9	E25-0	81,7 ± 3,8
E4-1	66,9 ± 16,1	E25-1	79,6 ± 4,8
E4-2	57,9 ± 14,0	E25-2	63,0 ± 16,3
E4-3	70,5 ± 7,5	E25-3	68,2 ± 17,9
E4-4	65,3 ± 7,5	E25-4	48,5 ± 14,4
E4-5	75,1 ± 11,0	E25-5	61,0 ± 6,4
E4-6	86,4 ± 1,3	E25-6	50,8 ± 10,3
E4-7	75,2 ± 2,1	E25-7	61,3 ± 16,6
E4-8	91,1 ± 7,1	E25-8	71,7 ± 12,6
E4-9	66,0 ± 14,9	E25-9	62,3 ± 35,9
E4-10	85,7 ± 1,4	E25-10	69,9 ± 14,6
EHP	57,8 ± 5,4		

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Determinado através da dosagem colorimétrica de captação do radical DPPH (BLOIS, 1958) (SEÇÃO 5.2.2.1.); EC50% calculado a partir da equação das curvas de captação de radicais DPPH linearizada (FIGURA 15b e 16b); Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão do EC50% de cada replicata; Não houve diferenças significativas nos ECs50% por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey; E4-0 – estocagem 4 °C por 0 meses; E4-1 – estocagem 4 °C por 1 mês; E4-2 – estocagem 4 °C por 2 meses; E4-3 – estocagem 4 °C por 3 meses; E4-4 – estocagem 4 °C por 4 meses; E4-5 – estocagem 4 °C por 5 meses; E4-6 – estocagem 4 °C por 6 meses; E4-7 – estocagem 4 °C por 7 meses; E4-8 – estocagem 4 °C por 8 meses; E4-9 – estocagem 4 °C por 9 meses; E4-10 – estocagem 4 °C por 10 meses; E25-0 – estocagem 4 °C por 0 meses; E25-1 – estocagem 4 °C por 1 mês; E25-2 – estocagem 4 °C por 2 meses; E25-3 – estocagem 4 °C por 3 meses; E25-4 – estocagem 4 °C por 4 meses; E25-5 – estocagem 4 °C por 5 meses; E25-6 – estocagem 4 °C por 6 meses; E25-7 – estocagem 4 °C por 7 meses; E25-8 – estocagem 4 °C por 8 meses; E25-9 – estocagem 4 °C por 9 meses; E25-10 – estocagem 4 °C por 10 meses; EHP – extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*.

6.2. Extrato aquoso das folhas de *P. americana* Mill.

6.2.1. Extração aquosa e purificação de AGP a partir das folhas de *P. americana* Mill.

As AGPs são macromoléculas solúveis em água, portanto as etapas de purificação foram organizadas de forma a purificar a fração de maior massa molecular e solubilidade em H₂O. As etapas de purificação da AGP a partir do extrato aquoso das folhas de *P. americana* foram monitoradas com relação à concentração de carboidratos, proteínas, ácidos urônicos e AGPs (TABELA 7), composição dos monossacarídeos neutros (TABELA 8) e homogeneidade (FIGURA 18).

O extrato aquoso (EA), após precipitação em etanol 70 %, deu origem à fração EAP com 0,98 % m/m de rendimento em relação às folhas secas. Esta fração apresentou perfil heterogêneo em cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), com pelo menos quatro grupos de compostos com volumes hidrodinâmicos diferentes (eluição entre 55 – 70 min) (FIGURA 19a). As concentrações de fenólicos, proteínas, carboidratos e ácidos urônicos foram de 12,1 ± 4,1; 64,2 ± 7,4; 506,7 ± 30,3 e 12,3 ± 3,5 µg/mg, respectivamente. O teor de AGP foi de 6,3 % (m/m), em relação à concentração de carboidratos (TABELA 7).

Em seguida, EAP foi submetida ao processo de gelo-degelo, dando origem à fração EAPS (rendimento 0,56 % m/m em relação às folhas secas). A fração EAPS também apresentou perfil heterogêneo por HPSEC, com pelo menos sete grupos de compostos com volumes hidrodinâmicos diferentes (eluição entre 35 – min) (FIGURA 19b). Esta etapa foi importante para a retirada parcial dos compostos de menores volumes hidrodinâmicos (eluição após 60 min), permitindo a observação dos compostos eluídos antes de 60 min via detector de índice de refração. É importante ressaltar que a concentração de carboidratos foi aumentada (506,7 ± 30,3 para 554,6 ± 23,6 µg/mg) e de AGP permaneceu semelhante (6,2 para 6,7 % m/m), indicando que não houve perda de AGP durante o processo de gelo-degelo.

TABELA 7 – RENDIMENTOS E CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, ÁCIDOS URÔNICOS E FENÓLICOS DAS FRAÇÕES DE CADA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DA AGP A PARTIR DAS FOLHAS DE *Persea americana*.

Análise	Fração		
	EAP	EAPS	FRAGP
Rendimento (%)^a	0,98	0,56	0,26
Fenólicos totais (µg/mg)^b	12,1±4,1	20,5±5,2	8,7±2,2
Proteínas totais (µg/mg)^c	64,2±7,4	54,3±8,0	46,3±3,4
Carboidratos totais (µg/mg)^d	506,7±30,3	554,6±23,6	767,7±28,9
Ácidos Urônicos totais (µg/mg)^e	12,3±3,5	16,1±8,9	11,2±6,7
AGP (%)^f	6,2	6,7	22,5

FONTE: O autor (2017).

NOTA: ^a Determinado a partir da massa do extrato liofilizado em relação à massa inicial das folhas secas; ^b Determinado através da dosagem colorimétrica de compostos fenólicos (SINGLETON & ROSSI JR., 1965) (SEÇÃO 5.1.2.) com curva padrão de ácido gálico 1-50 µg ($y=0,0239x$; $r^2=0,95$) e representado na forma de µg equivalentes por mg do extrato seco; ^c Determinado através da dosagem colorimétrica de proteínas (BRADFORD, 1976) (SEÇÃO 5.1.4.) com curva padrão de ovoalbumina 0,4-40 µg ($y=0,0405x-0,012$; $r^2=0,96$) e representado na forma de µg equivalentes por mg do extrato seco; ^d Determinado através da dosagem colorimétrica de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956) (SEÇÃO 5.1.3.) com curva padrão de glucose 0,4-40 µg ($y=0,00275x$; $r^2=0,98$) e representado na forma de µg equivalentes por mg do extrato seco; ^e Determinado através da dosagem colorimétrica de ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI & CARPITA, 1991) (SEÇÃO 5.1.5.) com curva padrão de ácido glucurônico 1-100 µg ($y=0,0549x$; $r^2=0,99$) e representado na forma de µg equivalentes por mg do extrato seco; ^f Determinado através da dosagem por difusão em gel de agarose (VAN HOLST & CLARKE, 1985) (SEÇÃO 5.3.2.5.) com curva padrão de goma arábica 0,25-3µg ($y=5,7433x-1,983$) e representado na forma de percentagem equivalentes em relação a percentagem de carboidratos; Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão de duas dosagens de cada fração; EAP – extrato aquoso precipitado; EAPS – extrato aquoso precipitado solúvel; FRAGP – fração AGP.

Por fim, a fração EAPS foi submetida à retirada de compostos conjugados segundo MONOBE *et al.*, 2008 com adaptações, dando origem à fração FRAGP (rendimento 0,07 % m/m em relação às folhas secas). Esta fração ainda apresentou perfil de eluição heterogêneo por HPSEC, com pelo menos três grupos de compostos de volumes hidrodinâmicos diferentes (FIGURA 19c). Entretanto, a purificação da AGP foi parcialmente eficaz, visto que houve purificação do composto com alta absorção em 280 nm (FIGURA 18c) e aumento nas concentrações de carboidratos ($554,6 \pm 23,6$ para $767,7 \pm 28,9$ µg/mg) e AGPs (6,7 para 22,5 % m/m) (TABELA 7). Desta forma, a fração FRAGP foi utilizada para os demais ensaios de caracterização química e atividade sobre o sistema complemento. Os rendimentos sugerem que 100 g de folhas secas de *P. americana* submetidas à extração aquosa

quente (500 mL por 30 min) dão origem a um extrato com aproximadamente 520 µg/mL de FRAGP.

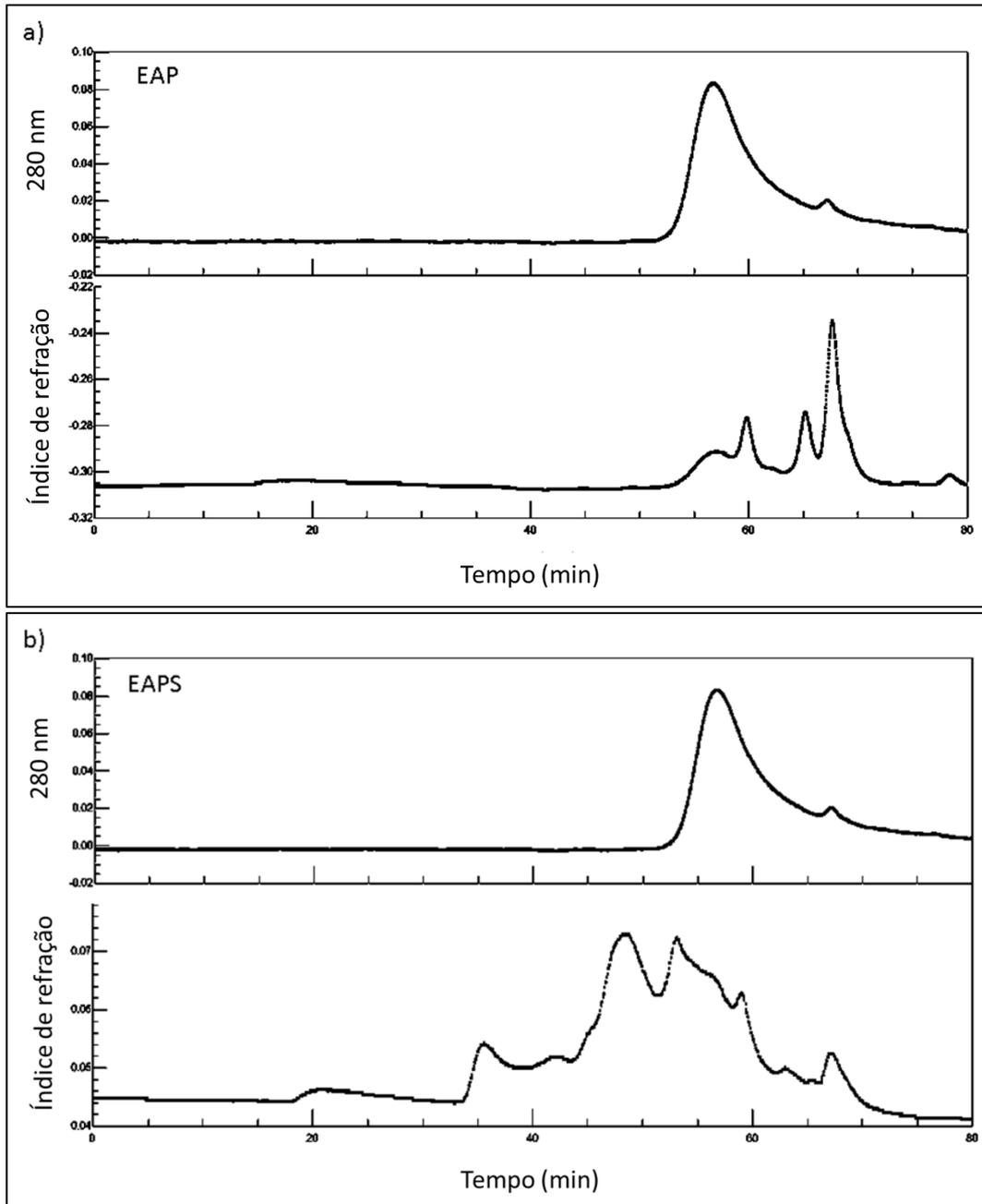
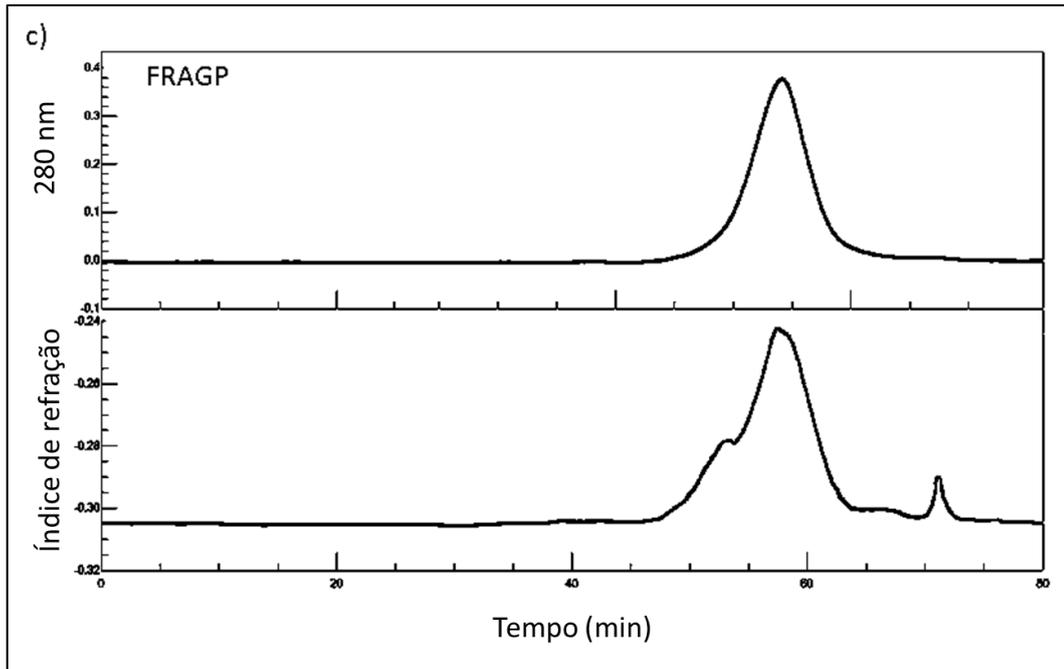


FIGURA 19 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES APÓS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA AGP.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: a) Precipitação, b) Gelo-degelo, c) Remoção de conjugados; Cromatogramas obtidos em equipamento WATERS (Milford, MA, EUA) acoplado a detectores de índice de refração e UV (280 nm); Frações solubilizadas em nitrito de sódio 0,1 M contendo azida sódica 200 ppm e previamente filtradas em membranas de celulose 0,22 µm; Cromatogramas analisados no *software* ASTRA (WYATT TECHNOLOGY, Goleta, CA, EUA) (SEÇÃO 5.3.2.4.); EAP – extrato aquoso precipitado; EAPS – extrato aquoso precipitado solúvel; FRAGP – fração AGP.



CONTINUAÇÃO.

6.2.2. Caracterização química da fração AGP (FRAGP)

A fração FRAGP apresentou altos teores de carboidratos ($767,7 \pm 28,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) e baixos teores de proteínas ($46,3 \pm 3,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$), ácidos urônicos ($11,2 \pm 6,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) e compostos fenólicos ($8,7 \pm 2,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$). A concentração de AGP foi de 22,5 % m/m em relação à concentração de carboidratos (TABELA 7). É importante ressaltar que a interação do reagente β -GlcY depende da estrutura das AGPs testadas, sendo já descritos AGPs sem a capacidade de ligação ao reagente (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2007). Neste sentido, é possível que a interação da AGP/ β -GlcY de FRAGP seja diferente que a AGP/ β -GlcY da goma arábica, resultando numa concentração subestimada (PAULSEN, *et al.*, 2014). Além da estrutura diferenciada, esta menor interação pode ser explicada pelo tipo de extração (aquosa quente), sendo já descrito que algumas AGPs perdem a afinidade com o reagente de Yariv quando submetida a altas temperaturas (BEKEDAM *et al.*, 2008). Outra possibilidade seria a presença de uma AGII com estrutura similar e co-eluição em HPSEC com a AGP.

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS NEUTROS DE FRAGP E ETAPAS DE PURIFICAÇÃO.

Monossacarídeos Neutros	EAP	EAPS	FRAGP
Ramnose	5	4	8
Fucose	1	tr	tr
Arabinose	25	35	45
Xilose	3	4	2
Manose	tr	12	tr
Galactose	24	30	36
Glucose	42	15	9

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Determinado por derivatização a acetato de alditóis ALBERSHEIM (1967) seguido de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (SEÇÃO 5.3.2.1.). Os tempos de retenções e padrão de fragmentação foram comparados com um *mix* padrão acetatos de alditóis de cada monossacarídeo; Injeção 50 °C com aumento de 40 °C.min⁻¹ (até 220 °C), coluna DB-225 (30m x 0,25 mm) e gás de arraste hélio; EAP – extrato aquoso precipitado; EAPS – extrato aquoso precipitado solúvel; FRAGP – fração AGP; tr – traço (<1 %)

TABELA 9 – ANÁLISE DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS DE FRAGP.

Monossacarídeo	Ligação Glicosídica	%
Araf	terminal	20
	3-	8
	5-	15
Galp	terminal	3
	3-	10
	6-	4
	3,6-	18
GlcP	3,6-	12
Rhap	terminal	10
Xylp	terminal	tr

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Determinado por metilação (CIUCANU & KEREK, 1984) e derivatização ALBERSHEIM (1967) seguido de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (SEÇÃO 5.3.2.2.). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram identificados de acordo com os tempos de retenções e padrão de fragmentação (SASSAKI *et al.*, 2005); Injeção 50 °C com aumento de 40 °C.min⁻¹ (até 220 °C), coluna DB-225 (30m x 0,25 mm) e gás de arraste hélio; *Araf* – Arabinofuranose; *Galp* – Galactopirranose; *GlcP* – Glucopirranose; *Rhap* – Ramnopirranose; *Xylp* – Xilopirranose; tr – traço (<1 %).

A porção glicídica da fração FRAGP contém quantidades majoritárias de *Araf* (45 %) e *Galp* (36 %), sendo também encontradas unidades de *Glcp* (9 %), *Rhap* (8 %) e *Xylp* (2 %) e traços de *Fucp* e *Manp* (TABELA 8). De acordo com o ensaio de metilação (TABELA 9), as *Araf* são os principais constituintes da cadeia lateral glicídica (43 %), sendo distribuídas principalmente em unidades terminais não redutores (20 %), mas também 3-*O*-substituídas (8 %) e 5-*O*-substituídas (15 %). As unidades de galactose piranosídica representaram cerca de 35 % da fração glicídica de FRAGP, sendo na forma de terminais não redutores (3 %), 3-*O*-substituídas (10 %), 6-*O*-substituídas (4 %) e 3,6-di-*O*-substituídas (18 %). As unidades de *Glcp* (12 %) estão localizadas em pontos de ramificações de FRAP, com 12% de 3,6-di-*O*-substituídas. Por fim, a presença das unidades 2,3,4-*Me*₃-*Rha* e 2,3,4-*Me*₃-*Xyl* sugerem que os monossacarídeos *Rhap* e *Xylp* estão na forma de terminais não redutores.

O espectro de ressonância magnética nuclear monodimensional ¹H da fração FRAGP está mostrado na FIGURA 20. Foi observado um espectro característico de uma arabinogalactana, com picos na região entre 4,9 e 6,0 ppm (5,882, 5,808, 5,718, 5,543, 5,289, 5,215, 5,173 e 4,957 ppm) referentes às regiões anoméricas (H1) e assinalamentos entre 3,8 e 4,7 ppm (4,683, 4,563, 4,524, 4,407, 4,353, 4,278, 4,189, 4,161, 4,108, 4,042, 3,919 e 3,871 ppm) referentes aos sinais de ¹H do anel glicosídico (H2 – H5/H6).

Os picos em campo mais baixo do espectro 5,882, 5,808, 5,718 e 5,543 ppm foram assinalados para o H1 de *Araf*, indicando que este monossacarídeo se encontra em diversos ambientes químicos, corroborando o ensaio de metilação. Ainda na região anomérica do espectro, foram observados sinais em 5,289, 5,215, 5,173 e 4,957 ppm provavelmente referente aos ¹H dos monossacarídeos *Galp*, *Glcp* e *Rhap*. Na região dos sinais referente à ¹H do anel glicosídico, foi observado os sinais em 4,683 ppm referentes aos H4 de *Araf* e 4,524/4,407 ppm de *Galp*. Foi também encontrado sinais em 3,919 e 3,381 ppm referente ao H4 de *Rhap* (SAMUELSEN *et al.*, 1998; GANE *et al.*, 1995; SUÁREZ *et al.*, 2005; SIMS & FURNEAUX, 2003).

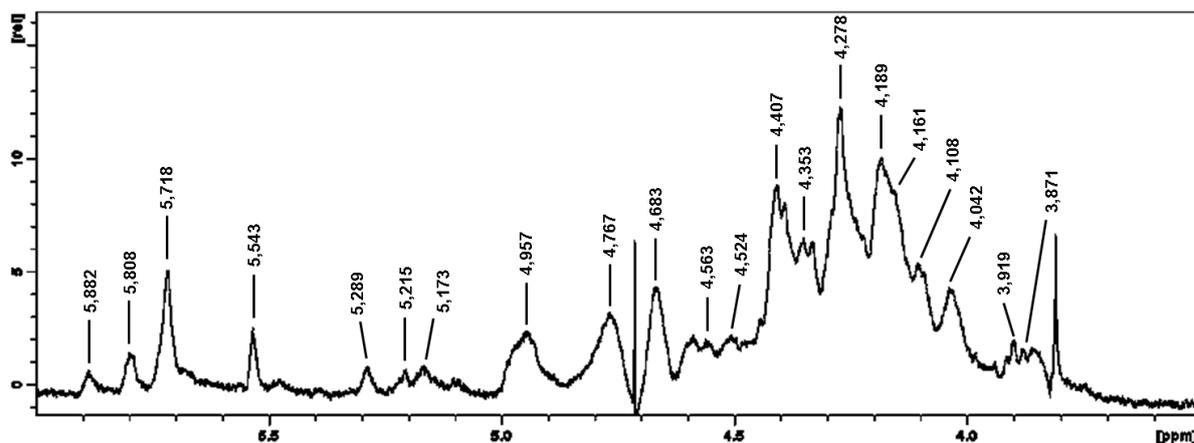


FIGURA 20 – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNETICA NUCLEAR ^1H DA FRAÇÃO FRAGP.
 FONTE: O autor (2017).

NOTA: Espectro obtido a por espectroscopia de ressonância magnética nuclear monodimensional ^1H em equipamento BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance (Karlsruhe, Alemanha) (SEÇÃO 5.3.2.3).; FRAGP solubilizada em água deuterada (D_2O); Deslocamentos químicos calibrados utilizando acetona como padrão interno (δ 30,2 e δ 2,22 no ^{13}C e ^1H , respectivamente) e expressos em ppm (δ); Espectros analisados no programa TOPSPIN (Karlsruhe, Alemanha).

Para uma melhor elucidação da estrutura desta AGP, foi realizado o ensaio de ressonância magnética nuclear bidimensional $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) (FIGURA 21). Com este ensaio, foi possível confirmar a presença de *Araf* em pelo menos dois ambientes químicos diferentes com correlações em 5,72/109,5 e 5,54/108,0 ppm de H1/C1. Os sinais em 5,17 e 4,96 ppm em ^1H foram confirmados como referentes ao H1 de *Galp* apresentando correlações (H1/C1) com 104,1 e 103,5 ppm, respectivamente. O pico em 5,29 ppm foi confirmado para o monossacarídeo *Rhap* com correlação H1/C1 em 5,29/101,1 ppm. Na região do anel glicosídico, foram observadas correlações para *Araf* em 4,68/81,9 ppm referente ao H2/C2; em 4,62/84,3 e 4,56/84,3 ppm para H4/C4; e em 4,20/61,8 e 4,28/61,8 ppm para H5/C5. Em relação ao monossacarídeo *Galp*, foi observada correlações em 4,52/69,6 e 4,41/69,2 ppm para H4/C4; em 4,43/77,2 ppm para H5/C5; e 4,19/80,5 ppm para H3/C3, confirmando a grande concentração de *Galp* 3-O-substituídas. A *Rhap* foi confirmada com correlações em 4,16/70,2 ppm para H3/C3; em 3,92/72,4 e 3,87/73,6 ppm para H4/C4; além da correlação referente a H6/C6 em 1,72/17,1 ppm (FIGURA 20). A TABELA 10 apresenta o resumo dos assinalamentos de FRAGP obtidos através da ressonância magnética mono (^1H) e bidimensional ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$)

Os resultados de caracterização química de FRAGP sugerem a presença de uma AGP com estrutura complexa. Trata-se de um polissacarídeo altamente ramificado com pelo menos cinco monossacarídeos distribuídos em ligações

glicosídicas diversas. A porção glicídica da AGP é formada por uma cadeia principal de Galp (1→3) altamente ramificada em O6. A cadeia lateral é formada por principalmente Araf em diversas ligações diferentes, Galp (1→6) e terminais, pontos de ramificações em Glcp, e em menor quantidade, unidades de Rhap e Xylp em terminais não redutores.

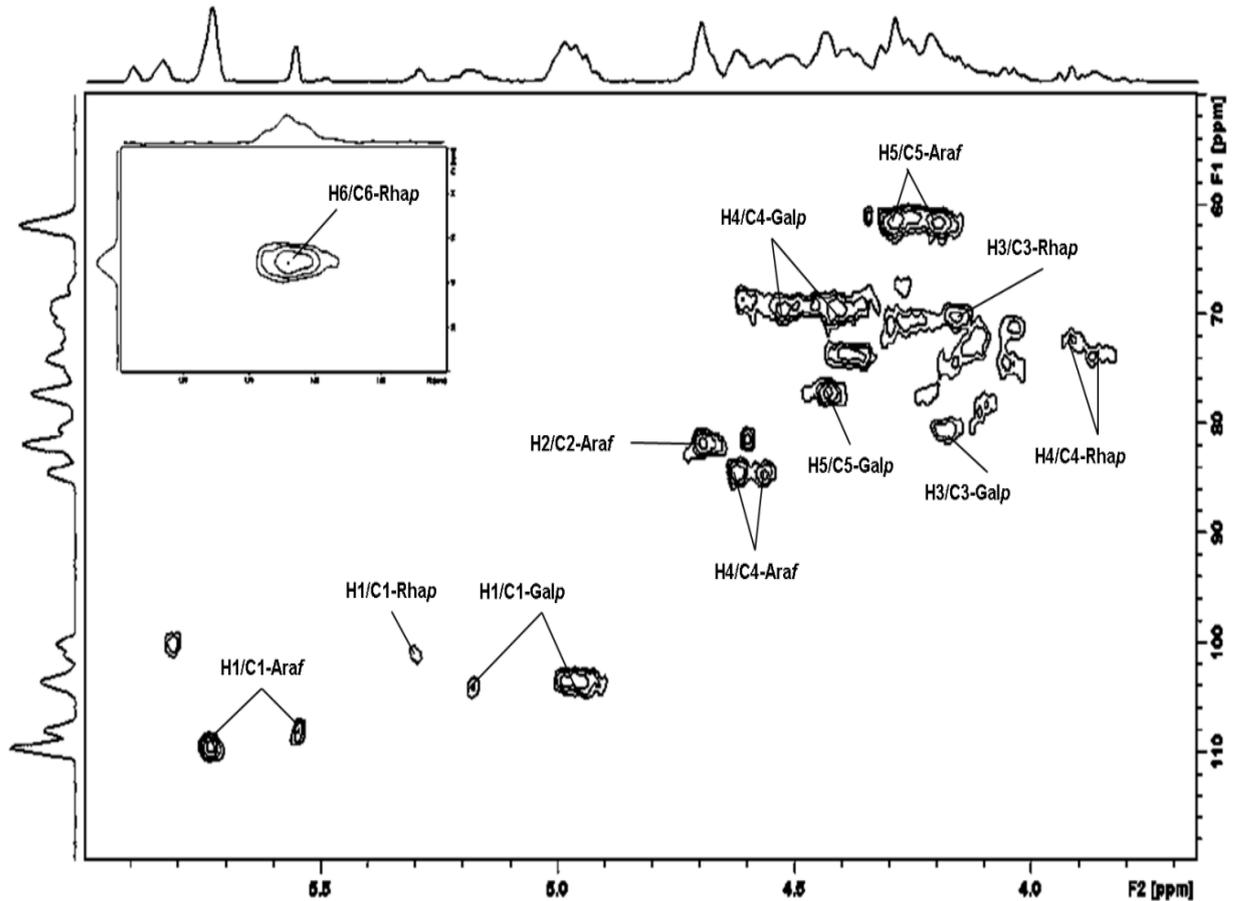


FIGURA 21 – ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR BIDIMENSIONAL $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) DA FRAÇÃO FRAGP.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Detalhe para a região de H6/C6 da ramnopirranose. Espectro obtido por espectroscopia de ressonância magnética nuclear bidimensional $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ em equipamento BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance (Karlsruhe, Alemanha) (SEÇÃO 5.3.2.3.); FRAGP solubilizada em água deuterada (D_2O); Deslocamentos químicos calibrados utilizando acetona como padrão interno (δ 30,2 e δ 2,22 no ^{13}C e ^1H , respectivamente) e expressos em ppm (δ); Espectros analisados no programa TOPSPIN (Karlsruhe, Alemanha); Araf – arabinofuranose; Galp – galactofuranose; Glcp – glucopirranose; nd – não detectado.

TABELA 10 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO FRAGP.

	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
Araf	5,72/109,5 5,54/108,0	4,68/81,9	nd	4,62/84,3 4,56/84,3	4,20/61,8 4,28/61,8	nd
Galp	5,17/104,1 4,96/103,5	nd	4,19/80,5	4,52/69,6 4,41/69,2	4,43/77,2	nd
Rhap	5,29/101,1	nd	4,16/70,2	3,92/72,4 3,87/73,6	nd	1,72/17,1

FONTE: O autor (2017),

NOTA: Assinalamentos obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear monodimensional ^1H e bidimensional $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) em equipamento BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance (Karlsruhe, Alemanha) (SEÇÃO 5.3.2.3.); FRAGP solubilizada em água deuterada (D_2O); Deslocamentos químicos calibrados utilizando acetona como padrão interno (δ 30,2 e δ 2,22 no ^{13}C e ^1H , respectivamente) e expressos em ppm (δ); Espectros analisados no programa TOPSPIN (Karlsruhe, Alemanha). *Araf* – arabinofuranose; *Galp* – galactofuranose; *Glc p* – glucopirranose; nd – não detectado.

6.2.3. Atividade de fixação do sistema complemento via clássica por FRAGP

A atividade sobre o sistema complemento foi realizada via ensaio hemolítico de fixação do complemento (YAMADA *et al.*, 1985). Este ensaio quando realizado de maneira convencional (sem pré-incubação) pode ter dois diferentes mecanismos que induz a inibição aparente da hemólise: 1 – o composto pode inibir a ativação do sistema complemento causada pelos eritrócitos sensibilizados, como é observado para a heparina (EDENS, LINHARDT & WEILER, 1993); e 2 – o composto pode induzir a ativação do sistema complemento, mas devido à pequena meia vida dos fatores ativados do complemento, após 30 min de incubação, menos complemento está disponível para serem ativados pelos eritrócitos sensibilizados. Desta forma, foram realizados ensaios sem incubação prévia (ALBAN *et al.*, 2002) afim de diferenciar frações inibidoras das ativadoras do sistema complemento.

O efeito de FRAGP sobre a ativação do sistema complemento via clássica foi examinado em soro humano 1:72 (diluição capaz de lisar 50% dos eritrócitos), com heparina e *zymosan* como padrões de inibição e ativação, respectivamente.

Para o ensaio com pré incubação, a fração FRAGP foi capaz de reduzir a hemólise induzida pelo complemento de modo dose-dependente, sugerindo que FRAGP atua sobre o sistema complemento (FIGURA 22a). A concentração capaz de inibir 50 % da hemólise induzida pelo complemento (IC50%) foi de 2,97, 2,92 e 650,39 µg/mL, para FRAGP, heparina e *zymosan*, respectivamente. Para o ensaio sem pré-incubação, os IC50% foi de 17,48 e 8,98 µg/mL, para FRAGP e heparina, respectivamente e para o *zymosan*, o IC50% não foi calculado devido à baixa inibição da hemólise em todas as concentrações testadas (FIGURA 22b).

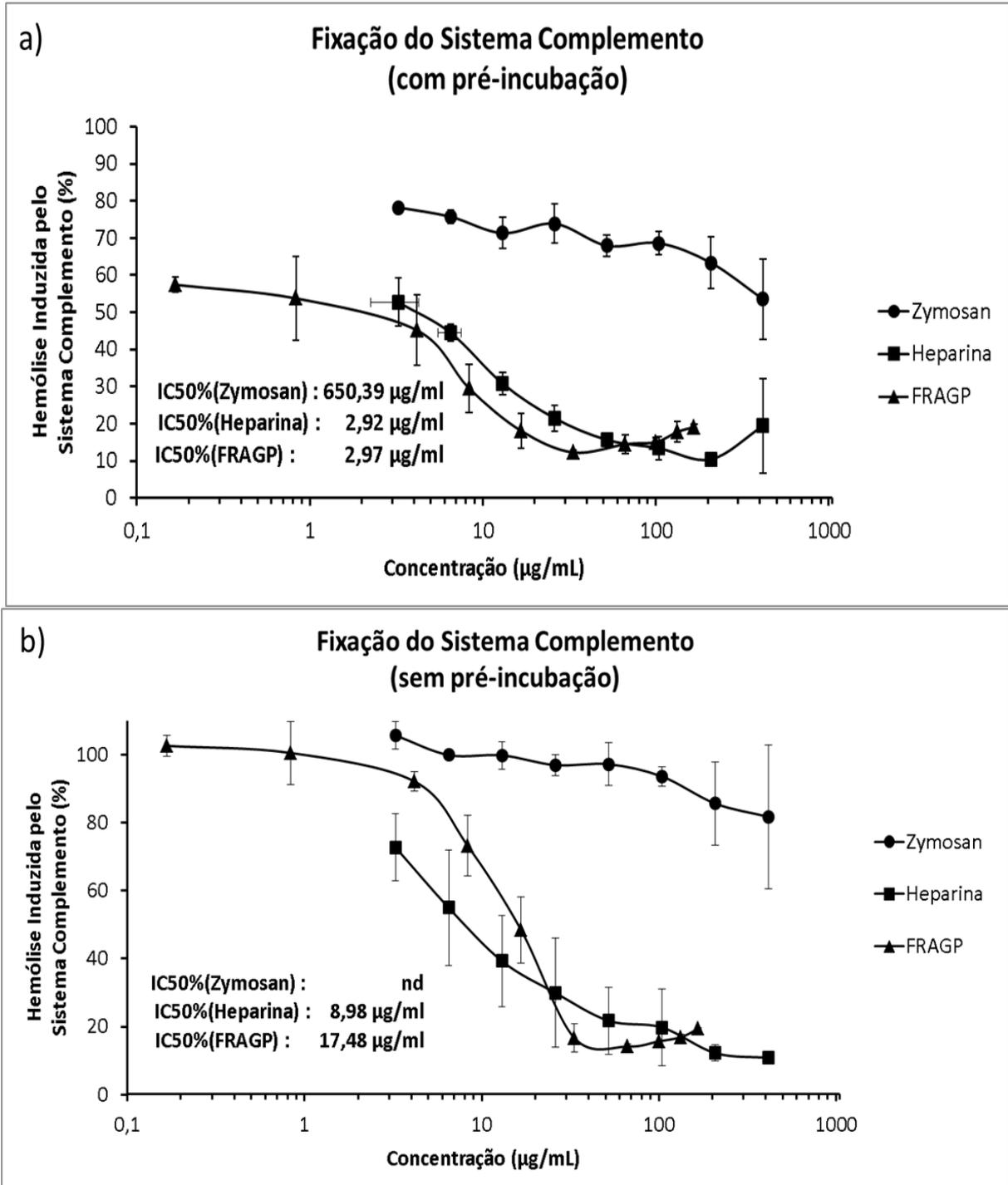


FIGURA 22 – EFEITO DOSE-DEPENDENTE DE FRAGP, ZYMOZAN E HEPARINA SOBRE A HEMÓLISE INDUZIDA PELO COMPLEMENTO VIA CLÁSSICA.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Experimentos com (a) ou sem (b) pré-incubação de FRAGP com a fonte de complemento (soro humano); Determinado via teste de fixação do sistema complemento (YAMADA *et al.*, 1985) (SEÇÃO 5.3.3.); IC50% calculado a partir da equação das curvas de hemólise induzida pelo complemento linearizada; Valores de IC50% correspondente à concentração final capaz de reduzir 50% da atividade hemolítica do soro; Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de experimentos isolados (n=3); Ensaio realizado com os seguintes controles: 1 – 100% de hemólise: incubando os eritrócitos com água; 2 – 100% de hemólise causada pelo complemento: incubando os eritrócitos, soro e tampão HEPES; 3 – 0% de hemólise causada pelo complemento: incubando os eritrócitos, tampão HEPES e soro inativado; FRAGP – fração AGP; nd – não determinado.

Em ensaios com pré-incubação, compostos inibidores (como a heparina) inibem a ativação do sistema complemento, diminuindo a hemólise induzida pelo complemento resultante. Já os ativadores (como o *zymosan*) promovem o consumo dos componentes do sistema complemento (na pré-incubação), de modo a também diminuir a hemólise induzida pelo complemento. Por outro lado, em ensaios sem pré-incubação, a ativação do sistema complemento induz a hemólise e diminui drasticamente a inibição da hemólise induzida pelo complemento (IC50%), já que os componentes do complemento não têm tempo para se auto consumir. Por fim, a inibição causa a diminuição da hemólise induzida pelo complemento de modo semelhante ao ensaio com pré-incubação, uma vez que a inibição pouco depende do tempo de incubação. Neste sentido, a fração FRAGP se mostrou capaz de modular o sistema complemento humano de modo semelhante ao da heparina, ou seja, inibindo a ativação do sistema complemento causado por eritrócitos sensibilizados.

Alguns polissacarídeos isolados têm sido testados e mostraram ter atividade de modulação do sistema complemento, sendo em sua grande maioria ativadores (*zymosan*, polissacarídeos pécticos, heteroglicanas ácidas ramificadas e AGPs) (YAMADA, 1994; MICHAELSEN, *et al.*, 2000), mas em alguns casos, inibidores do sistema complemento (SHIN, KWON & YANG, 1992; SAMUELSEN, *et al.*, 1999; ZHU, *et al.*, 2009).

A inibição do sistema complemento pode se dar por diferentes vias. Já foi demonstrado, por exemplo, que a inibição causada pela heparina ocorre devido a sua capacidade de se ligar em pelo menos 13 proteínas que compõem o sistema complemento, incluindo C1q, C2, C4, C4bp, C6, C8 e C9 (SAHU & PANOBURN, 1993; YU, *et al.*, 2005). Outros polissacarídeos inibidores atuam de modo mais seletivo, se ligando a componentes específicos do sistema complemento, como o polissacarídeo isolado da espécie *Bupleurum medicinal*, que apresentou ligação com C1s, C3 e C4, mas não com C1q, C1r, C2, C5 e C9 (XU, *et al.*, 2007).

É evidente que os polissacarídeos possuem diferentes mecanismos de inibição do sistema complemento, entretanto, algumas peculiaridades em relação à estrutura, massa molecular e composição glicídica parecem ser necessárias. A presença de grupamentos sulfato (BLONDIN, *et al.*, 1994; ZVYAGINTSEVA, *et al.*, 2000), cadeias laterais com altas concentrações de arabinose e galactose bem

como a existência de estruturas ramificadas têm sido consideradas fatores importantes para a ação inibidora de polissacarídeos e glicoproteínas sobre o sistema complemento (BENENCIA, *et al.*, 1999; ZHU, *et al.*, 2009). Neste sentido, a estrutura altamente ramificada e formada majoritariamente por *Araf* e *Galp* de FRAGP pode estar influenciando na alta atividade inibitória sobre o sistema complemento.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

As folhas tanto de *P. americana* quanto *M. paradisiaca* se mostraram promissoras fontes de compostos fenólicos antioxidantes, sendo ainda mais evidente para a primeira (patente ANEXO II). As folhas do abacateiro são ricas em compostos fenólicos com inúmeras estruturas químicas, entretanto, estes compostos parecem degradar ou ficar indisponíveis à extração hidroalcoólica em folhas submetidas a altas temperaturas. Desta forma, o controle rígido da metodologia de secagem das folhas parece ser imprescindível para a manutenção dos altos níveis de compostos fenólicos e a consequente atividade antioxidante dos extratos resultantes.

Além disso, em solução, os compostos fenólicos de *P. americana* apresentam grande estabilidade quando submetido a altas temperaturas ou estocagem. Neste sentido, uma vez que já são utilizadas pela população na forma de infusões ditas terapêuticas, as folhas do abacateiro se apresentam não somente como fonte de compostos fenólicos, mas também como potencial matéria prima de uma bebida antioxidante com alto grau de conservação.

A arabinogalactana-proteína das folhas de *P. americana* foi capaz de inibir a via clássica de ativação do sistema complemento humano. Entretanto, são necessários mais estudos com relação à estrutura/atividade com intuito de verificar a influência da estrutura ramificada e altos teores de arabinoses laterais na modulação. É importante ressaltar, que as demais vias de ativação (alternativa e das lectinas) bem como os mecanismos de inibição da AGP sobre o sistema complemento devem ser futuramente explorados para que a modulação seja mais bem compreendida.

7.1. Extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. americana* e *M. paradisiaca*

- Ambos os extratos hidroalcoólicos apresentaram baixas concentrações de proteínas e ácidos urônicos e altas concentrações de carboidratos, sendo maior no extrato oriundo das folhas de *M. paradisiaca*.
- A concentração de compostos fenólicos foi maior para o extrato oriundo das folhas de *P. americana*, que por sua vez teve maior atividade antioxidante.

- As folhas de *P. americana* representam uma rica fonte de compostos fenólicos com diversas estruturas químicas, principalmente flavonoides denominados flavan-3-ols e flavonols glicosilados.
- Em *P. americana*, altas temperaturas de secagem das folhas diminuíram a concentração de compostos fenólicos e a consequente atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos resultantes.
- Os compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de *P. americana* se mostraram estáveis frente a altas temperatura em solução hidroalcoólica por até 8 horas e frente a estocagem (4 e 25 °C) por até 10 meses.

7.2. Fração FRAGP das folhas de *P. americana*

- A fração FRAGP mesmo com as purificações, se mostrou como uma mistura com baixas concentrações de proteínas, ácidos urônicos e fenólicos, e alta concentração de carboidratos.
- A porção glicídica de FRAGP é formada majoritariamente por uma arabinoglactana-proteína formada por uma cadeia principal de Galp (1→3) altamente ramificada em O6 e cadeia lateral formada principalmente por Araf em diversas ligações diferentes e Galp, Glcp, Rhap e Xylp em menores quantidades.
- A fração FRAGP se mostrou capaz de modular o sistema complemento humano de modo semelhante ao da heparina, ou seja, inibindo a ativação do sistema complemento causado por eritrócitos sensibilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: REVINTER, 2000.

ACCIOLY, M.P.; BEVILAQUA, C.M.L.; RONDON, F.C.M.; DE MORAIS, S.M.; MACHADO, L.K.A.; ALMEIDA, C.A.; DE ANDRADE JR., H.F.; CARDOSO, R.P.A. Leishmanicidal activity *in vitro* of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p.79-84, 2012.

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

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.

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

ALMAJANO, M.P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, J.A.L.; GORDON, M.H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v. 108, p. 55–63, 2008.

ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos**. Corpus. Rosário, Argentina, p. 69-72, 2004.

ALONSO-SALCES, R.M.; KORTA, E.; BARRANCO, A.; BERRUETA, A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Determination of polyphenolic profiles of basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3761-3767. 2001.

ALONSO-SALCES, R.M.; NDJOKO, K.; QUEIROZ, E.F.; IOSET, J.R.; HOSTETTMANN, K.; BERRUETA, L.A.; GALLO, B.; VICENTE, F. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 89–100, 2004.

ALVÁREZ, J.M.; CUCA, L.E.; CARRASCO-PANCORBO, A.; RUIZ-MUELLE, A.B.; FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic constituents of leaves from *Persea caerulea* Ruiz & Pav; Mez (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 67, p. 53-57, 2016.

APÁTI, P.; SZENTMIHÁLYI, K.; BALÁZS, A.; BAUMANN, D.; HAMBURGER, M.; KRISTÓ, T.S.; SZÖKE, É.; KÉRY, Á. HPLC Analysis of the flavonoids in pharmaceutical preparations from Canadian Goldenrod (*Solidago Canadensis*). **Chromatographia**, v. 56, n.1, p. S65–S68, 2002

ARABSHAHI-DELOUEE, S.; UROOJ, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1233–1240, 2007.

ASAOLU, M.F.; ASAOLU, S.S.; FAKUNLE, J.B.; EMMAN-OKON, B.O.; AJAYI, E.O.; TOGUN, R.A. Evaluation of in-vitro antioxidant activities of methanol extracts of *Persea americana* and *Cnidosculus aconitifolius*. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, p. 1074-1077, 2010.

AUN, M.V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J.C.; KALIL, J.; AGONDI, R.C.; MOTTA, A.A. Aditivos em alimentos. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**, v. 34, p. 177-186, 2011.

BEKEDAM, E.K.; SCHOLS, H.A.; VAN BOEKEL, M.A.J.S.; SMIT, G. Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2055-2063, 2008.

BENENCIA, F.; RODRIGUEZ, M.C.; MATULEWICZ, M.C.; COULOMBIÉ, F.C. Neutral polysaccharide from *Cedrela tubiflora* with anticomplementary activity. **Phytochemistry**, v. 50, p. 57-62, 1999.

BERNAL, F.A.; CUCA-SUÁREZ, L.E.; YAMAGUCHI, L.F.; COY-BARRERA, E.D. LC-DAD-UV and LC-ESI-MS-based analyses, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of a polar fraction from *Iryanthera ulei* leaves. **Records of Natural Products**, v. 7, n. 2, p. 152-156, 2013.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BLONDIN, C.; FISCHER, E.; BOISSON-VIDAL, C.; KAZATCHKINE, M.D. JOZEFONVICZ, J. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. **Molecular Immunology**, v. 31, n. 4, p. 241-253, 1994.

BORGES, A.L.; SOUZA, L.S.; TRINIDADE, A.D.; **O cultivo da bananeira**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2004

BOTTERWECK, A.A.M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOEHM, R.A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P.A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 599-605, 2000.

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

BRAI, B.I.C.; ODETOLA, A.A.; AGOMO, P. U. Hypoglycemic and hypocholesterolemic potential of *Persea americana* leaf extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 356-360, 2007.

BRITO, A.; RAMIREZ, J.E.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M.J. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, p. 17400-17421, 2014.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; CHEW, Y.L. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1214-1222, 2007.

CHEESMAN, E.E. Classification of the Bananas: The Genus *Musa* L. **Kew Bulletin**, v. 2, n. 2, p. 106-117, 1947

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

DE ALMEIDA, A.P.; MIRANDA, M.M.F.S.; SIMONI, I.C.; WIGG, M.D.; LAGROTA, M.H.C.; COSTA, S.S. Flavonol monoglycosides from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 562-567, 1998.

DEL VALLE, L.G. Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 1, p. 1-7, 2011.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA; D., STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, p. 654-660, 2006.

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.

DUTTA, R.; DAS, N. Immunomodulation of serum complement (C3) and macrophages by synthetic pyrethroid fenvalerate: In vitro study. **Toxicology**, v.285, p.126-132, 2011.

EDENS R.E.; LINHARDT R.J.; WEILER J.M. Heparin is not just an anticoagulant anymore: six and one-half decades of studies on the ability of heparin to regulate complement activity. **Complement Profiles**. v. 1, p. 96-120, 1993.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M.C. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. **Journal of Chromatography**, v. 823, p. 331-337, 1998

ESPOSITO, E.; ROTILIO, D.; DI MATTEO, V.; DI GIULIO, C.; CACCHIO, M.; ALGERI, S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 719-735, 2002.

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.; STONE, B.A.; CLARKE, A.E. ARABINO GALACTAN-PROTEINS: Structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

FIORAVANÇO, J.C. Mercado mundial da banana: Produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, v.33, p.15-27, 2003.

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

GAZZANI, G.; PAPETTI, A.; MASSOLINI, G.; DAGLIA, M. Anti- and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4118-4122, 1998.

GEDDES, D.S.; WILKIE, K.C.B. Hemicelluloses from the stem tissues of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. **Carbohydrate Research**, v. 18, p.333-335, 1971

GEE, J.M.; JOHNSON, I.T. Polyphenolic Compounds: Interactions with the Gut and Implications for Human Health. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1245-1255, 2001.

GONDA, R.; TOMODA, M.; SHIMIZU, N. Structure and anticomplementary activity of an acidic polysaccharide from the leaves of *Vulva sylvestris* var. *mauritanica*. **Carbohydrate Research**, v. 198, p. 323-329, 1990.

HEITZER, T.; SCHLINZIG, T.; KROHN, K.; MEINERTZ, T.; MÜNZEL, T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 104, p. 2673-2678, 2001.

HUSSAIN, A.; KHAN, M.N.; SAJID, M.S.; IQBAL, Z.; KHAN, M.K.; ABBAS, R.Z.; RAZA, M.A.; NEEDHAM, G.R. *In vitro* screening of the leaves of *Musa paradisiaca* for anthelmintic activity. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 20, p. 5-8, 2010.

HUSSAIN, A.; KHAN, M.N.; IQBAL, Z.; SAJID, M.S.; KHAN, M.K. Anthelmintic activity of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 92–99, 2011.

IMAM, M.Z.; AKTER, S. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L.: A phytochemical and pharmacological review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, p. 14-20, 2011.

JAVANMARDI, J; STUSHNOFF, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J.M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 83, p. 547–550, 2003.

JIMÉNEZ, P.; GARCÍA, P.; BUSTAMANTE, A.; BARRIGA, A.; ROBERT, P. Thermal stability of oils added with avocado (*Persea americana* cv. Hass) or olive (*Olea europaea* cv. Arbequina) leaf extracts during the French potatoes frying. **Food Chemistry**, v. 221, p. 123–129, 2017.

KATSUBE, T.; TSURUNAGA, Y.; SUGIYAMA, M.; FURUNO, T.; YAMASAKI, Y. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 113, p. 964-969, 2009.

KUMAR, R.; PATIL, M.B.; PATIL, S.R.; PASCHAPUR, M. S. Evaluation of *Anacardium occidentale* gum as gelling agent in Aceclofenac Gel. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, p. 695-704, 2009.

LAMEIRA, O.A.; PEREIRA PINTO, J.E.B. **Plantas Mediciniais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental,, p. 21-24, 2008.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1390-1393, 1997.

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F.J. **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto de Estudos da Flora., p. 342-343, 2008.

MAILLARD, M.N.; BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning: ole of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, 1789-1793, 1995.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; NOTHNAGEL, E. A. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. **Plant Physiology**, v. 122, p. 3-9, 2000.

MARIE-MAGDELEINE, C.; BOVAL, M.; PHILIBERT, L.; BORDE, A.; ARCHIMÈDE, H. Effect of banana foliage (*Musa x paradisiaca*) on nutrition, parasite infection and growth of lambs. **Livestock Science**, v. 131, p. 234-239, 2010.

MARQUEZ, A.; SERRATOSA, M.P.; MERIDA, J. Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. **Food Chemistry**, v. 146, p. 507-514, 2014.

MICHAELSEN T.E.; GILJE A., SAMUELSEN A.B, HOGASEN K, PAULSEN B.S. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 52, p. 483-90, 2000.

MONAGAS, M.; SUÁREZ, R.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, n. 2, p. 139-147, 2005.

MONOBE, M.; EMA, K.; KATO, F.; MAEDA-YAMAMOTO, M. Immunostimulating activity of a crude polysaccharide derived from green tea (*Camellia sinensis*) extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1423-1427, 2008.

MONTORO, P.; TUBEROSO, C.I.G.; PIACENTE, S.; PERRONE, A.; DE FEO, V.; CABRAS, P.; PIZZA, C. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1614-1619, 2006.

MRAD, N.D.; BOUDHRIOUA, N.; KECHAOU, N.; COURTOIS, F.; BONAZZI, C. Influence of air drying temperature on kinetics, physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 433–441, 2012.

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

OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p 307, 1986.

PAULSEN, B. S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Current Organic Chemistry**, v.5, n.9, p.939-950, 2001.

PAULSEN, B.S.; CRAIK, D.J.; DUNSTAN, D.E.; STONE, B.S.; BACIC, A. The Yariv reagent: Behaviour in different solvents and interaction with a gum Arabic arabinogalactanprotein. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 460–468, 2014.

PEIXOTO, E.C.T.M.; DE ANDRADE, A.; VALADARES, F.; DA SILVA, L.P.; DA SILVA, R.M.G. Phytotherapy in the control of helminthiasis in animal production. **African Journal of Agricultural Research**. v. 8, p. 2421-2429, 2013.

PEREIRA-NETTO, A.B.; PETTOLINO, F.; CRUZ-SILVA, C.T.A.; SIMAS, F.F.; BACIC, A.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; MAURER, J.B.B. Cashew-nut exudate gum: Identification of an arabinogalactan-protein as a constituent of the gum and use on the stimulation of somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 173, p. 468-477, 2007.

QUE, F.; MAO, L.; FANG, X.; WU. Comparison of hot air-drying and freeze-drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) flours. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1195–1201, 2008.

RECAMALES, Á.F.; SAYAGO, A.; GONZÁLEZ-MIRET, M.L.; HERNANZ, D. The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. **Food Research International**, v. 39, p. 220-229, 2006.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science Reviews**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

SAHU, A.; PANOBURN, M.K. Identification of multiple sites of interaction between heparin and the complement system. **Molecular Immunology**, v. 30, n. 7, p. 679-684, 1993.

SAMUELSEN, A.B.; PAULSEN, B.S.; WOLD, J.K.; KNUTSEN, S.H.; YAMADA, H. Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 145-153, 1998.

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.

SASAKI, Y.F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives. **Mutation Research**, v. 519, p. 103-119, 2002.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SCHEIBMEIR, H.D.; CHRISTENSEN, K.; WHITAKER, S.H.; JEGAETHESAN, J.; CLANCY, R.; PIERCE, J.D. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. **Intensive and Critical Care Nursing**, v. 21, p. 24-28, 2005.

SCHULTZ, C.; GILSON, P.; OXLEY, D.; YOUL, J.; BACIC, A. GPI-anchors on arabinogalactanproteins: implications for signalling in plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 11, p.426-431, 1998.

SEIFERT, G.J.; ROBERTS, K. The biology of arabinogalactan proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 137-61, 2007.

SHIN K.S.; KWON K.S.; YANG H.C. Screening and characteristics of anti-complementary polysaccharides from Chinese medicinal herbs. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 35, p. 42-50, 1992.

SHON, M.Y.; KIM, T.H.; SUNG, N.J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. **Food Chemistry**, v. 82, p. 593-597, 2003.

SHOWALTER, M. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 1399-1417, 2001.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree

(*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.2144-2155, 2003.

SIMMONDS, N.W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Journal of the Linnean Society of London-Botany**, v. 55, n. 359, p. 302-312, 1995.

SIMS, I.M.; FURNEAUX, R.H. Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 423-431, 2003.

SINGLETON, V.L.; ROSSI JR., J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SONI, P.; SIDDIQUI, A.A.; DWIVEDI, J.; SONI, V. A Review on ethnomedical, phytochemical and pharmacological profile of *Musa paradisiaca* L. **The Global Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 1549-1560, 2013.

STRACKE, R.; ISHIHARA, H.; HUEP, G.; BARSCH, A.; MEHRTENS, F.;NIEHAUS, K.; WEISSHAAR, B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. **The Plant Journal**, v. 50, p. 660–677, 2007.

SUÁREZ, E.R.; KRALOVEC, J.A.; NOSEDA, M.D.; EWART, H.S.; BARROW, C.J.; LUMSDEN, M.D.; GRINDLEY, T.B. Isolation, characterization and structural determination of a unique type of arabinogalactan from an immunostimulatory extract of *Chlorella pyrenoidosa*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1489-1498, 2005.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679-693, 2007.

TAUTVYDAS, K. J. Isolation and characterization of an extracellular hydroxyproline-rich glycoprotein and a mannose-rich polysaccharide from *Eudorina californica* (Shaw). **Planta**, v. 140, n. 3, p. 213-220, 1978.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y.S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 835–841, 2006.

VALARMATHY, K.; GOKULAKRISHNAN, M.; KAUSAR, M.S.; PAUL, K. A study of antimicrobial activity of ethanolic extracts of various plant leaves against selected microbial species. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 1, p.293-295, 2010.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; IZAKOVIC, M.; MAZU, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAN DER SLUIS, A.A.; DEKKER, M.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple Juice. 3. Stability during Storage. **Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p.1073-1080, 2005.

VAN HOLST, G.J.; CLARKE, A.E. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. **Analytical Biochemistry**, v. 148, p. 446-450, 1985.

VEGA-GÁLVEZ, A.; DI SCALA, K.; RODRÍGUEZ, K.; LEMUS-MONDACA, R.; MIRANDA, M.; LÓPEZ, J.; PEREZ-WON, M. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. *Hungarian*). **Food Chemistry**, v. 117, p. 647–653, 2009.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, Vegetables, and Grain Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113–4117, 1998.

WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 140-146, 2000.

WHYSNER, J.; WANG, C.X.; ZANG, E.; IATROPOULOS, M.J.; WILLIAMS, G.M. Dose response of promotion by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumours of the rat forestomach. **Food Chemistry Toxicology**, v. 32, p. 215-222, 1994.

WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.J.; WHYSNER, J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1027-1038, 1999.

XU, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; CHEN, D. Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii*. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 175-182, 2007.

YAMADA, H.; NAGAI, T.; CYONG, J.; OTSUKA, Y.; TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; SHIMADA, K.. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v.144, p.101–111, 1985.

YAMADA H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 269-76, 1994.

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 (Mestrado em Ciências – Bioquímica). Departamento Bioquímica. Setor Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

YARIV, J.; RAPPORT, M.M.; GRAF, L. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. **Biochemical Journal**, v.85, p.383, 1962.

YARIV, L.; LIS, H.; KATCHALSKI, E. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. **Biochemical Journal**, v.105, p.1-2, 1967.

YAZAKI, K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites **FEBS Letters**, v. 580, p. 1183-1191, 2006.

YU, H.; MUÑOZ, E.M.; EDENS, R.E.; LINHARDT, R.J. Kinetic studies on the interactions of heparin and complement proteins using surface plasmon resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 168-176, 2005.

ZAFRILLA, P.; MORILLAS, J.; MULERO, J.; CAYUELA, J.M.; MARTÉNEZ-CACHÁ, A.; PARDO, F.; NICOLÁS, J.M.L. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4694-4700, 2003.

ZHU, H.; DI, H.; ZHANG, Y.;ZHANG, J.; CHEN, D. A protein-bound polysaccharide from the stem bark of *Eucommia ulmoides* and its anti-complementary effect. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1319-1324, 2009.

ZVYAGINTSEVA, T.N.; SHEVCHENKO, N.M.; NAZAROVA, I.V.; SCOBUN, A.S.; LUK'YANOV, P.A.; ELYAKOVA, L.A. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 126, p. 209–215, 2000.

ANEXOS

I

Chemistry	Elsevier Editorial System(tm) for Food Manuscript Draft
Manuscript Number:	
Title:	Avocado leaves: a promising source of natural food preservatives
Article Type:	Research Article (max 7,500 words)
Keywords:	Persea americana; polyphenols; flavonols glycosides; antioxidants; DPPH; stability assays; BHT; food preservatives
Corresponding Author:	Dr. Juliana Bello Baron Maurer, Dr
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Paraná
First Author:	Fábio T Yamassaki, Msc
Order of Authors:	Fábio T Yamassaki, Msc; Luciano H Campestrini, Dr; SELMA F ZAWADZKI-BAGGIO , Dr; Juliana Bello Baron Maurer, Dr
Abstract:	The ethanolic extract of avocado leaves (A50 fraction) presented a total phenolic content of 237.1 ± 25.1 µg/mg of dry matter, characterized using an LC-MS analysis as a mixture of polyphenols containing flavan-3-ols and flavonols glycosides. A50 presented an antioxidant activity with a DPPH EC50 of 57.8 ± 5.4 µg/mL. Stability assays were performed to investigate the appropriate conditions for preserving the phenolic content and antioxidant activity of avocado leaf extracts. Neither the phenolic content nor antioxidant activity was influenced by time or temperature under different incubation and storage conditions. However, both were affected significantly by the temperature used when air drying the plant material. In conclusion, the avocado plant can be used as a source of polyphenols for promising applications such as food preservation, in addition to its importance as a food and nutraceutical.

II

YAMASSAKI, F.T.; BOVO, F.; BAGGIO, S.F.Z.; CAMPESTRINI, L.; MAURER, J. **Uso e obtenção de extratos das folhas de *Persea americana* Mill.** 2013. Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI1020130287431, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito PCT: 07/11/2013; Depósito: 07/11/2013.

III



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 855

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

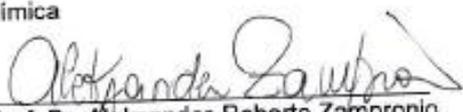
PROCESSO/PROCESS: 23075.053625/2014-18

APROVADO/APPROVAL: 16/12/2014 – R.O. 10/2014

TÍTULO/TITLE: Atividade antioxidante e imunomoduladora de compostos bioativos de folhas de *Persea americana* Mill. e *Musa x paradisiaca* L.

AUTORES/AUTHORS: Juliana Bello Baron Maurer, Fábio Tomio Yamassaki, Melina Seyfried, Andressa Soldara da Silva, Selma Faria Zawadzki, Fabiola Regina Stevan-Hancke, Lew Sprenger, Marcelo Molento

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Bioquímica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA

IV



Ministério da
Educação



EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
COMPLEXO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR

Curitiba, 01 de setembro de 2016.

Ilmo (a) Sr. (a)
Juliana Bello Baron Maurer
Universidade Federal do Paraná
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que a **Solicitação para alterações na equipe de pesquisa; inserção de novas espécies vegetais a serem estudadas; atualização e inserção de novas metodologias e atualização do cronograma**, datado de 31 de maio de 2016, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado: "ARABINOGALACTANA-PROTEÍNAS E PECTINAS DE PLANTAS MEDICINAIS: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E INVESTIGAÇÃO DE PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em 23 de agosto de 2016.

O referido documento atende aos aspectos das Resoluções CNS 466/2012, e sua complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0187.0.208.000-08
CEP: 1739.156/2008-08

Atenciosamente,

Renato Tambara Filho
Vice Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA
COORDENADORIA DE EXTENSÃO

Curso de Extensão Universitária

Fábio Tomio Yamassani frequentou com aproveitamento o Curso de Extensão Universitária "TREINAMENTO EM MANIPULAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL", realizado no período de 21 a 24 de maio de 2012, num total de 32 horas/aula, conforme o programa no verso, promovido pelo Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Certificado registrado no Livro 45 sob o n.º 279.637, com frequência de 100% e nota 8,5.

Curitiba, 26 de maio de 2012.


Mara M. Bunk
CHEFE DA UNIDADE DE CURSOS DE EXTENSÃO


Nadia Galofatto Gonçalves
COORDENADORA DE EXTENSÃO